



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE UMA FRAÇÃO RICA EM
ALCALÓIDES ISOLADA DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.:
ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

Adriana Rolim Campos Barros

Fortaleza – Ceará

2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Adriana Rolim Campos Barros

**EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE UMA FRAÇÃO RICA EM
ALCALÓIDES ISOLADA DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.:
ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

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

Orientador: Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza – Ceará

2005

B273e Barros, Adriana Rolim Campos

Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides isolada de *Aspidosperma ulei* Markgr.: estudo *in vivo* e *in vitro*/ Adriana Rolim Campos Barros. – Fortaleza, 2005.

197 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao.

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

1. Aspidosperma. I. Título.

CDD 615.32

EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE UMA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES ISOLADA DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer texto desta Tese é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética.

Tese aprovada com louvor em: 16 / 09 / 2005

Banca examinadora:

Prof. Dr. Vietla Satyanarayna Rao (Orientador)

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Prof. Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

A Deus;
Aos meus pais, Vicente e Francisca;
Aos meus irmãos, Maria Cecília e Paulo Eduardo
e ao meu esposo, Antonio Iran.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao meu esposo, Antonio Iran, pelo amor, incentivo e companheirismo.

Ao Professor Vietla Satyanarayana Rao pela orientação científica e pessoal.

Ao Professor Edilberto Rocha Silveira e ao seu aluno de doutorado Daniel Esdras de Andrade Uchoa pelo fornecimento da fração SF₃₋₅ e pela análise fitoquímica da mesma.

Ao Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento pela imprescindível colaboração na realização do estudo in vitro.

À professora Cláudia Ferreira Santos pelo estímulo e incentivo.

À minha grande amiga Emmanuelle Coelho Noronha por sempre estar pronta a oferecer o seu ombro.

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Professora Adriana Tomé, Carol Mourão, Professora Flávia Almeida, Professor Francisco de Assis, Jeferson Falcão, Juliana Maia, Karina Moreira, Laura Andréa, Professora Luilma Albuquerque, Regilane Matos e Roberto César..

De forma especial agradeço à Karina Moreira pelas incontáveis horas de fisiográfico e ao Roberto César pelos vários finais-de-semana passados no laboratório.

Aos bolsistas e ex-bolsistas do Laboratório de Produtos Naturais, Alana, Apolyana, Bruno, Cinthia, Deive, Fabrício, Hermes, Ítalo, Jonny, Kelcyana, Lívia, Mariana, Rafaela e Wilcare por todos os bons momentos passados no laboratório.

Aos componentes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Universidade Estadual do Ceará.

À Aline Bastos e Karina Marques pelo apoio técnico.

À minha amiga de todos os momentos Emmanuelle Coelho Noronha.

Aos funcionários do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e o Juciê pela presteza na entrega dos animais.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Rose, Íris, Chiquinho, Fernando, Marta e Joana.

Às secretárias da Pós-Graduação, Sílvia Maria e Aura Rhanes, pela amizade, eficiência e gentileza.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FUNCAP pelo suporte financeiro.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

RESUMO

EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE UMA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES ISOLADA DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.: ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Adriana Rolim Campos Barros. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Depto. de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2005.

O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) é conhecido por ser rico em alcalóides indólicos do tipo ioimbina. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade, efeitos sobre o comportamento e um possível pró-eréttil de uma fração rica em alcalóides isolada da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr. (SF₃₋₅). Os testes de toxicidade aguda foram realizados para determinar a DL₅₀ em camundongos e a CL₅₀ em *Artemia sp.* Os efeitos sobre o comportamento foram estudados nos testes do campo aberto, placa perfurada, labirinto em cruz elevado, "rota-rod", natação forçada e tempo de sono induzido por barbitúrico. Os estudos *in vitro* com a fração foram realizados em canal deferente de camundongos e corpos cavernosos de coelhos e humanos. Os valores estimados para a DL₅₀ (i.p.) em camundongos e CL₅₀ em *Artemia sp.* foram na ordem de 400 mg/Kg e 3,94 µg/mL, respectivamente. Os testes comportamentais em camundongos revelaram uma atividade estimulante de SF₃₋₅ sobre o SNC mas não demonstraram incoordenação motora no teste do "rota-rod". A injeção intraperitoneal de 25 mg/Kg de SF₃₋₅ induziu a ereção peniana em 75 % dos camundongos. Este efeito foi completamente abolido pelo pré-tratamento com clonidina (agonista receptores adrenérgicos α_2) ou haloperidol (antagonista dopaminérgico) e somente parcialmente inibido pelo L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) e pelo azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel). SF₃₋₅ também reverteu a depressão do comportamento sexual induzida por fluoxetina. No canal deferente de camundongos, as contrações induzidas pela estimulação por campo elétrico ou noradrenalina, mas não as induzidas por ATP, foram inibidas por SF₃₋₅ (1 – 64 µg/mL). SF₃₋₅ (1 – 300 µg/mL) promoveu relaxamento concentração-dependente nas preparações de corpos cavernoso humanos e de coelhos pré-contraídas com fenilefrina, potássio ou PGF_{2 α} . Nossos resultados indicam que SF₃₋₅ manifesta atividade pró-eréttil possivelmente envolvendo mecanismos centrais (sistemas dopaminérgico, adrenérgico e nitrérgico) e periférico (efeito relaxante do músculo liso cavernoso aparentemente envolvendo o fluxo de Ca⁺²). Estes dados também sugerem que *Aspidosperma ulei* Markgr. pode ser explorada como uma alternativa para o tratamento da disfunção eréttil. São necessários estudos futuros para identificar e isolar o composto químico ativo presente em SF₃₋₅ responsável pela atividade farmacológica.

Palavras-chave: *Aspidosperma ulei*, SF₃₋₅, efeito pró-eréttil.

ABSTRACT

PROERECTILE EFFECT OF AN ALKALOIDICAL RICH FRACTION ISOLATED FROM *Aspidosperma ulei* MARKGR.: *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDY. Adriana Rolim Campos Barros. Supervisor: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Doctoral Thesis. Course of Post-graduation in Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceará Universidade Federal do Ceará, 2005.

The genus *Aspidosperma* (Apocyanaceae) is known to be rich in yohimbine type of indol alkaloids. This study was aimed to evaluate the alkaloid rich fraction (SF₃₋₅) obtained from *Aspidosperma ulei* Markgr. root bark for its general toxicity, behavioral effects in mice and a possible proerectile activity. Acute toxicity tests were performed to determine the LD₅₀ in mice and LC₅₀ with *Artemia* sp. Behavioral effects were studied in the tests of open-field, hole-board, plus-maze, rota-rod, forced-swimming, and on barbiturate-induced sleeping time. *In vitro* studies with the fraction were carried out using mouse vas deferens and the rabbit and human corpus cavernous tissues. The estimated values of i.p. LD₅₀ in mice and LC₅₀ with *Artemia* sp. were in the order of 400 mg/kg, and 3.94 µg/ml, respectively. Behavioral tests in mice revealed a general stimulant activity of SF₃₋₅ on CNS but demonstrated no motor impairment in rota-rod test. At 25 mg/kg intraperitoneal injection of SF₃₋₅, penile erections were evidenced in 75% of the mice. This effect was completely abolished by pretreatment with clonidine (α₂ –adrenoceptor agonist) or haloperidol (dopaminergic antagonist) and only partially inhibited by L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) and by methylene blue (soluble guanylate cyclase inhibitor). SF₃₋₅ also abrogated the fluoxetine-induced depression in sexual behavior. In mouse vas deferens, contractile effects induced by electrical field stimulation or noradrenaline but not induced by ATP were inhibited by SF₃₋₅ (1-64 µg/ml). In both human and rabbit isolated corpus cavernosum preparations pre-contracted by phenylephrine, high potassium or PGF_{2α}, SF₃₋₅ (1-300 µg/ml) caused concentration-dependent relaxation. Our results indicate that SF₃₋₅ manifests pro-erectile activity possibly involving both central (dopaminergic, adrenergic and nitriergic systems) and peripheral (relaxant effect on corpus cavernosal smooth muscle, probably involving Ca⁺² flux) mechanisms. These data also suggest that *Aspidosperma ulei* Markgr. can be explored as an alternative for the treatment of erectile dysfunction. The study further warrants the identification and isolation of the active chemical compound present in SF₃₋₅, responsible for the pharmacological activity.

Key-words: *Aspidosperma ulei*, SF₃₋₅, proerectile effect

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Incidência da disfunção erétil por faixa etária, Bahia, Brasil.	24
2	Anatomia do pênis.	28
3	Mecanismo molecular da contração do músculo liso peniano.	43
4	Mecanismo molecular do relaxamento do músculo liso peniano.	44
5	Mecanismo de ação dos inibidores da PDE ₅ .	47
6	Inibidores da PDE ₅ .	49
7	Ioimbina.	51
8.	Regulação do tônus muscular cavernoso e mecanismo de ação da YOH.	53
9	Fentolamina.	54
10	Apomorfina.	56
11	A. Berberina. B. Papaverina.	57
12	Foskolina.	60
13	Estrutura química dos alcalóides de <i>Aspidosperma</i> .	61
14	A,B,e C. <i>Aspidosperma ulei</i> Markgr.	64
15	Localização geográfica do município de Acarape.	72
16	D-1-O-metil-mio-inositol.	73
17	Uleína.	76
18	<i>nor</i> -uleína.	76
19	Tetrahydro-3,14,4,21-elipticina.	76
20	Ereção.	82
21	<i>Erection-like</i> .	82
22	<i>Grooming</i> genital.	83
23	Anatomia do sistema reprodutor masculino de camundongo.	85
24	Corpo cavernoso de coelho.	86
25	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por estímulo elétrico (0,1 Hz) em canal deferente de camundongos.	110
26	A. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ (A) na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos	

	cavernosos de coelhos. B. Recuperação do tecido após um período de 30 min de lavagem.	115
27	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ (A) na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) e na contração induzida por K ⁺ 60 mM na presença de Guanetidina 10 µM (G) e Fentolamina 10 µM (F) em corpos cavernosos de coelhos.	116
28	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de L-NAME 100 µM.	117
29	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de ODQ 10 µM.	118
30	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de TTX 1 µM.	119
31	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Glibenclamida (GLIB) 10 mM.	120
32	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Apamina (Apa) e Caribdotoxina (Car) 0,1 µM.	121
33	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração do corpo cavernoso de coelhos induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Atropina (Atrop) 10 µM.	122
34	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Ácido Niflúmico (Ác. Nifl.) 10 µM.	123
35	Registro fisiográfico representativo do efeito da pré-incubação com SF ₃₋₅ na contração induzida por K ⁺ 60 mM em corpos cavernosos de coelhos.	124
36	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por PGF _{2α} 10 ⁻³ M em corpos cavernosos de coelhos na presença de Nifedipina 10 µM e EGTA 100 µM.	126
37	Registro fisiográfico representativo do efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos humanos.	128

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
1	Efeito de SF ₃₋₅ no teste do campo aberto em camundongos.	90
2	Efeito de SF ₃₋₅ no teste da placa exploratória em camundongos.	91
3	Efeito de SF ₃₋₅ no número de entradas (A) e tempo de permanência (B) nos braços abertos (BA) e fechados (BF) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.	93
4	Efeito de SF ₃₋₅ no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.	94
5	Efeito de SF ₃₋₅ no teste da natação forçada em camundongos.	95
6	Efeito pró-erétil de SF ₃₋₅ , loimbina, Apomorfina e Vardenafil em camundongos.	97
7	Efeito de SF ₃₋₅ , loimbina, Apomorfina e Vardenafil no parâmetro de <i>erection-like</i> em camundongos.	98
8	Efeito de SF ₃₋₅ , loimbina, Apomorfina e Vardenafil no parâmetro de <i>grooming</i> em camundongos.	99
9	Efeito de SF ₃₋₅ no canal deferente de camundongo estimulado eletricamente (ECE 0,1 Hz).	110
10	Efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Noradrenalina e ATP em canal deferente de camundongo.	111
11	Aumento do relaxamento induzido por ECE (2 Hz) por SF ₃₋₅ em corpo cavernoso de coelhos.	112
12	Curva dose-resposta de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) no corpo cavernoso de coelhos.	114
13	Efeito de SF ₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) e na contração induzida por K ⁺ 60 mM na presença de Guanetidina 10 µM (G) e Fentolamina 10 µM (F).	116
14	Efeito do L-NAME no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen).	117
15	Efeito do ODQ no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen).	118
16	Efeito da TTX no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen).	119
17	Efeito da Glibenclamida (Glib) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida	

	por Fenilefrina 10 μ M (Fen).	120
18	Efeito da Apamina (Apa) + Caribdotoxina (Car) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 μ M (Fen).	121
19	Efeito da Atropina no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 μ M (Fen).	122
20	Efeito do Ácido Niflúmico (Ác. Nifl) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF ₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 μ M (Fen).	123
21	Efeito de SF ₃₋₅ no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos em resposta à contração induzida por PGF _{2α} 10 ⁻³ M na presença de Nifedipina 10 μ M e EGTA 100 μ M.	125
22	Efeito de SF ₃₋₅ no corpo cavernoso humano pré-contraído com Fenilefrina 10 μ M (Fen).	127

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Classificação e causas mais comuns da disfunção erétil.	25
2	Neurotransmissores e neuropeptídeos que influenciam a ereção peniana através do Sistema Nervoso Central.	30
3	Neurotransmissores, neuropeptídeos e outros agentes que atuam localmente nos tecidos eréteis.	39
4	Efeito de SF ₃₋₅ no teste do “ <i>Rota-rod</i> ” em camundongos.	89
5	Efeito da clonidina sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos.	100
6	Efeito da clonidina sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos.	101
7	Efeito do haloperidol sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos.	102
8	Efeito do haloperidol sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos.	103
9	Efeito do L-NAME sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ (A) e sobre a atividade de SF ₃₋₅ nos parâmetros comportamentais (B) em camundongos.	104
10	Efeito do azul de metileno sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ (A) e sobre a atividade de SF ₃₋₅ nos parâmetros comportamentais (B) em camundongos.	105
11	Efeito da fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ (A) e nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos (B).	107
12	Efeito do tratamento durante 13 dias com fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ (A) e nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos (B).	1108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A.	<i>Aspidosperma</i>
Ác.	Ácido
Ach	Acetilcolina
Apa	Apamina
Apa-I	Fração (3-5/5/3-5/10-13) de ApCRE-AE
Apa-II	Fração (3-5/8-9) de ApCRE-AE
Apa-III	Fração (6-9) de ApCRE-AE
Apo	Apomorfina
ApCRE	Extrato etanólico das cascas da raiz de <i>Aspidosperma ulei</i> Markgr.
ApCRE-AE	Fração acetato de etila de ApCRE
ApCRE-AQ	Fração aquosa de ApCRE
Arac.	Araquidônico
Atrop	Atropina
AC	Adenilato ciclase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
APVH	Área hipotalâmica periventricular
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CaCl₂6H₂O	Cloreto de cálcio hexahidratado
Car	Caribdotoxina
Ca⁺²	Cálcio
Cl⁻	Cloreto
CB-1	Receptor canabinóide 1
CCD	Cromatografia em camada delgada
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
CL₅₀	Concentração letal para 50 % da amostra

CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
D	Receptor dopaminérgico
DE	Disfunção erétil
DL₅₀	Dose letal para 50 % da amostra
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECE	Estimulação por campo elétrico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol - bis (2-aminoetileter) - N,N,N',N' -tetraacético]
END	Endotelina
Fen	Fenilefrina
FDA	Food and Drug Administration
G_i	Proteína G inibitória
G_s	Proteína G estimulante
Glib	Glibenclamida
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Guanilato ciclase
GMP_c	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IP₃	Trifosfato de inositol
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
K⁺	Potássio
K_{ATP}	Canal de potássio dependente de ATP
K_{Ca}	Canal de potássio de alta condutância dependente de cálcio
KH₂PO₄	Fosfato de sódio dibásico
KHS	Solução de Krebs-Henseleit
KCl	Cloreto de potássio
L-Arg	L-Arginina
L-NA	N ^G -nitro-L-arginina

L-NAME	L-nitro arginina metil éster
LCE	Labirinto em cruz elevado
M	Molar
M₃	Receptor muscarínico tipo 3
Mg⁺⁺	Magnésio
MgCl₂6H₂O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MALES	Men's Attittudes to Life Events and Sexuality
MPOA	Área pré-óptica medial
MSH	Melacortina
MVD	Canal deferente de camundongo
n	Número
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
Nifl	Niflúmico
NA	Noradrenalina
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NIH	National Institute of Health
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS_{nμ}	Óxido nítrico sinate neuronal subtipo mu
NPY	Neuropeptídeo Y
ODQ	1H-[1,2,4]Oxidiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one
p	Probabilidade
ppm	Partes por milhão
pH	Potencial de hidrogênio

PDE	Fosfodiesterase
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGE_R	Receptor para prostaglandina E
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PHI	Peptídeo histidina-isoleucina
PHM	Peptídeo histidina-metionina
PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase dependente de GMP _c
PLC	Fosfolipase C
POA	Área pré-óptica
PVN	Núcleo paraventricular
r.p.m.	Rotações por minuto
R_{máx}	Resposta máxima
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA_m	RNA mensageiro
s.c.	Subcutânea
sp.	Espécie
SF₃₋₅	Subfração alcaloídica das cascas da raiz de <i>Aspidosperma ulei</i> Markgr.
SL	Sublingual
SNC	Sistema Nervoso Central
SPc	Medula espinhal (<i>spinal cord</i>)
TTX	Tetrodotoxina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UK	United Kingdom
USA	United States of America
vs	<i>Versus</i>
V	Volt (s)
Var	Vardenafil
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal
VIP_R	Receptor para VIP

YOH	loimbina
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT_{1B/2C}	Receptores setonérgicos 1B e 2C
5-HT_{2A}	Receptor serotonérgico 2A
μ	Receptor opióide mu
α	Receptor adrenérgico alfa
β	Receptor adrenérgico beta
-/-	Knockout
ω	Omega
®	Marca registrada
∅	Diâmetro
μg	Micrograma (s)
μM	Micromolar
[K⁺]	Concentração de potássio

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	15
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. DISFUNÇÃO ERÉTIL	23
1.1.1. Anatomia do pênis e mecanismos envolvidos no início e manutenção da ereção	26
1.1.2. Neurotransmissores e neuropeptídeos que controlam a ereção peniana	29
1.2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL	45
1.3. O GÊNERO <i>ASPIDOSPERMA</i>	61
1.3.1. <i>Aspidosperma ulei</i> Markgr.	62
2. OBJETIVOS	66
3. MATERIAIS	67
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	67
3.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS	68
3.3. DROGAS E REAGENTES	69
3.4. SOLUÇÕES	71
4. METODOS	72
4.1. COLETA DE <i>ASPIDOSPERMA ULEI</i> MARKGR	72
4.2. OBTENÇÃO DA SUBFRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS CASCAS DA RAIZ DE <i>ASPIDOSPERMA ULEI</i> MARKGR (SF ₃₋₅)	72
4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SF ₃₋₅	77
- Determinação da CL ₅₀ – Teste da <i>Artemia sp.</i>	77
- Determinação da DL ₅₀	77

4.4. EFEITO DE SF ₃₋₅ NO COMPORTAMENTO GERAL DE CAMUNDONGOS	78
4.4.1. Teste de coordenação motora	78
- Teste do “Rota-rod”	78
4.4.2. Teste de atividade locomotora	78
- Teste do campo aberto – “open-field”	79
4.4.3. Testes de atividade ansiolítica/ansiogênica	79
- Teste da placa perfurada – “hole-board”	79
- Teste do labirinto em cruz elevado – “plus-maze”	79
4.4.4. Teste de atividade hipno-sedativa	80
- Tempo de sono induzido por barbitúrico	80
4.4.5. Teste de atividade antidepressiva	80
- Teste da natação forçada	80
4.5. EFEITO DE SF ₃₋₅ SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE CAMUNDONGOS	81
4.5.1. Avaliação do efeito pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos	82
4.5.2. Avaliação da influência da fluoxetina sobre o efeito pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos	83
4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE SF ₃₋₅ <i>IN VITRO</i>	84
4.6.1. Estudo do efeito de SF ₃₋₅ na junção neuromuscular autonômica de canal deferente de camundongos	84
4.6.2. Estudo do efeito de SF ₃₋₅ no corpo cavernoso de coelhos	85
4.6.3. Estudo do efeito de SF ₃₋₅ no corpo cavernoso de humanos	87
5. RESULTADOS	88
5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SF ₃₋₅	88
- Determinação da CL ₅₀ em cistos de <i>Artemia sp.</i>	88
- Determinação da DL ₅₀ em camundongos	88
5.2. EFEITO DE SF ₃₋₅ NO COMPORTAMENTO GERAL DE CAMUNDONGOS	100
5.2.1. Teste de coordenação motora	89
- Teste do “Rota-rod”	89
5.2.2. Teste de atividade exploratória	90

- Teste do campo aberto – “ <i>open-field</i> ”	90
5.2.3. Teste de atividade ansiolítica/ansiogênica	91
- Teste da placa perfurada – “ <i>hole-board</i> ”	91
- Teste do labirinto em cruz elevado – “ <i>plus-maze</i> ”	92
5.2.4. Teste de atividade hipno-sedativa	94
- Tempo de sono induzido por barbitúrico	94
5.2.5. Teste de atividade antidepressiva	95
- Teste da natação forçada	95
5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SF ₃₋₅ SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE CAMUNDONGOS	96
5.3.1. Avaliação do efeito pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos	96
5.3.2. Avaliação do efeito da fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF ₃₋₅ em camundongos	106
5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE SF ₃₋₅ <i>IN VITRO</i>	109
5.4.1. Efeito de SF ₃₋₅ na junção neuromuscular autonômica de canal deferente de camundongos	109
5.4.2. Efeito de SF ₃₋₅ no corpo cavernoso de coelhos	112
5.4.2.1. Efeito sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (ECE)	112
5.4.2.2. Efeito sobre a contração induzida por Fenilefrina 10 µM	113
5.4.2.3. Efeito sobre a contração induzida por K ⁺ 60 mM	124
5.4.2.4. Efeito sobre a contração induzida por PGF _{2α} 10 ⁻³ M	125
5.5. Efeito sobre a contração do corpo cavernoso humano induzida por Fenilefrina 10 µM.	127
6. DISCUSSÃO	129
7. CONCLUSÕES	151
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
9. ANEXOS	177

1 Introdução

1.1. DISFUNÇÃO ERÉTIL

O termo disfunção erétil (DE) é comumente utilizado para definir a incapacidade masculina de obter e manter a ereção do pênis por tempo suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório, sendo distintamente diferente de perda da libido, ejaculação precoce ou ausência de orgasmo (NIH, 1993). Estima-se que a DE afete entre 20 e 30 milhões de homens nos Estados Unidos (LUE, 2000).

O primeiro e mais extenso estudo epidemiológico sobre o comportamento sexual masculino nos Estados Unidos foi conduzido por Kinsey e publicado em 1948, os autores entrevistaram cerca de 15.781 homens, entre 10 e 80 anos, de uma amostra representativa da população geral estratificada por idade, instrução, atividade e domicílio, concluindo que, cerca de 1 % dos homens abaixo dos 19 anos, 3 % dos até 45 anos, 6,7 % dos entre 45 e 55 anos e em 25 % até a idade de 75 anos, admitiam a ocorrência da DE (KINSEY ET AL., 2003).

Esse estudo, conduzido há mais de cinquenta anos, num contexto médico - social diferente dos dias atuais, continua sendo a fonte mais extensa de dados normativos com base populacional sobre o comportamento sexual dos homens americanos, representando um marco histórico e um ponto inicial para os dados epidemiológicos sobre a prevalência da DE na população geral (LOPES, 2000).

O maior estudo já realizado chamado "*Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES)*", publicado em 2004 no *Current Medical and Research Opinion* mostra que 16% da população masculina com idade entre 20 e 75 anos já apresentaram DE (ROSEN ET AL., 2004). Os resultados são consistentes com outras pesquisas que estimam que algum grau de DE afeta mais da metade dos homens com

40 anos, e que a estimativa mundial é de 152 milhões de homens sofrendo desta condição, além da antecipação de que em 2025 existirão 322 milhões de homens apresentando DE (FELDMAN ET AL., 1994; JARDIN ET AL., 2000).

No Brasil, uma pesquisa realizada por Moreira et al. (2001) mostrou que 18% da população masculina com idade entre 40 e 70 anos apresenta algum grau de DE. No entanto somente 16 % dos homens com DE moderada ou grave estão sendo tratados, apesar da maioria dos pacientes dizer que tentaria o tratamento se fossem portadores de DE (MOREIRA ET AL., 2002).

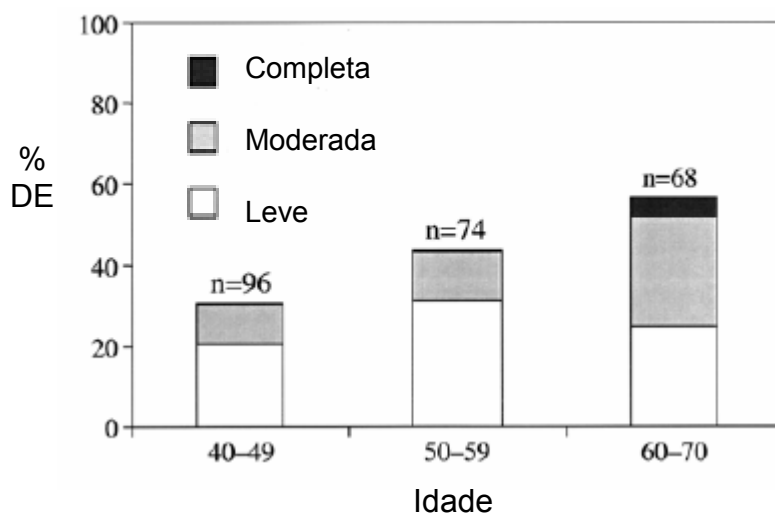


Figura 1. Incidência da disfunção erétil por faixa etária, Bahia, Brasil. Modificada de Moreira et al., 2002.

A DE pode ser classificada como psicogênica, orgânica (neurogênica, hormonal, arterial, cavernosa ou droga-induzida) ou pode ser psicogênica e orgânica (LUE, 2000). Apesar de até 30 anos atrás a DE ser considerada como primariamente uma desordem psicológica, hoje é considerado que a maioria dos homens acometidos exibe uma etiologia orgânica subjacente (THOMAS, 2002).

A despeito da prevalência, dos custos e das implicações da DE para a qualidade de vida, faltam dados normativos atuais em população saudável, especialmente no

contexto de variáveis psicológicas e psicossociais (QUINN ET AL.,1990). Além do envelhecimento outros fatores de risco estão associados como patologias crônicas, medicamentos e tabagismo (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação e causas mais comuns da disfunção erétil.

Categoria	Desordens comuns	Fisiopatologia
Psicogênica	Ansiedade de performance Problemas de relacionamento Estresse psicológico Depressão	Perda da libido, superinibição ou impedimento da liberação de NO
Neurogênica	AVC ou doença de Alzheimer Lesão medular Cirurgia pélvica radical Neuropatia diabética Lesão pélvica	Falência ao iniciar o impulso nervoso ou transmissão neural interrompida
Hormonal	Hipogonadismo Hiperprolactinemia	Perda da libido e liberação inadequada de NO
Vasculogênica (arterial cavernosa)	Arteriosclerose / Hipertensão Diabetes mellitus Trauma Doença de Peyronie	Fluxo arterial inadequado ou venooclusão dificultada
Droga-induzida	Anti-hipertensivos Antidepressivos Antiandrogênicos Abuso de álcool Tabagismo	Supressão central Diminuição da libido Neuropatia alcoólica Insuficiência vascular
Envelhecimento e outras patologias	Idade avançada Diabetes mellitus Falência renal crônica Coronariopatias	Usualmente é multifatorial, resultando em disfunção neural e vascular.

LUE, 2000

Com o avanço no conhecimento da fisiologia da ereção peniana, dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e do desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, houve um maior interesse pelo estudo da DE, observando-se atualmente que tanto os homens como as suas parceiras e médicos vêm se sentindo cada vez mais

liberais para discutir sobre a enfermidade e seu tratamento (GUAY, 1995). Apesar disso, a DE é ainda um assunto pouco discutido, mesmo no âmbito médico geral, pois na avaliação clínica diária, muitos médicos não sabem como abordá-la e, quando o paciente ganha coragem para perguntar sobre questões concernentes a sua etiologia, principais fatores de risco e tratamentos disponíveis, é importante que os profissionais envolvidos estejam preparados para enfrentar o problema (LOPES, 2000).

Muitos agentes terapêuticos, particularmente aqueles que alteram a atividade neurotransmissora (agonistas e antagonistas) estão associados à DE (THOMAS, 2002). O uso de fármacos pode constituir 25 % das causas (KEENE & DAVIES, 1999). O mecanismo pode ser neural, endócrino e algumas vezes simplesmente desconhecido. Talvez ocorra com mais frequência em pacientes que utilizam medicamentos anti-hipertensivos, principalmente os β -bloqueadores e os diuréticos tiazídicos (THOMAS, 2002).

De forma paradoxal, inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) podem estar associados à DE (KEENE & DAVIES, 1999), ainda que alguns destes agentes sejam utilizados para o tratamento da ejaculação precoce.

1.1.1. Anatomia do pênis e mecanismos envolvidos no início e manutenção da ereção

A ereção peniana é um evento hemodinâmico onde fatores centrais (cerebral e medular) e locais (músculo liso e endotélio) estão integrados de maneira complexa envolvendo um delicado equilíbrio entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores (ANDERSSON & WAGNER, 1995; AZADZOI ET AL., 1995).

A atividade contrátil do músculo cavernoso (arterial e trabecular) é regulada por diversos fatores: níveis adequados de agonistas (neurotransmissores, hormônios e substâncias derivadas do endotélio), expressão adequada de receptores, integridade dos mecanismos de transdução, homeostase do cálcio, interação entre proteínas

contráteis e a comunicação intracelular efetiva entre as células do músculo liso (CHRIST ET AL., 1995).

Anatomia

O pênis consiste de dois corpos cavernosos dorso-laterais unidos um ao outro e ao corpo esponjoso que circunda a uretra. Os três corpos unidos pela fáscia de Buck. A porção proximal de cada corpo cavernoso é cercada pelos músculos isquiocavernoso e bulboesponjoso (SOBOTTA, 1990). Cada corpo contém conjuntos de músculo liso, fibras elásticas, colágeno e tecido fibroso que juntos formam a trabécula. O pênis possui fluxo arterial através das artérias pudendas internas, que se ramificam para formar as artérias profundas (cavernosas) que percorrem todo o comprimento do corpo cavernoso, terminado em ramificações chamadas artérias helicinas que fornecem sangue aos sinusóides (Figura 2).

A artéria dorsal, veia dorsal profunda e nervo dorsal formam o conjunto neurovascular do pênis. A veia dorsal profunda drena os tecidos eréteis. A inervação peniana é proveniente da raiz dorsal parassimpática sacral (ereção) e raízes dorsais simpáticas tóraco-lombares (relaxamento e ejaculação) (DAIL ET AL., 1989; DE GROAT & BOOTH, 1993).

Fisiologia da ereção

A ereção (tumescência) ocorre quando os sentidos especiais (visão, audição, tato, paladar e olfato) são estimulados e quando a imaginação/fantasia ativa regiões especializadas do tálamo e hipotálamo (MOURAS, 2004). Estas áreas regulam o músculo liso sinusoidal do corpo cavernoso através dos sistemas simpático e parassimpático (KORENMAN, 1998).

Dependendo do contexto particular no qual a ereção peniana ocorre, diferentes mecanismos centrais, periféricos e/ou endócrinos podem participar na sua regulação, muitas vezes de maneira muito complexa (ARGIOLAS & MELIS, 1995). Mesmo com o recente progresso no tratamento farmacológico da DE, ainda existe pouco

entendimento em relação ao controle central (medular e supramedular) da ereção peniana (RAMPIN & GIULIANO, 2001). O papel dos neurotransmissores clássicos (NA, Ach) no controle da ereção peniana já foi extensamente estudado (BENSON ET AL., 1980; DE GROAT, 1988; SACHS ET AL., 1982; SAÉNZ DE TEJADA ET AL., 1988; STEERS, 1990).

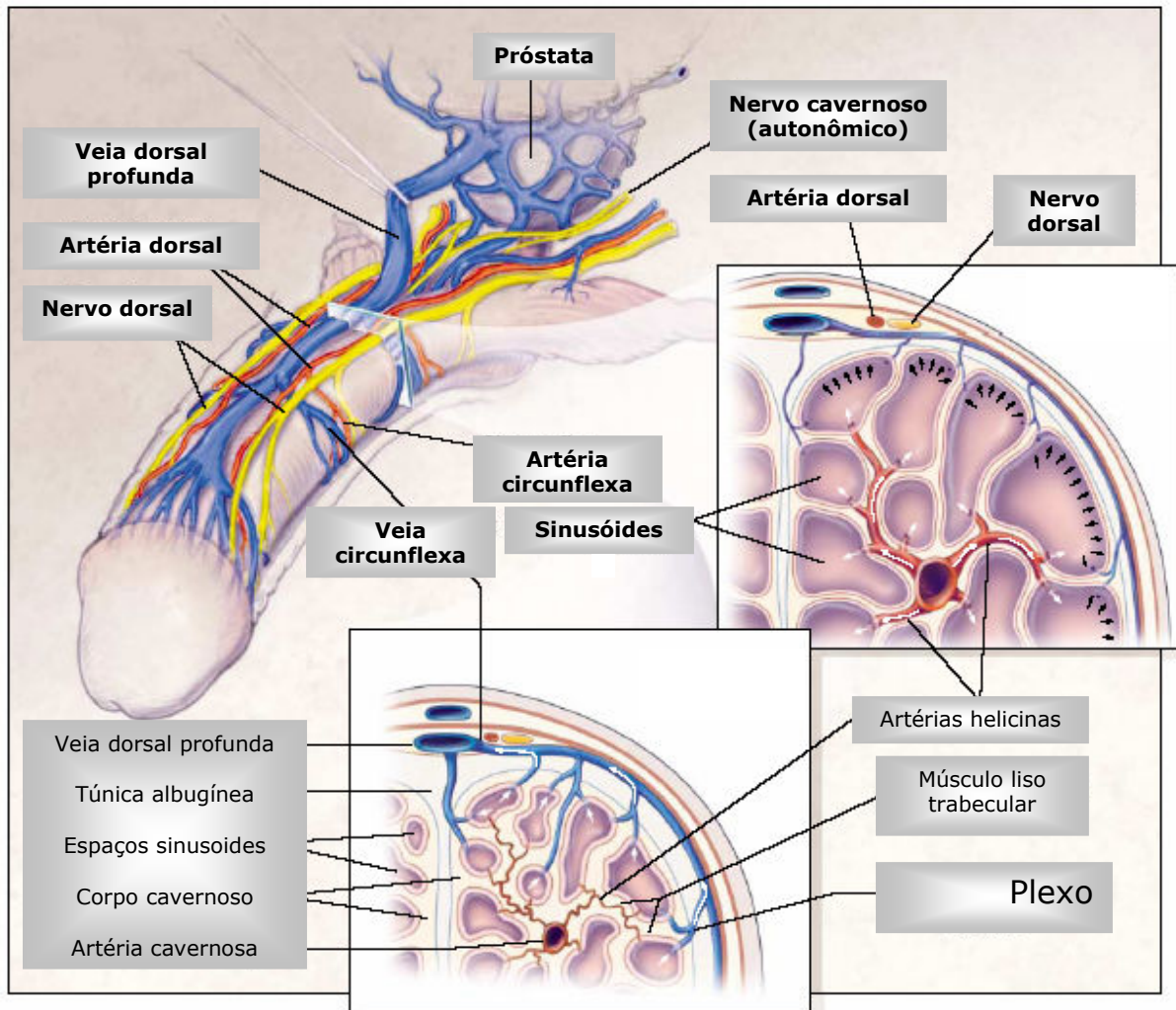


Figura 2. Anatomia do pênis. Os nervos cavernosos percorrem a parte pótero-lateral da próstata, entram nos corpos cavernoso e esponjoso para regular o fluxo sangüíneo durante a ereção e detumescência. Os nervos dorsais (somáticos), que são ramificações dos nervos pudendos, são responsáveis primariamente pela sensação peniana. Durante a ereção, o relaxamento do músculo liso trabecular e a vasodilatação arteriolar resultam em aumento do fluxo sangüíneo, expandindo os sinusóides (aumentando o comprimento) e alargando o pênis. A expansão dos sinusóides comprime o plexo venular subtúnica contra a túnica albugínea. Além disso, a compressão da túnica comprime as veias emissárias, reduzindo o efluxo de sangue ao mínimo. No estado flácido, o influxo através das artérias helicinas contraídas é mínimo e há efluxo livre através plexo venular subtúnica. (Modificada de Lue, 2000).

1.1.2. Neurotransmissores e neuropeptídios que controlam a ereção peniana

Noradrenalina

A presença e distribuição das fibras noradrenérgicas na vasculatura peniana (artérias e veias) e músculo cavernoso foi descrita em vários estudos (BENSON ET AL., 1980). Em particular, é comumente aceito que em condições normais a NA liberada das terminações nervosas simpáticas atua nos receptores α_2 pós-sinápticos para manter o corpo cavernoso e as artérias helicinas contraídas, mantendo o mínimo fluxo sanguíneo para o corpo cavernoso. Utilizando-se agonistas e antagonistas adrenérgicos específicos, foi identificada a presença de receptores α_1 e α_2 na vasculatura peniana e tecidos cavernosos de várias espécies animais, inclusive no homem.

Os receptores α_1 estão localizados na membrana pós-sináptica e são responsáveis pelo efeito contrátil da NA nestes tecidos, já os receptores α_2 estão localizados na membrana pré-sináptica nas terminações nervosas noradrenérgicas e inibem a função noradrenérgica. Estudos com radioligantes mostraram a presença de receptores adrenérgicos β , provavelmente β_2 “atípicos” (DHABUWALA ET AL., 1985).

O corpo cavernoso humano possui receptores adrenérgicos β_3 localizados primariamente nas células do músculo liso. A ativação seletiva destes receptores leva a um aumento dos níveis teciduais de GMPc, resultando em vasorelaxamento independente do NO. Estes dados podem abrir caminho a um melhor entendimento não somente da fisiologia e fisiopatologia da função erétil, mas também para um novo alvo terapêutico da DE (CIRINO, 2003).

As alterações do tônus noradrenérgico constituem um dos principais mecanismos que influenciam a atividade do músculo liso cavernoso e a vasculatura peniana. Antagonistas $\alpha_{1,2}$, mas não antagonistas seletivos α_2 ou drogas que possuem atividade antiadrenérgica induzem a tumescência e muitas vezes a ereção completa em animais de laboratório e em homens, quando injetadas no corpo cavernoso. Os

agonistas α_1 causam detumescência e os agonistas β são ineficazes (BLUM ET AL., 1985; BRINDLEY, 1986; ANDERSSON ET AL., 1991; ANDERSSON & PERSSON, 1993).

Tabela 2. Neurotransmissores e neuropeptídeos que influenciam a ereção peniana através do Sistema Nervoso Central.

Composto	Efeito		Área cerebral envolvida
	Ereção	Reflexo peniano	
Dopamina	Facilitação	Facilitação	PVN, MPOA
Serotonina	Inibição/Facilitação ^a	Inibição	SpC, MPOA
Aminoácidos excitatórios	Facilitação	ND	PVN
GABA	Inibição	Inibição	PVN, SpC
NO	Facilitação	ND	PVN, MPOA
Ach	Facilitação	ND	Hipocampo
NA	Inibição	ND	Hipotálamo
Ocitocina	Facilitação	ND	PVN, SpC, Hipocampo
ACTH/MSH	Facilitação	ND	APVH
Peptídeos opióides	Inibição	ND	PVN, MPOA
Endocanabinóides	Inibição ^a	ND	PVN

^a Depende do subtipo de receptor envolvido; ND : não disponível; PVN : núcleo para ventricular; MPOA : área pré-óptica medial; SpC : medula espinhal; APVH : área hipotalâmica periventricular (ARGIOLAS & MELIS, 2005).

Acetilcolina

Estudos neuroanatômicos e neurofisiológicos em animais e humanos mostraram que o relaxamento do músculo liso peniano está sob controle dos nervos parassimpáticos colinérgicos (STEERS, 1990).

Várias investigações evidenciaram que, *in vitro*, a acetilcolina (Ach) e o carbacol relaxam os músculos esponjosos e cavernosos quando estes estão pré-contraídos com NA e este efeito é revertido por agentes bloqueadores muscarínicos como a atropina e escopolamina (SAÉNZ DE TEJADA ET AL., 1988).

O papel exato da Ach no relaxamento da musculatura cavernosa ainda está em debate. Isto é devido, não somente aos resultados conflitantes encontrados por diversos pesquisadores, mas também aos achados que vão de encontro ao papel colinérgico. Entre estes, está o fato de que a atropina não bloqueia a ereção peniana, mesmo quando injetada diretamente no corpo cavernoso de animais e homens (ARGIOLAS & MELIS, 1995).

Contudo a descoberta de que a Ach e agonistas muscarínicos induzem o relaxamento do músculo liso peniano na presença do endotélio intacto, mas não quando este é removido (FURCHGOTT, 1983) ajudou a entender, pelo menos em parte, o mecanismo de sua ação relaxante do músculo cavernoso peniano.

Em geral, aceita-se atualmente que a Ach pode influenciar o relaxamento desse músculo liso sem atuar diretamente, através de pelo menos três mecanismos:

1. A Ach liberada dos nervos pélvicos poderia inibir pré- e pós-juncionalmente a atividade dos nervos noradrenérgicos, como ocorre em outros tecidos (coração, coronárias e corpos esponjoso) (HEDLUND & ANDERSSON, 1985);
2. A Ach poderia liberar um fator relaxante não-colinérgico, a partir de nervos NANC pélvico-cavernosos;
3. A Ach poderia liberar do endotélio um fator relaxante que atua diretamente no músculo liso revertendo a contração induzida pela NA.

Apesar destas conclusões serem corroboradas por vários estudos (HOLMQUIST ET AL., 1992), o papel exato da Ach e dos receptores muscarínicos na ereção peniana, especialmente no homem, ainda não está completamente esclarecido.

Óxido nítrico

Em 1990, Ignarro et al. mostraram que N^G-nitro-L-arginina (L-NA), N^G-amino-L-arginina, inibidores da NO sintase (NOS), oxihemoglobina (varredor de NO) e o azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel) aboliam o relaxamento induzido pela estimulação elétrica do corpo cavernoso isolado de coelhos e que o efeito dos inibidores da NO era revertido pela L-arginina. Foi proposto que a ereção peniana poderia ser mediada pelo NO gerado nos nervos NANC.

A susceptibilidade da resposta neurogênica ao azul de metileno sugere que o relaxamento pode ser mediado pelo GMPc no músculo liso cavernoso. A administração exógena de NO ou de seus doadores promove o relaxamento do músculo liso cavernoso e este relaxamento não foi influenciado por inibidores da NOS, mas suprimido pela oxihemoglobina e pelo azul de metileno (BUSCH ET AL., 1992a; KIRKEBY ET AL., 1993). Achados similares foram encontrados em homens, macacos, cachorros, coelhos e ratos (TODA ET AL., 2005).

Estudos histoquímicos dão suporte a idéia de que o NO atua como neurotransmissor nos nervos NANC inibitórios que inervam o músculo liso do corpo cavernoso (TODA ET AL., 2005).

A evidência para a liberação do NO a partir de neurônios inibitórios foi mostrada em corpo cavernoso de coelhos pelo método da quimioluminescência (BUSCH ET AL., 1992b) e em humanos utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (WIKLUND ET AL., 1993).

Em estudos com camundongos que não possuíam NOS neuronal (NOSn) e NOS endotelial (NOSe), o aumento da pressão intracavernosa induzida pela estimulação do nervo cavernoso foi atenuado nos animais NOSn^{-/-}, mas não nos animais NOSe^{-/-} e a resposta foi atenuada pelo tratamento com L-NAME, sugerindo a contribuição da NOSn na ereção peniana (CASHEN ET AL., 2002).

Uma isoforma citosólica da NOS constitutiva similar a encontrada no tecido neuronal cerebral foi detectada em corpo cavernoso de coelhos (BUSCH ET AL., 1995b). Como a NOS está primariamente ligada à membrana (FORSTERMANN ET AL., 1991), deve-se considerar a origem neuronal como uma importante fonte de NO. Tecidos penianos obtidos de homens portadores de DE não expressam a NOS μ , uma variante da NOSn (LIN ET AL., 1998).

Potenciais de ação neuronais abrem os canais de Na⁺-sensíveis a tetrodotoxina nos terminais nitrérgicos e promovem o influxo de Ca⁺⁺ possivelmente através de canais do tipo N nos vasos sangüíneos (TODA ET AL., 1995). Parece ocorrer o mesmo no corpo cavernoso, porque o relaxamento promovido pela estimulação do nervo cavernoso de coelhos e cachorros foi sensível à ω -conotoxina GV1A, um bloqueador dos canais de Ca⁺⁺ tipo N (OKAMURA ET AL., 2001).

O aumento do Ca⁺⁺ citosólico participa da ativação da NOSn na presença da calmodulina (BREDT & SNYDER, 1990). A liberação neuronal ou a síntese de NO parece ser dependente da biodisponibilidade do Ca⁺⁺ no corpo cavernoso de coelhos (SAITO ET AL., 1996).

Archer (2002) propôs que o NO neurogênico estimula a guanilato ciclase solúvel com conseqüente produção de GMPc que ativa a proteína cinase dependente de GMPc no músculo liso do corpo cavernoso. Esta proteína cinase fosforila uma variedade de canais iônicos e bombas, promovendo uma redução do Ca⁺² citosólico, causando o relaxamento (TODA ET AL., 2005).

A ativação de canais de K⁺ sensíveis ao Ca⁺² de alta condutância e a hiperpolarização da membrana também podem estar envolvidos. Camundongos deficientes da proteína cinase 1 dependente de GMPc possuem baixa habilidade de reprodução e seus corpos cavernosos não relaxam com a ativação da cascata sinalizadora NO-GMPc, sugerindo que esta cinase 1 é um alvo do GMPc nos tecidos eréteis (HEDLUND ET AL., 2000).

Existem evidências mostrando a interação nitrérgica-adrenérgica na ereção peniana (ADAIKAN, 2000). De acordo com Cellek e Moncada (1997), a contração noradrenérgica do corpo cavernoso humano e de coelhos induzida por estímulo elétrico não ocorre até o término da estimulação. Quando há o aumento do tônus, o relaxamento mediado pelo NO durante a estimulação elétrica e a contração ocorrem somente após a estimulação (TODA ET AL., 2005).

Os achados evidenciam que a inervação nitrérgica não somente modula, mas controla a resposta simpática. Parece haver um antagonismo fisiológico no músculo liso cavernoso inervado pelos sistemas nitrérgico e adrenérgico (CELLEK, 2000).

Existe um consenso de que a presença de NO é uma condição necessária para a geração e manutenção do incremento da pressão intracavernosa e ereção peniana (TODA ET AL., 2005). Inicialmente acreditava-se que o NO liberado dos nervos inibitórios NANC era um contribuinte primário para estas ações (IGNARRO ET AL., 1990). Estudos recentes sugerem que o NO derivado do endotélio também está envolvido na regulação da função erétil.

No entanto, existem evidências que vão de encontro a hipótese de que o NO liberado pelos neurônios e o NO derivado do endotélio participam da ereção (HAYASHIDA ET AL., 1996; AYAJIKI ET AL., 1997; OKAMURA ET AL., 1998, 1999).

- Óxido nítrico e antagonistas dos receptores adrenérgicos α

A ativação dos neurônios noradrenérgicos com estimulação dos adrenoceptores, principalmente dos subtipos α_1 , pela NA endógena, induz a contração do músculo liso cavernoso e é neutralizada pelo relaxamento nitrérgico do corpo cavernoso e resulta na ereção peniana (TODA ET AL., 2005).

Contudo, as influências adrenérgicas parecem ser mascaradas durante a intensa ativação do nervo nitrérgico (CELLEK & MONCADA, 1997). Angulo et al. (2001)

demonstraram que a interação entre o bloqueio dos receptores α pela fentolamina e a potenciação da via NO/GMPc pela L-arginina ou sildenafil aumenta o relaxamento do músculo liso trabecular no corpo cavernoso de coelho e sugere que a combinação destas drogas poderia representar uma vantagem terapêutica no tratamento da DE.

Foi postulado que a inibição do tônus noradrenérgico excessivo com antagonistas adrenérgicos apropriados, como a fentolamina, poderia contribuir para o início da ereção farmacológica (ADAIKAN, 2000).

Os resultados que indicam que a fentolamina relaxa o corpo cavernoso de homens e coelhos quando estes foram contraídos com agonistas adrenérgicos e com drogas contráteis não adrenérgicas como a endotelina e o K^+ e que a destruição mecânica do endotélio diminui o seu efeito (TRAISH ET AL., 1998) sugerem o envolvimento de mecanismo mediado por NO no relaxamento do músculo cavernoso induzido pelo antagonismo dos receptores noradrenérgicos α .

A ioimbina (YOH), um antagonista noradrenérgico α_2 seletivo, tem mostrado ser efetiva em pacientes com DE orgânica (REID ET AL., 1987), porém outros estudos indicam diferenças insignificantes entre a efetividade da YOH e placebo na impotência de origem psicogênica (MORALES ET AL., 1987) De acordo com Tam et al. (2001), poucos estudos bem direcionados sobre o efeito terapêutico da YOH foram completados. Destes estudos, concluiu-se que a monoterapia com YOH possui eficácia modesta nos pacientes com DE, e o seu uso potencial seria mais provável se combinado com drogas que estimulam a via NO.

Um estudo mostrou que a combinação YOH/L-arginina foi efetiva em pacientes com DE leve e moderada (LEBRET ET AL., 2002). Desde que a inibição pré-sináptica pela ativação de adrenoceptores α_2 de neurônios nitrérgicos foi observada em corpo cavernoso de coelhos (ÂNGULO ET AL., 2001), a remoção da função deste receptor pela YOH pode estar envolvida no melhoramento do relaxamento do corpo cavernoso e na ereção peniana mediados pelo NO.

Fillippi et al. (2002) mostraram que a YOH promove, de forma NO dependente, o relaxamento endotélio-dependente do corpo cavernoso isolado de homens e coelhos e que em modelo de hipogonadismo experimental em coelhos, o efeito relaxante da YOH foi diminuído, mas restaurado pela suplementação androgênica.

Este mecanismo endotélio- e androgênico-dependente pode justificar a ausência de eficácia da YOH no tratamento de alguma formas de DE orgânica. Acredita-se também que a YOH atua no sistema nervoso central (MAGGI ET AL., 2000; ANDERSSON & STIEF, 2001a).

Dopamina

Os receptores dopaminérgicos estão divididos em D1 e D2 (HEATON, 2000). Os subtipos adicionais incluem o D5, que é similar ao D1, e D3 e D4, que são similares ao D2. Eles são típicos receptores transmembrana acoplados à proteína G (SOKOLOFF & SCHWARTZ, 1995).

Os receptores D1 estimulam a atividade da adenilato ciclase (proteína G_s) enquanto que os receptores D2 inibem (proteína G_i) além de aumentar a condutância do K^+ , inibir a entrada de Ca^{++} através dos canais voltagem-dependentes e modular o fosfato de inositol (HEATON, 2000). Em geral, os receptores para dopamina (principalmente D2) podem ativar múltiplas vias.

Os receptores dopaminérgicos estão distribuídos de maneira similar nos cérebros de vários mamíferos, com alta densidade de D1 e D2 ($D1 > D2$), particularmente nos núcleos da base (HEATON, 2000). No corpo estriado, os receptores D1 são exclusivamente pós-sinápticos, enquanto que os D2 ocorrem de forma pré- e pós-sináptica (SAM, 1997).

Os receptores D2 parecem ser responsáveis pela maioria dos efeitos comportamentais da dopamina enquanto que o papel fisiológico do D1 é pouco

definido; além disso, existem evidências sugerindo que os papéis funcionais destes receptores podem estar interligados (SAM, 1997).

Os receptores D1 e D2 pós-sinápticos estão envolvidos no comportamento estereotipado, enquanto a ativação seletiva de D2 podem promover a hipomotilidade e a ereção peniana (HEATON, 2000).

O papel no sistema nervoso central (SNC) exercido pela dopamina no controle da ereção peniana e comportamento sexual já foi claramente demonstrado (GIULIANO & ALLARD, 2001). Os núcleos hipotalâmicos como a área pré-óptica medial (MPOA) e o núcleo paraventricular (PVN) são os principais alvos dos neurônios dopaminérgicos (RAMPIN & GIULIANO, 2001).

Os receptores D1 e D2 contribuem para a copulação (incluindo a emissão, ereção e ejaculação). O receptor D2 parece ser o subtipo de receptor com maior envolvimento no controle central da ereção peniana e na facilitação dos reflexos penianos (GIULIANO & ALLARD, 2001).

A neurotransmissão dopaminérgica na MPOA regula a copulação e a ereção. A dopamina é liberada na MPOA dos ratos machos na presença da fêmea e ela facilita o comportamento sexual masculino. Em ratos castrados, as concentrações basais de dopamina diminuem e não há aumento na MPOA na presença de fêmeas (DU ET AL., 1998).

Em contraste, a injeção sistêmica de anfetamina estimula uma maior liberação de dopamina nos animais castrados, sugerindo que a castração não altera a síntese, mas a liberação de dopamina. A castração não afeta o número de neurônios dopaminérgicos nem a inervação dopaminérgica na MPOA, mas causa um decréscimo significativo dos neurônios nitrérgicos. É sugerido que a testosterona pode ativar a produção de NO na MPOA e que isto facilitaria a liberação local de dopamina.

- Dopamina e noradrenalina

Nos mamíferos, um dos alvos da dopamina é a área pré-óptica (POA), onde facilita o comportamento sexual masculino (CORNIL ET AL., 2002). Na MPOA existe um grupo de células que expressam a enzima aromatase (FOIDART ET AL., 1995), que catalisa a transformação da testosterona em estradiol, um passo crítico na ativação do comportamento masculino (BALTHAZART & BALL, 1998b).

A MPOA recebe descargas de várias áreas dopaminérgicas e adrenérgicas (BALTHAZART & ABSIL, 1997), além da presença de fibras contendo tirosina hidroxilase estarem em íntima associação com as células que contêm a aromatase (BALTHAZART & BALL, 1998a) sugerindo interações funcionais.

Estudos *in vitro* indicam que a dopamina pode afetar rapidamente a atividade da aromatase na POA (BALTHAZART, 2002). Por isto, existe a hipótese de que a dopamina afeta o comportamento sexual masculino, em parte, através do controle da atividade da aromatase (ABSIL ET AL., 2001).

Foi demonstrado que a dopamina atua sobre a atividade elétrica da maioria dos neurônios da POA. A dopamina hiperpolariza a maioria destes neurônios. Experimentos farmacológicos suprem a evidência de que estes efeitos não são mediados pela interação da dopamina com receptores dopaminérgicos e sim pela ativação de receptores noradrenérgicos α_2 (inibição) ou α_1 (excitação) (CORNIL ET AL., 2002). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que indicam que os efeitos centrais da dopamina são parcialmente mediados pelos receptores noradrenérgicos (MALENKA & NICOLL, 1986).

O fato de existir uma alta densidade de receptores α_2 na MPOA de certos animais pode ajudar a explicar como a dopamina afeta o comportamento sexual masculino mesmo existindo baixa quantidade de receptores dopaminérgicos na POA (CORNIL ET AL., 2002). É sugerido também que, em desordens como a esquizofrenia,

pode ocorrer uma estimulação excessiva dos receptores noradrenérgicos pela dopamina (MEYER-LINDENBERG ET AL., 2002).

Existem vários fatores que convergem para evidência indicativa de que uma porção substancial dos efeitos da dopamina na POA (especialmente os inibitórios) é mediada pela ativação de receptores noradrenérgicos α e um deles é o fato de que a excitação/inibição induzida pela dopamina não é bloqueada por antagonistas seletivos dos receptores dopaminérgicos porém é suprimida por antagonistas seletivos dos receptores α e além disso os inibidores da dopamina- β -hidroxilase não bloqueiam os efeitos da dopamina, indicando interação com os receptores noradrenérgicos. Em conjunto, estes dados sugerem que uma porcentagem significativa dos efeitos da dopamina na MPOA é mediada pela interação com receptores noradrenérgicos α (CORNIL ET AL., 2002). Porém estes dados não excluem as ações dopaminérgicas mediadas pelos receptores dopaminérgicos (MARKOWSKI ET AL., 1994).

Tabela 3. Neurotransmissores, neuropeptídeos e outros agentes que atuam localmente nos tecidos eréteis.

Composto	Efeito	
	Corpo cavernoso	Vasculatura peniana
NA	Contração	Contração
Ach	Relaxamento ^a	Relaxamento ^a
NO	Relaxamento	Relaxamento
VIP	Relaxamento	Relaxamento
NPY	ND	Contração
Endotelinas	Contração	Contração
PGE ₂ , PGF _{2α} , PGD, PGI ₂ , TXA ₂	Contração	ND
PGE ₁	Relaxamento	ND
Inibidores da PDE ₅	Relaxamento	Sem efeito
Ativadores da guanilato ciclase solúvel	Relaxamento	Relaxamento

^a O efeito relaxante da Ach nestes tecidos é indireto, isto é, mediado pela liberação de NO das células endoteliais. Na verdade, a Ach usualmente contrai todas as fibras musculares lisas estudadas através da ativação dos receptores muscarínicos. (ARGIOLAS & MELIS, 2005)

A relativa similaridade estrutural entre a NA e a dopamina poderia explicar a ligação das duas aminas aos dois tipos de receptores, pois se sabe que, periféricamente, o aumento das concentrações plasmáticas de dopamina ativa os receptores D1, β_1 e α_1/α_2 (OOI & COLUCCI, 2001). No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre esta interação ainda não está definido.

Peptídeo vasoativo intestinal (VIP)

Entre os peptídeos encontrados nos tecidos penianos, o VIP é certamente um dos quais está envolvido no mecanismo da ereção (ARGIOLAS, 1995). O VIP está localizado nas fibras neuronais do corpo cavernoso, nas paredes das artérias penianas e veias circunflexas (ANDERSSON ET AL., 1983). Este peptídeo promove vasodilatação de todos os leitos vasculares, incluindo artérias e veias penianas, e relaxamento do músculo liso, incluindo o corpo cavernoso (HELM ET AL., 1981).

No tecido cavernoso humano, o VIP é liberado pela estimulação do plexo pélvico (FAHRENKRUG & OTTESEN, 1982) e durante a ereção peniana induzida por estímulo visual ou por drogas administradas intracavernosamente (VIRAG ET AL., 1982), porém quando injetado no corpo cavernoso induz a tumescência, mas não a ereção completa (KIELY ET AL., 1989).

Contudo a ereção completa pode ser induzida pelo VIP quando injetado no corpo cavernoso juntamente com Ach (TAKAHASHI ET AL., 1992). Também já foi demonstrado que as concentrações de VIP são menores nos homens que apresentam impotência (GU ET AL., 1984). No entanto, não existem evidências de que a baixa concentração de VIP seja responsável pela DE.

Peptídeo histidina-isoleucina (PHI) e Peptídeo histidina-metionina (PHM)

PHI e PHM são dois peptídeos biologicamente ativos. Os dois são estruturalmente relacionados à família da secretina e glucagon (TATEMOTO & MUTT,

1981). Ambos os peptídeos possuem várias propriedades biológicas que são indistinguíveis daquelas do VIP, possivelmente porque existem 50% de homologia estrutural. No tecido peniano, PHI é encontrado nos mesmos neurônios pélvicos que contém VIP (YANGOU ET AL., 1985). PHI e PHM induzem efeitos indistinguíveis dos induzidos pelo VIP quando utilizados sozinhos (KIRKEBY ET AL., 1992a) ou quando combinados com VIP (KIRKEBY ET AL., 1992b).

Neuropeptídeo Y (NPY)

O NPY, assim como o VIP, pode ser encontrado no aparelho genital masculino e feminino de várias espécies animais (STIEF ET AL., 1991), incluindo o tecido peniano (KIRKEBY ET AL., 1991). Assim como o VIP coexiste com a Ach em alguns neurônios colinérgicos (HOKFELT ET AL., 1987), o NPY coexiste com a NA nos neurônios adrenérgicos, incluindo os do corpo cavernoso (YAJIMA ET AL., 1992), sugerindo um papel modulatório deste peptídeo sobre a transmissão noradrenérgica. O NPY é um potente vasoconstritor (LUNDBERG & TATEMOTO, 1982b), mas também pode inibir a liberação de NA atuando pré-sinápticamente (LUNDBERG & TATEMOTO, 1982a). Acredita-se que isso ocorra também nos neurônios simpáticos que inervam a genitália feminina e masculina, incluindo aqueles que inervam o corpo cavernoso, artérias e veias (ARGIOLAS & MELIS, 1995).

Endotelinas

As endotelinas são uma família de peptídeos que possuem potente efeito vasoconstritor (YANAGISAWA ET AL., 1988). Como está bem estabelecido que a liberação de NA mantém o músculo liso cavernoso contraído, passou-se a investigar o papel das endotelinas na modulação do tônus noradrenérgico, uma vez que esses peptídeos estão distribuídos pelo endotélio e possuem potente efeito vasoconstritor (ARGIOLAS & MELIS, 1995). Já foi demonstrado que as endotelinas contraem o corpo cavernoso humano, as artérias cavernosas penianas e a veia dorsal profunda e que este efeito foi prevenido pela Ach, VIP e doadores de NO (HOLMQUIST ET AL., 1990,

1992; SAÉNZ DE TEJADA ET AL., 1991). Estes resultados, *in vitro*, sugerem que as endotelinas podem exercer um papel no controle da ereção peniana.

Outros peptídeos

Numerosos outros peptídeos foram identificados no tecido peniano (ARGIOLAS & MELIS, 1995). Dentre eles a substância P (ANDERSSON ET AL., 1983), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (ALARANTA ET AL., 1991), encefalinas (ALM ET AL., 1981) e galanina (BAUER ET AL., 1986). A substância P relaxa o corpo cavernoso pré-contraído com NA (ANDERSSON ET AL., 1983) e este efeito é prevenido por inibidores da NOS (AZADZOI ET AL., 1992). Os outros peptídeos mencionados estão presentes em baixas quantidades e exercem efeito modesto nos tecidos penianos, apesar de serem bastante importantes em outros tecidos (ARGIOLAS & MELIS, 1995).

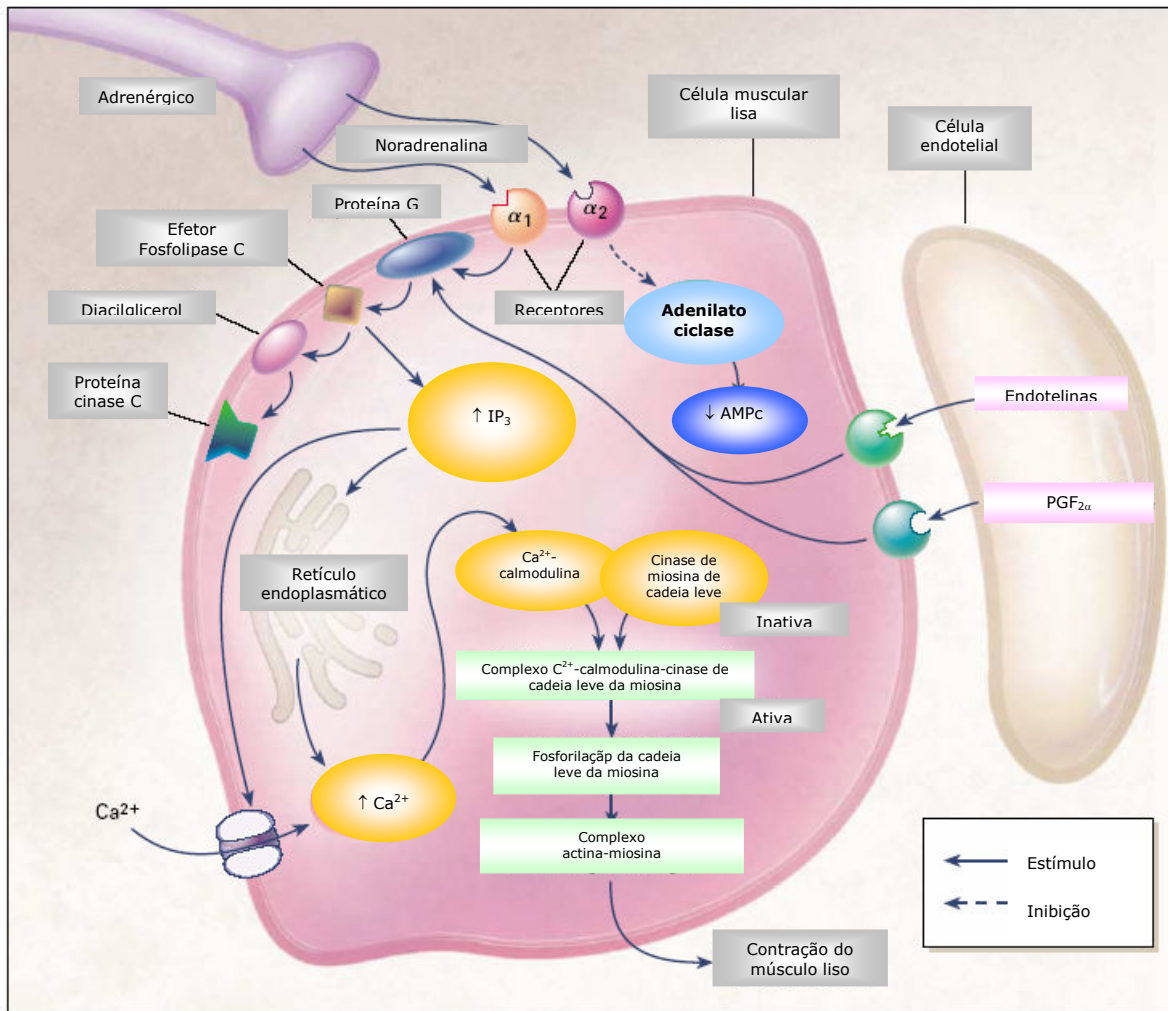


Figura 3. Mecanismo molecular da contração do músculo liso peniano. A noradrenalina, endotelinas e $\text{PGF}_{2\alpha}$ ativam receptores nas células do músculo liso e ocorre o início da cascata de reações que resulta na elevação dos níveis intracelulares de cálcio e contração do músculo liso. A proteína cinase C é um componente regulador da resposta contrátil independente de cálcio (Modificada de LUE, 2000).

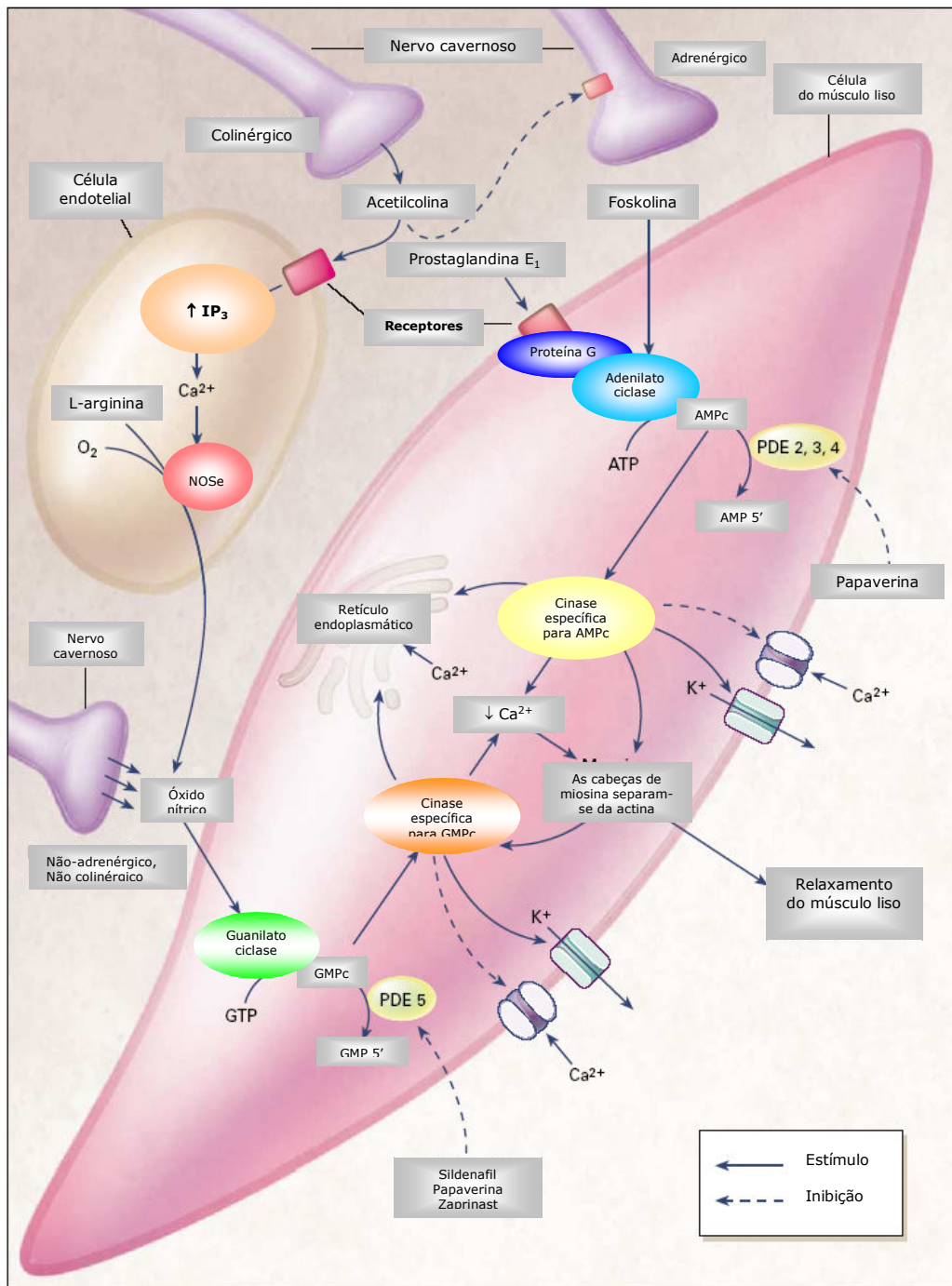


Figura 4. Mecanismo molecular do relaxamento do músculo liso peniano. O AMPc e GMPC ativam suas proteinases cinases específicas, com fosforilação de proteínas que abrem canais de K^+ , fecham canais de Ca^{+2} e sequestram o cálcio intracelular. A diminuição do Ca^{+2} intracelular leva ao relaxamento do músculo liso (Modificada de LUE, 2000).

1.2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL

A utilização de medicação oral para o tratamento da DE é um método relativamente novo (THOMAS, 2002). Até pouco mais de 10 anos, a disponibilidade de agentes orais seguros e eficazes era praticamente imprevisível (MORALES ET AL., 1998). Hoje esta terapia está largamente disponível e novos produtos estão nas fases finais de avaliação pré-venda. Inicialmente as drogas orais eram utilizadas empiricamente e a sua efetividade era limitada. Recentemente, através de descobertas fundamentais na fisiologia e farmacologia básica, pôde-se estabelecer o desenvolvimento de compostos seguros e úteis. Enquanto até o início dos anos 90 a testosterona poderia ser considerada a única droga com eficácia oral, no presente, os agentes orais são utilizados com sucesso. Apesar disto, sabe-se que a medicação oral nunca será efetiva em todos os casos onde os mecanismos fisiológicos da ereção peniana estão intactos ou moderadamente afetados por elementos locais ou sistêmicos.

Androgênios

Historicamente, os androgênios eram utilizados para melhorar a função sexual. Hoje, existem tratamentos mais eficazes disponíveis e a terapia com a testosterona deve ser desencorajada nos homens cuja DE não está associada ao hipogonadismo (LUE, 2000). Um estudo com 12 homens com função gonadal normal e que apresentavam DE, mostrou que a terapia androgênica parecia ativar o comportamento sexual sem melhorar a capacidade de ereção, e não apresentava efeito no humor e sintomas psicológicos (SCHIAVI ET AL., 1997).

Em homens com hipogonadismo, as preparações orais de testosterona são menos eficazes do que as formulações intramusculares e intradérmica (MORALES ET AL., 1994) e pode ocorrer hepatotoxicidade (causando colestase, hepatite e tumores benignos ou malignos). Atualmente existem duas preparações transdérmicas disponíveis. A aplicação diária aumenta as concentrações séricas de testosterona em mais de 90% dos homens. Os efeitos adversos mais comuns são irritação da pele e

dermatite de contato. Como a testosterona estimula o crescimento da próstata, a terapia androgênica é contra-indicada em homens com câncer de próstata ou obstrução da bexiga causada pela hipertrofia prostática (LUE, 2000).

Inibidores das fosfodiesterases

Os inibidores seletivos das fosfodiesterases (PDEs) ganharam notoriedade no tratamento da DE e são um importante marco da farmacologia contemporânea (STIEF ET AL., 2005). Os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc são sintetizados a partir dos seus nucleosídeos trifosfatos específicos pela adenilil ciclase e guanilil ciclase e são degradados pelas fosfodiesterases, um grupo heterogêneo de enzimas hidrolíticas.

O papel central das PDEs na regulação de tônus do músculo liso faz com que os inibidores das PDEs sejam um alvo atraente para o desenvolvimento de drogas. Como a distribuição e significância funcional das PDEs variam de acordo com o tecido, inibidores seletivos das isoenzimas podem exercer efeitos parcialmente específicos em tecido alvo. Atualmente, os inibidores das PDEs estão sendo investigados para o uso clínico como vasodilatadores inotrópicos, antiinflamatórios, antitrombóticos e antidepressivos (HALL, 1993; ROTELLA, 2002). Até o momento foram identificadas 11 famílias de isoenzimas: PDE₁ (estimulada pelo Ca⁺²/calmodulina), PDE₂ (estimulada pelo GMPc); PDE₃ (inibida pelo GMPc); PDE₄ (específica para AMPc), PDE₅ (específica para GMPc, Figura 5); PDE₆ (específica para o GMPc nos cones e bastonetes de mamíferos); PDE_{7,8} (específicas para AMPc), PDE₉ (específicas para GMPc) e PDE_{10,11} (AMPc/GMPc) (CONTI & JIN, 1999; SODERLING & BEAVO, 2000).

Mais recentemente, estudos com RNAm detectaram a presença de 14 diferentes isoenzimas no tecido cavernoso humano (KÜTHE ET AL., 2001):

- PDE_{1A,1b,1c}, PDE_{2A} e PDE_{10A} – hidrolisam AMPc e GMPc;
- PDE_{3A}, PDE_{4A-D}, PDE_{7A} e PDE_{8A} – específicas para AMPc;
- PDE_{5A} e PDE_{9A} – específicas para GMPc.

Estudos, *in vitro*, concluíram que o tônus do músculo liso cavernoso é regulado principalmente pelo GMPc e que a PDE₅ é a isoenzima predominante (BALLARD ET AL., 1998).

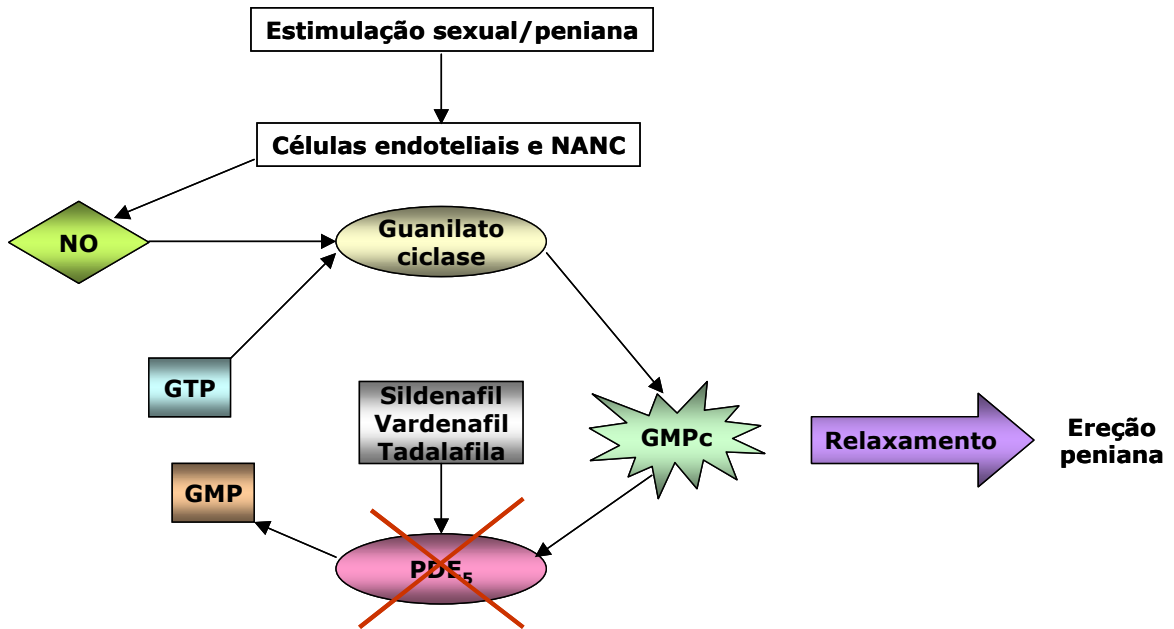


Figura 5. Mecanismo de ação dos inibidores da PDE₅.

O sildenafil (Viagra[®], Figura 6) foi introduzido no mercado farmacêutico norte-americano em 1998 e revolucionou o manejo farmacológico da DE. A eficácia desta droga foi avaliada em vários estudos randomizados e controlados por placebo envolvendo mais de 3000 homens com diferentes causas de impotência: psicogênica, não identificada, bem como pacientes com diabetes e história de lesão medular e cirurgia pélvica. Em todos os estudos, os homens que receberam o citrato de sildenafil relataram uma maior ocorrência de ereções suficientes para manter uma relação sexual satisfatória em relação aos grupos que receberam placebo (STIEF ET AL., 2005).

A dose oral recomendada é 50-100 mg aproximadamente 1 hora antes do ato sexual. O sildenafil é absorvido rapidamente e as concentrações plasmáticas máximas ocorrem em torno de 60 minutos após uma única dose. A sua meia-vida na circulação é

de 4 horas. Os efeitos adversos mais comuns são cefaléia (18%), rubor (11%), dispepsia (7%), congestão nasal (5%) e distúrbios visuais (2%) (SALYER, 2004). Estes efeitos ocorrem porque a PDE₅ não está presente somente no corpo cavernoso mas também em outros tecidos como leito vascular e trato gastrintestinal (KÜTHE ET AL., 2000). Como o sildenafil aumenta os níveis de GMPc, o produto subsequente da estimulação da via NO-guanilato ciclase, o seu uso é contra-indicado para pacientes que apresentem DE utilizando nitratos, pois o efeito vasodilatador pode ser potencializado, causando hipotensão grave (STIEF ET AL., 2005).

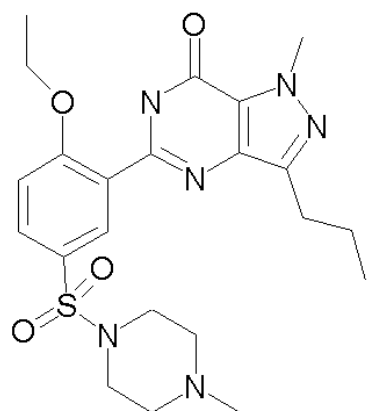
Foram relatados mais de 500 óbitos relacionados ao sildenafil, perfazendo uma taxa de 50 mortes para cada um milhão de prescrições (MITKA, 2000). O sildenafil possui efeito vasodilatador direto nas artérias coronárias normais e efeitos cardíacos diretos similares aos agentes antiarrítmicos classe III (GEELEN ET AL., 2000; ISHIKURA ET AL., 2000).

O vardenafil (Figura 6) é outro inibidor da PDE₅, comercialmente chamado de Levitra[®], sendo dez vezes mais potente do que o sildenafil (SAÉNZ DE TEJADA ET AL., 2001). O vardenafil é utilizado em doses únicas de 10 ou 20 mg, apresentando concentração plasmática máxima em 0,7 horas e 50% dos pacientes apresentam ereção 30 minutos após a ingestão (STIEF ET AL., 2005). Esta droga possui farmacocinética e efeitos adversos similares ao sildenafil (YOUNG ET AL., 2001; BISCHOFF ET AL., 2002). Os testes de segurança mostram que o vardenafil não afeta a habilidade dos pacientes com doença coronária e a combinação com nitroglicerina mostra alterações mínimas na frequência cardíaca e pressão arterial (MAZZU ET AL., 2001; THADANI & MAZZU, 2002).

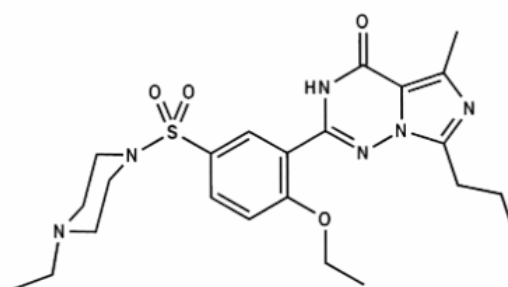
A tadalafila (Cialis[®], Figura 6) é outro inibidor seletivo da PDE₅ recentemente introduzido no mercado. A sua estrutura química é diferente do sildenafil e mostra pouca atividade contra as outras PDE (EARDLY & CARTLEDGE, 2002). Os estudos clínicos mostram que os pacientes apresentam ereções 20 minutos após uma única

dose oral de 20 mg e 60% ainda apresentavam efeitos 36 horas após a ingestão (PORST ET AL., 2003).

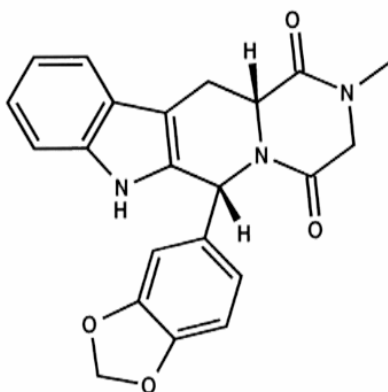
De forma similar ao vardenafil, fatores como a ingestão de álcool ou alimento não possui efeitos relevantes sobre a farmacocinética da droga. Os efeitos adversos são similares aos dos sildenafil e vardenafil, no entanto os pacientes não apresentam rubor (GIULIANO & VARANESE, 2002). Os estudos para avaliar a interação entre a tadalafila e os nitratos orgânicos encontraram efeitos sinérgicos modestos (EMMICK ET AL., 2002). Mas assim como o sildenafil e o vardenafil, a tadalafila não deve ser utilizada com nitratos (STIEF ET AL., 2005).



Sildenafil



Vardenafil



Tadalafila

Figura 6. Inibidores da PDE₅

Hoje já se sabe que os inibidores da PDE₅ possuem eficácia reduzida no tratamento da DE com condições onde exista ausência de NO endógeno (como por exemplo, no diabetes), por isso estão sendo desenvolvidos inibidores de PDE₅ liberadores de NO (KALSI ET AL., 2004).

Antagonistas dos receptores noradrenérgicos

A noradrenalina (NA) é um importante regulador da função sexual em geral e de forma particular do comportamento copulatório (RODRIGUEZ-MANZO & FERNANDEZ-GUASTI, 1994). Existem fortes evidências de que a inibição central dos receptores α_2 noradrenérgicos facilita a função sexual (GIULIANO & RAMPIN, 2000). Por estas razões, compostos com atividade noradrenérgica têm sido investigados para serem utilizados no tratamento da DE (BANCROFT, 2000).

- *Ioimbina*

A ioimbina (YOH) é um alcalóide indólico (Figura 7) encontrado numa grande variedade de fontes botânicas como a raiz da Rauwolfia e é o principal alcalóide extraído do caule da Pausinystalia yohimbe (TAM ET AL., 2001). Também é denominada quebrachina, afroquina, corinina e hidroaerogotocina além de ser um potente antagonista seletivo dos receptores adrenérgicos α_2 (GOLDBERG & ROBERTSON, 1983).

O uso predominante da YOH tem sido como ferramenta farmacológica em estudos envolvendo os receptores noradrenérgicos α_2 na regulação da função autonômica e para o tratamento da impotência masculina (TAM ET AL., 2001). Estudos em animais mostraram que YOH diminui a latência de intromissão, monta e ejaculação (SMITH ET AL., 1978a); aumenta a frequência de ereção peniana (SMITH ET AL., 1978b) e a motivação sexual e induz o comportamento copulatório em ratos sexualmente inativos (CLARK, 1984).

O mecanismo pelo qual YOH poderia melhorar a função sexual ainda não está completamente entendido (TAM ET AL., 2001). Postula-se que a ativação dos receptores noradrenérgicos α_2 localizados no SNC resulta em inibição do tônus simpático e diminuição da pressão sanguínea. Ao contrário, a inibição dos receptores noradrenérgicos α_2 pela YOH resulta no aumento do tônus simpático e da pressão sanguínea.

Está bem documentado que a resposta erétil é comandada pelo sistema não adrenérgico não colinérgico (NANC) no corpo cavernoso e que o grau de ereção ou de detumescência é determinado pelo equilíbrio entre o a liberação do NO a partir de neurônios NANC e o efeito contrário pelos neurônios simpáticos noradrenérgicos (TRAISH ET AL., 1999).

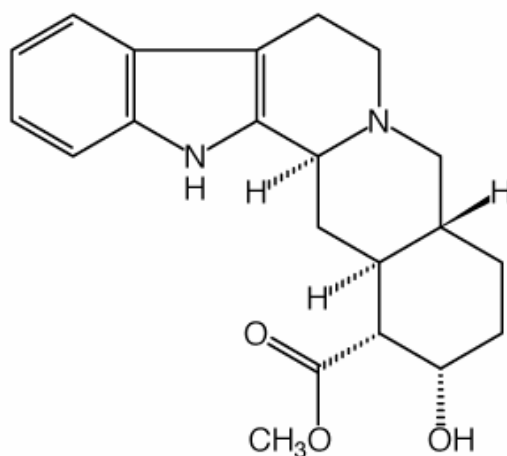


Figura 7. Ioimbina.

O estado flácido do pênis humano é mantido primariamente pela ação da NA nos receptores noradrenérgicos α_{1A} e α_{1D} localizados no corpo cavernoso (TRAISH ET AL., 1994; DAUSSE ET AL., 1998), apesar de que o papel de uma pequena população de α_{1B} não pode ser completamente esquecido (TAM ET AL., 2001). Contudo, a ereção peniana é um evento hemodinâmico complexo que envolve o delicado equilíbrio entre o músculo liso constritor do corpo cavernoso e os mediadores relaxantes controlados pelo

sistema nervoso central e periférico. Uma complexa interação entre os mecanismos noradrenérgicos, colinérgicos e NANC está envolvida na ereção peniana. A expressão dos receptores noradrenérgicos α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} no corpo cavernoso humano e de receptores α_{2A} e α_{2C} em células de músculo liso trabecular foi demonstrada por Traish et al. (1997).

A função fisiológica dos receptores noradrenérgicos α_2 pós-sinápticos nos corpos cavernosos de humanos e coelhos foi caracterizada in vitro pela resposta concentração-dependente ao agonista α_2 seletivo UK14304, sua atenuação pela YOH (GUPTA ET AL., 1998; SAÉNZ DE TEJADA ET AL., 1999) e pela YOH antagonizar a contração concentração-dependente do corpo cavernoso humano induzida pela NA (STEERS ET AL., 1984). Pelo menos em parte, o mecanismo de ereção induzida pela YOH inclui o antagonismo dos receptores noradrenérgicos α_2 pré- e pós-sinápticos (TAM ET AL., 2001).

O bloqueio dos receptores α_2 pré-sinápticos pela YOH ativa os neurônios noradrenérgicos e estes liberam NA, esta NA liberada pode ativar os receptores α no endotélio e mediar a liberação de NO e prostanóides. O NO e prostanóides liberados elevariam as concentrações de GMPc e AMPc, respectivamente, o que resultaria no relaxamento do músculo liso peniano (Figura 8).

Simonsen et al. (1997) demonstraram que a estimulação dos receptores α_2 pré-sinápticos inibe a liberação de um neurotransmissor NANC, o NO, em artérias de resistência penianas de cavalos. O bloqueio destes receptores α_2 pré-sinápticos pela YOH aumentaria a liberação de NO havendo então um estímulo da atividade da guanilato ciclase e conseqüente aumento dos níveis de GMPc, levando ao relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. Um estudo de Saénz de Tejada et al. (1999) sugere que a estimulação da via NO concomitante ao bloqueio dos receptores α_2 pela YOH, através da introdução de um grupo doador de NO em um novo análogo da YOH, produziria um efeito sinérgico de relaxamento do corpo cavernoso de coelho in vitro e aumento da ereção peniana in vivo.

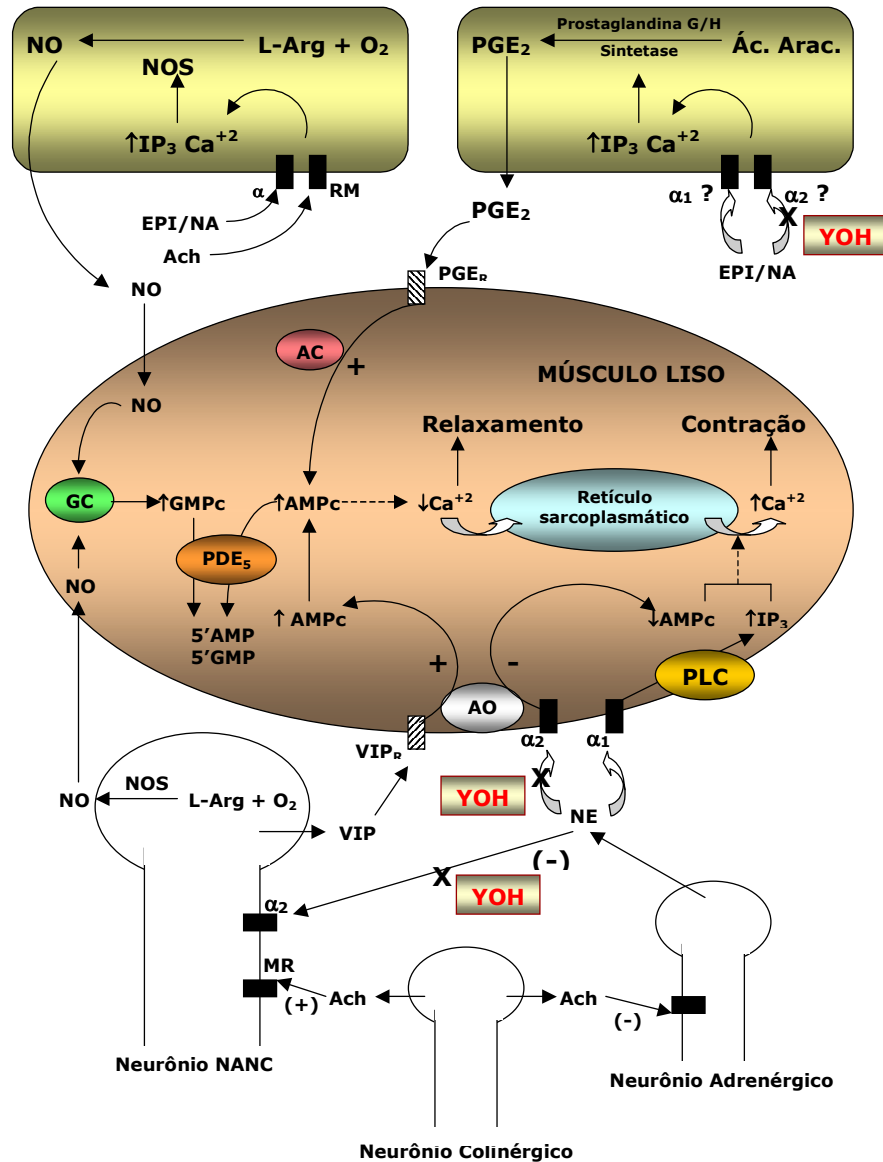


Figura 8. Regulação do tônus muscular cavernoso e mecanismo de ação da YOH na regulação deste tônus. AC, adenilato ciclase; Ach, acetilcolina; Ac. Arac, ácido aracdônico; GC, guanilato ciclase; IP₃, trifosfato de inositol; L - Arg, L - Arginina; PDE, fosfodiesterases; PGE_{E2}, prostaglandina E₂; PGE_R, receptor para prostaglandina E; PLC, fosfolipase C; VIP, peptídeo vasoativo intestinal; VIP_R, receptor para VIP. Modificada de Tam et al. (2001).

- Fentolamina

A fentolamina (Figura 9) é um antagonista competitivo, não seletivo, com eficácia quase igual sobre os receptores adrenérgicos α_1 e α_2 . Bloqueia, embora com menor eficiência, os receptores 5-HT e ainda libera histamina de mastócitos (ANDERSON E STIEF, 2001).

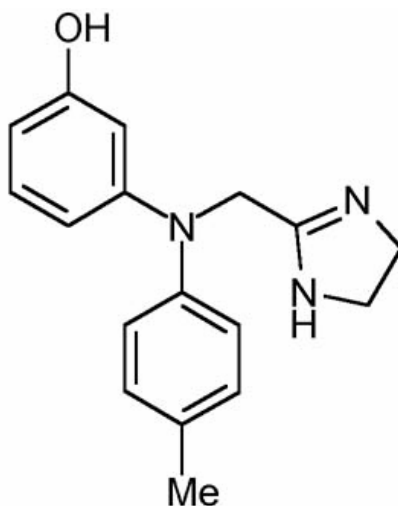


Figura 9. Fentolamina.

Esta droga causa relaxamento da musculatura lisa por outras vias que não somente o bloqueio alfa. Devido sua atividade simpática produz arritmias cardíacas mediada por barorreceptores e, estímulo à secreção lacrimal, salivar e do trato respiratório. Tem um notável efeito sobre o conteúdo gástrico e pancreático, provavelmente agindo nos receptores muscarínicos colinérgicos (DOLLERY, 1999).

Foi relatado que a fentolamina oral melhora a função erétil (GWINUP, 1988; ZORNIOTTI, 1994). Um estudo clínico com 459 homens portadores de DE leve a moderada, houve melhora em 37 % dos pacientes (GOLDSTEIN, 1998). Os efeitos colaterais incluem cefaléia, rubor facial e congestão nasal. A fentolamina oral não é aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), apesar de estar disponível em vários países da América do Sul (LUE, 2000).

Alcalóides

As plantas, através do seu metabolismo primário e secundário, produzem uma grande variedade de compostos orgânicos e estes podem ser classificados em cinco grandes grupos: carboidratos, lipídios, alcalóides, fenólicos e terpenóides (STECHEER ET AL., 2003). A família dos alcalóides é geralmente caracterizada pela presença de um nitrogênio (N) ligado a um grupo heterocíclico com reatividade básica e efeitos fisiológicos em homens e animais (STECHEER ET AL., 2003). Contudo, existem alcalóides de caráter ácido, como a colchicina (GRAENING & SCHMALZ, 2004).

- Apomorfina

A apomorfina (Figura 10)) é um derivado sintético obtido pelo tratamento da morfina com ácido clorídrico concentrado (NEVES & RATES, 2004) e apresenta similaridades estruturais com a dopamina. De acordo com Heaton (2000), pode ser classificada como um agente de ação central iniciador da ereção.

Em estudos clínicos, a administração subcutânea de apomorfina (0,25 – 1,0 g) mostrou-se efetiva na indução de ereções. Porém, diversos relatos de náuseas graves ocorreram demonstrando uma relação efeito adverso/benefício inaceitável. Este fato levou ao desenvolvimento de uma forma de administração sublingual (SL) para a apomorfina, que resultou na absorção rápida e eficiente da mesma, com um tempo de meia-vida plasmática de 2 a 3 horas, além de apresentar a vantagem, frente a formas orais de administração, de ser inalterada pela ingestão de alimentos (ANDERSSON, 2001; COHAN & KORENMAN, 2001; NEVES & RATES, 2004; STIEF, 2003).

Dados farmacocinéticos a respeito da apomorfina são escassos. Sabe-se que é muito pouco absorvida por via gastrointestinal e rapidamente eliminada do organismo, devido a seu elevado volume de distribuição e rápida biotransformação (THOMAS, 2002). Porém, quando administrada na forma sublingual, a apomorfina não sofre efeito de primeira passagem, atingindo rapidamente os níveis plasmáticos necessários ao efeito terapêutico (NEVES & RATES, 2004).

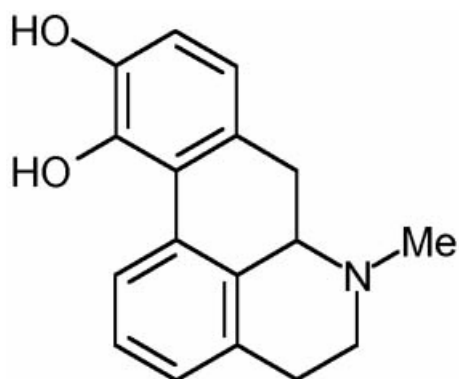


Figura 10. Apomorfina.

Outros estudos clínicos demonstraram o efeito pró-erétil do tratamento com apomorfina SL em homens normais, impotentes e alcoólatras, confirmando sua eficácia no tratamento da DE. O fármaco pode ser utilizado em pacientes com hiperplasia prostática benigna, doença arterial coronariana e hipertensão (THOMAS, 2002).

A apomorfina não possui propriedades analgésicas apesar de sua similaridade estrutural com a morfina e nem capacidade de induzir dependência. Em conjunto, estes dados apontam para a apomorfina SL como alternativa eficaz e segura para o tratamento de diversos casos de DE (NEVES & RATES, 2004).

- Berberina e Papaverina

A berberina (Figura 11.A.) é um alcalóide largamente distribuído na natureza e ocorre em plantas do gênero *Berberis* como na *Berberis aristata* e *Berberis vulgaris* (CICERO ET AL., 2001). Os estudos mostram que a berberina possui efeito relaxante no corpo cavernoso de coelho (CHIOU ET AL., 1998). Os autores deste estudo acreditam que a berberina possui potencial para ser utilizada como droga na terapia intracavernosa. A papaverina (Figura 11.B.) é um inibidor não específico de fosfodiesterases que aumenta os níveis de AMPc e GMPc no tecido peniano (JEREMY ET AL., 1997). A combinação de dois produtos naturais obtidos da *Papaver somniferum*

e da vesícula seminal de carneiros tem sido apontada como um potencial contra a DE (ZAHER, 1998). Estudos clínicos com homens portadores de DE indicam que a papaverina combinada a prostaglandina E₁ (PGE₁) é mais efetiva do que a PGE₁ sozinha (DREWES ET AL., 2003). A papaverina é altamente eficaz em homens que apresentam DE psicogênica e neurogênica e é menos eficaz na DE vasculogênica (LUE, 2000). O principal efeito colateral é o priapismo, fibrose local e aumento ocasional da aminotransferases séricas (ANDERSSON, 2001).

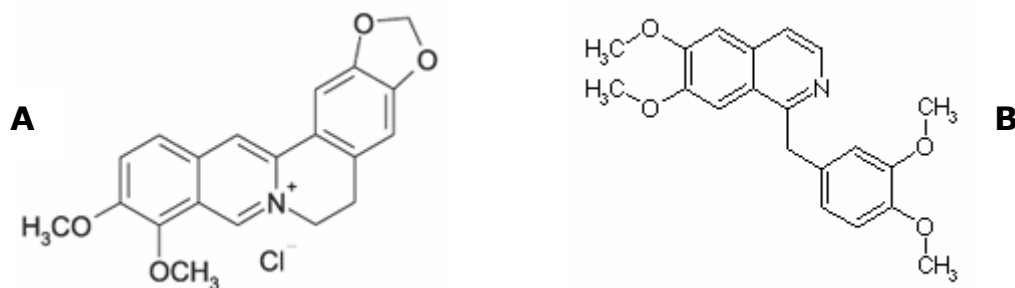


Figura 11. A. Berberina. B. Papaverina.

Outros produtos de origem natural

A introdução da “droga do amor”, Viagra[®], não somente estimulou a imaginação da população como também a reutilização da “antigos” produtos naturais como agentes para combater a DE e a procura de um novo produto natural que possa competir com o sildenafil (DREWES ET AL., 2003). Existem “candidatos” promissores, mas ainda são necessários estudos que desvendem os mecanismos de ação, efeitos colaterais e a toxicidade.

- Ginkgo biloba

As pesquisas recentes sugerem que o *Ginkgo biloba* pode ser utilizado para melhorar a DE induzida por antidepressivos (McKAY, 2004). A noção de que o Ginkgo poderia ter benefícios na DE iniciou com o fato de que pacientes geriátricos, utilizando Ginkgo para melhorar a memória, estavam apresentando uma melhora na performance

erétil. A disfunção sexual nestes pacientes foi caracterizada como sendo secundária à medicação antidepressiva. Um estudo mostrou que o Ginkgo apresentou 76 % de eficácia no alívio dos sintomas em todas as fases da resposta sexual em homens, incluindo na função erétil.

- *Cordyceps sinensis*

O *Cordyceps sinensis* é um fungo utilizado há muitos anos na medicina para tratar muitas patologias e promover a longevidade na sociedade chinesa (ZHU ET AL., 1998b). Além de outras atividades farmacológicas (HUANG ET AL., 2004), foram relatados melhoramento da libido, da performance sexual e o restabelecimento das funções reprodutivas deficientes, como a impotência e a infertilidade, em ambos os sexos (ZHU ET AL., 1998a)

- *Lepidium meyenii*

A *Lepidium meyenii* Walpers, conhecida na América do Sul como “maca”, é uma planta andina encontrada somente em uma área extremamente restrita da região central do Peru, mas pode ser cultivada em outras regiões (CICERO ET AL., 2001). A comunidade rural possui plena convicção de que a ingestão da maca permite a gravidez em pessoas inférteis (QUIROS ET AL., 1996). Tradicionalmente tem sido utilizada para aumentar a energia, melhora funções mentais, afrodisíaco para homens e mulheres, irregularidades menstruais e regulação hormonal na menopausa e síndrome da fadiga crônica (CICERO ET AL., 2001). A maca também tem sido utilizada por atletas que acreditam que esta planta é um alternativa aos esteróides anabolizantes (GRUNEWALD & BAILEY, 1993).

- *Panax ginseng*

O ginseng é uma das mais famosas plantas chinesas, utilizada há centenas de anos como afrodisíaco (TODA ET AL., 2005). Algumas evidências químicas dão suporte

à ação estimulante do extrato do *Panax ginseng*, mas o FDA não encontrou provas de que a ingestão deste extrato melhoraria a performance sexual (CHOUDHARY & UR-RAHMAN, 1997). Estudos com o ginseng vermelho coreano (CHOI ET AL., 1995) estão de acordo com as conclusões do FDA.

- *Eurycoma longifolia*

Esta planta nativa da Malásia (ANG & SIM, 1998) é utilizada há anos como antimalárica, citotóxica, anti-ulcerogênica e anti-pirética. Recentemente tem sido apresentada à população como alternativa para melhorar a virilidade (DREWES ET AL., 2003). Por esta razão vários grupos de pesquisa estudam a planta para avaliar esta propriedade (ANG & SIM, 1998).

- *Catuama*

A combinação de ervas, coletivamente chamada no Brasil de “catuama”, consiste de quatro plantas: *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Zingiber officinalis* e *Ptychopetalum olacoides*. Individualmente, estas plantas têm sido utilizadas por séculos para uma variedade de propósitos (analgésico, antibacteriano, cardiotônico, purgativo e vasodilatador). Contudo, é a combinação das quatro espécies que mais recentemente tem sido promovida como afrodisíaco (DREWES ET AL., 2003).

Os resultados de Antunes et al. (2001) em corpo cavenoso de coelhos indicam que a catuama promove relaxamento. As plantas foram avaliadas individualmente e a *Paullinia cupana* (guaraná) mostrou a maior efetividade no relaxamento do músculo liso.

Duas espécies relacionadas ao *Ptychopetalum*, o e *Ptychopetalum olacoides* e o e *Ptychopetalum uncinatum* formam o produto medicinal conhecido no Brasil como “muira puma”. Existe uma variedade de usos tradicionais incluindo o tratamento da disfunção sexual. Estudos clínicos conduzidos por um grupo francês (WAYNBERG,

1990) mostrou que o produto promoveu um melhoramento da libido e foi eficaz no tratamento da DE.

- *Forskolina*

A fonte do diterpeno forskolina (Figura 12) é a planta indiana *Coleus forskohlii* (DREWES ET AL., 2003). Possui origem relativamente recente (1977) e apresenta propriedades vasodilatadora e cardioestimulante. Em função dos efeitos dependentes do AMPc, foi encontrado o seu uso para o tratamento da cardiomiopatia congestiva, glaucoma e asma.

A forskolina também foi investigada como um agente vasoativo intracavernoso (MULHALL ET AL., 1997). Testes *in vitro* mostraram que a forskolina causa relaxamento dose-dependente. A investigação clínica em 31 pacientes com impotência vasculogênica não mostrou efeitos adversos e 61% destes pacientes relataram aumento da rigidez e/ou prolongamento da ereção usando a combinação de forskolina, papaverina, fentolamina e PGE₁.

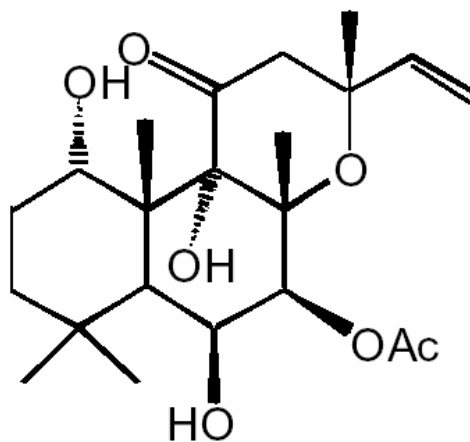


Figura 12. Foscolina.

1.3. O GÊNERO ASPIDOSPERMA

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae com cerca de 57 espécies de distribuição neotropical (MARCONDES-FERREIRA & KINOSHITA, 1996; BOLZANI ET AL., 1987), cujas espécies apresentam importância como fornecedoras de madeira nobre e como detentoras de alcalóides (GOMES & CAVALCANTI, 2001), principalmente do tipo indólico (JÁCOME ET AL., 2003).

Os alcalóides isolados das várias espécies de *Aspidosperma* (Figura 13) têm sido estudados em vários modelos, *in vitro* e *in vivo*. Recentemente Ferreira et al. (2004) mostraram que o extrato alcaloídico isolado da casca do caule de *Aspidosperma ramiflorum* (Guatambu) possui eficácia contra as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. Esta mesma espécie também já foi estudada quanto ao seu efeito antimicrobiano contra bactérias Gram positivas e negativas (OLIVEIRA, 1999).

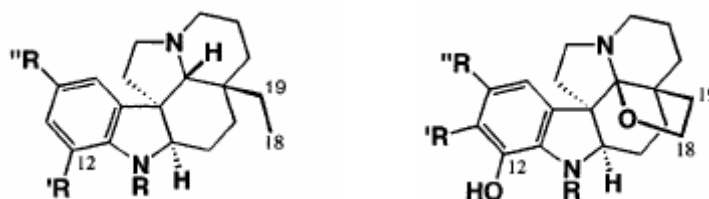


Figura 13. Estrutura química dos alcalóides de *Aspidosperma* (MITAINE-OFFER ET AL., 2002).

O extrato de *Aspidosperma pyrifolium* foi descrito como moluscicida (SANTOS, 2004) e o extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma subcanum* como antiinflamatório e antinociceptivo (SANTOS ET AL., 2004a; 2004b).

O caule da espécie *Aspidosperma quebracho blanco* tem sido utilizado durante séculos na América do Sul para tratar a disfunção erétil e com esta indicação ele foi introduzido na Europa no século XIX (GUIRGUIS, 1998). Em muitos países, incluindo

Alemanha, extratos de caule de *Aspidosperma* estão disponíveis como droga de prescrição (SPERLING ET AL., 2002). Este uso disseminado é contrastante com o pequeno número de estudos publicados em relação ao uso de extratos de *Aspidosperma* para o tratamento da DE (THERHAG, 1991; BAUMBUSCH ET AL., 1995; SPERLING ET AL., 1999, 2002).

O mais recente destes estudos (SPERLING ET AL., 2002) mostrou que o extrato do caule *Aspidosperma quebracho blanco* possui efeito pró-erétil mediado pelos receptores α e que este efeito pode estar relacionado à presença de YOH no extrato.

Um artigo publicado por Baumbusch et al. (1995) analisou um estudo clínico utilizando a formulação farmacêutica Afrodor 2000[®] composta de acecarbromal (sedativo), extrato alcoólico de *Aspidosperma quebracho blanco* e tocoferol. O autor relata que nos 35 pacientes analisados houve aumento da libido em 18 casos, prolongamento da ereção em 12, aumento da rigidez em outros 12, facilidade na obtenção do orgasmo em 10 pacientes. Estes pacientes não apresentaram efeitos colaterais. Mais uma vez o efeito foi relacionado ao conteúdo de YOH (em torno de 16%).

1.3.1. *Aspidosperma ulei* Markgr.

A pesquisa bibliográfica revelou a presença de um único estudo farmacológico publicado em 1954 por Banerjee e Lewis. Neste artigo, o autor utilizou uma solução de alcalóides extraídos do caule de *Aspidosperma ulei* (Figura 14) e os resultados encontrados foram os seguintes:

1. Antagonismo do efeito espasmogênico da acetilcolina no íleo e útero de ratas e cobaias e no duodeno de coelhos e do efeito espasmogênico da histamina no íleo e útero de ratas e cobaias;
2. Antagonismo do efeito espasmogênico do cloreto de bário no íleo de ratos, coelhos e cobaias e no útero de ratas e coabais;

3. Antagonismo do efeito espasmogênico da adrenalina no útero de coelhas;
4. Diminuição dos batimentos cardíacos em coração isolado de coelho e vasoconstricção em ratos;
5. Efeito estimulante central:
 - Aumento da temperatura retal em camundongos
 - Convulsões tônicas seguidas de morte em camundongos
 - “Scratching” das patas traseiras, salivação e lacrimejamento em coelhos
6. Não foi detectada atividade contra *Plasmodium berghei* in vivo;
7. Mostraram atividade amebicida in vitro

Outros dois trabalhos de Schmutz et al. (1957) e Lehner e Schmutz (1961), utilizando a casca da raiz de *Aspidosperma ulei* mostraram a presença dos alcalóides uleína, 1,2-dihidro-olivacina e 1,2-dihidro-elipticina. A uleína tem atividade tripanomiscida (ABREU E SILVA ET AL., 2002) e interfere na contratilidade da musculatura lisa vascular e não vascular e na contração induzida pelo cálcio em útero e em aorta, aparentemente por uma ação direta sobre os canais de cálcio (SOARES ET AL., 2004).

Apesar da uleína ser o marcador da *Aspidosperma ulei*, este alcalóide não é exclusivo desta espécie, existem relatos da presença da uleína nas espécies *A. australe*, *A. campus-belus*, *A. desamnthum*, *A. excelsum*, *A. eburneum*, *A. gomesianum*, *A. formosamum*, *A. multiflorum*, *A. olivaceum*, *A. parvifolium*, *A. pyricollum*, *A. subcanum*, *A. tomentosum*, *Alstonia scholaris*, *Alstonia undulifolia*, *Himatanthus lancifolius*, *Plumeiai lancifolia*, (GARCIA RUBEN & KEITH, 1976; BOLZANI ET AL., 1987; FRANCA ET AL., 2000; ABREU E SILVA ET AL., 2002; MASSIOT ET AL., 2002; JÁCOME ET AL., 2003; SOARES ET AL., 2004; MACABEO ET AL., 2005).

A



B



C



FIGURA 14. A,B,e C *Aspidosperma ulei* Markgr.

2 Objetivos

A possibilidade da introdução de um agente pró-erétil de origem natural é muito atraente principalmente pelo baixo custo quando comparado as medicações convencionais. Vários produtos naturais que têm sido utilizados por séculos para melhorar a função sexual masculina estão sendo objetos de investigação. Portanto, o estudo com a subfração alcaloídica isolada da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr. (SF₃₋₅) teve como objetivos:

1. Avaliar o potencial estimulante do Sistema Nervoso Central de SF₃₋₅ em camundongos;
2. Investigar o potencial pró-erétil de SF₃₋₅ em camundongos e estudar o seu mecanismo;
3. Estudar um possível efeito relaxante de SF₃₋₅ no corpo cavernoso de coelho e humano *in vitro*;
4. Averiguar o provável mecanismo de ação pelo qual SF₃₋₅ promove o relaxamento do corpo cavernoso de coelhos.

3 Materiais

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Obedecendo aos critérios e aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo N° 39/04 (Anexo A), foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 a 35 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e acondicionados no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Coelhos Nova Zelândia, pesando entre 2,0 – 2,5 Kg, obtidos no Setor de Cunicultura do Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

Os animais foram mantidos sob ciclo de claro-escuro de 12 horas com livre acesso à ração (Purina Chow[®]) e água *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório.

Cistos de *Artemia sp.* obtidos no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará.

De acordo com os critérios do Conselho Nacional de Pesquisa e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará, sob o processo 05173735-3, foram utilizados corpos cavernosos de doadores cadáveres, onde os fragmentos foram obtidos por ocasião da captação de órgãos para transplantes pela mesma incisão utilizada para aquele propósito.

3.2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

Produto	Origem
Agitador magnético	Fanem, Brasil
Agulhas descartáveis	BD, Brasil
Bacias plásticas	Sanremo, Brasil
Balança analítica	Marte AL 200, Brasil
Balança para pesagem de animais	Filizola, Brasil
Banho maria	Quimis, Brasil
Bomba para aeração	Rebello & Ferreira, Brasil
Campo aberto	UFC, Brasil
Cronômetros	Technos, Brasil
Placa exploratória	Ugo Basile, Italy
Lavadora ultra-sônica	Unique, Brasil
Labirinto em cruz elevado	UFC, Brasil
Luminária	Taschibra, Brasil
Material cirúrgico	EDLO, Brasil
PHmêtro	Alalion-PM 608, Brasil
Pipetas automáticas	Jencons, UK
Pipetas Pasteur	Unilab, Brasil
Ponteiras plásticas para pipetas	Uilab, Brasil
Polígrafo	Narco Biosystems, USA
Rota-rod	Insight Equipamentos Científicos, Brasil
Seringas descartáveis	BD, Brasil
Telhas de acrílico	UFC, Brasil
Vidrarias	Vidrolabor, Brasil

3.3. DROGAS E REAGENTES

Produto	Origem
Acetilcolina	Sigma, USA
Ácido ascórbico	Sigma, USA
Ácido niflúmico	Sigma, USA
Água destilada	UFC, Brasil
Apamina	Sigma, USA
Apomorfina	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
Atropina	Sigma, USA
Azul de metileno	Reagen, Brasil
Bicarbonato de sódio	Vetec, Brasil
Carbogênio	White Martins, Brasil
Caribdotoxina	Sigma, USA
Clonidina	Sigma, USA
Cloreto de cálcio	Vetec, Brasil
Cloreto de cálcio hexahidratado	Vetec, Brasil
Cloreto de magnésio hexahidratado	Quimex, Brasil
Cloreto de potássio	Synth, Brasil
Cloreto de sódio	Cinética, Brasil
Dicromato de potássio	Vetec, Brasil
DMSO	Vetec, Brasil
EDTA	Pro Analysis, Brasil
EGTA	Sigma, USA
Fenilefrina	Sigma, USA
Fentolamina	Sigma, USA
Fluoxetina	Evidence, Brasil

Fosfato de sódio dibásico	Synth, Brasil
Glibenclamida	Sigma, USA
Glicose	Vetec, Brasil
Guanetidina	Sigma, USA
Haloperidol	Cristália, Brasil
Indometacina	Prodome, Brasil
Ioimbina	Sigma, USA
L-NAME	Sigma, USA
Nifedipina	Sigma, USA
Noradrenalina	Sigma, USA
ODQ	Sigma, USA
Pentobarbital sódico	Sigma, USA
PGF _{2α}	Sigma, USA
SF ₃₋₅	UFC, Brasil
Sulfato de magnésio	Quimex, Brasil
Sulfato de sódio	Vetec, Brasil
Tetrodotoxina	Sigma, USA
Vardenafil	Bayer, Brasil

3.4. SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com sais de pureza analítica.

Água marinha artificial

NaCl 23g, KCl 0,7g, MgCl₂·6H₂O 11g, Na₂SO₄ 4g, CaCl₂·6H₂O 1,3g.

Krebs-Henseleit

NaCl 114,6 mM, KCl 4,96 mM, MgSO₄ 1,3 mM, CaCl₂ 2,0 mM, NaH₂PO₄ 1,23 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 3,6 mM.

Krebs-Henseleit modificado para canal deferente

NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, CaCl₂ 2,54 mM, KH₂PO₄ 0,93 mM, NaHCO₃ 24 mM, glicose 11 mM, EDTA 0,027 mM, ácido ascórbico 0,1 mM.

Krebs-Henseleit sem Ca⁺⁺

Krebs-Henseleit despolarizante (K⁺ 60 mM)

Obtida pela substituição do NaCl pelo KCl em bases equimolares.

Carbogênio

Mistura gasosa de CO₂ 5 % e O₂ 95%

4 Métodos

4.1. COLETA DA *ASPIDOSPERMA ULEI* MARKGR

A planta, popularmente conhecida como Pitiá, foi coletada pelo Professor Edilberto Rocha Silveira (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – UFC) na localidade Garapa em Acarape no estado Ceará (Figura 15). A espécie foi identificada no Herbário Prisco Correia da UFC e catalogada (exsicata N^o 30823).



Figura 15. Localização geográfica do município de Acarape.

4.2. OBTENÇÃO DA SUBFRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS CASCAS DA RAIZ DE *ASPIDOSPERMA ULEI* MARKGR (SF₃₋₅)

A extração, fracionamento e identificação dos constituintes foi realizada no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC pelo doutorando Daniel Esdras de Andrade Uchôa sob orientação do Professor Edilberto Rocha Silveira.

1. Preparação do Extrato Etanólico das Cascas da Raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr (ApCRE)

Foram extraídos 4,0 Kg das cascas da raiz de *A. ulei* por maceração, com 10 L de etanol. Essa extração foi repetida 4 vezes, durante 24 h cada, e as soluções etanólicas foram evaporadas à pressão reduzida e reunidas, fornecendo o extrato denominado ApCRE (144,55 g, 3,61 %).

1. Partição líquido-líquido de ApCRE

Suspenderam-se 51,0 g do ApCRE em 200 mL de H₂O destilada e extraídos 4 x 200 mL de Acetato de Etila, fornecendo as frações ApCRE-AQ (40,6 g, 79,6 %) e ApCRE-AE (8,6 g, 16,9 %).

2. Cromatografia em sephadex de ApCRE-AE

Dissolveram-se 1,20 g de ApCRE-AE em metanol e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 3,5$ cm) contendo 45 g de SEPHADEX LH-20, com metanol, coletando-se 7 frações, 1-5 (50 mL cada), 6 (75 mL), 7 (200 mL) e com acetato de etila, coletando-se uma fração, 8 (200 mL). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1-2 (587,4 mg), 3-5 (162,4 mg), 6-9 (371,9 mg), as quais foram denominadas ApCREAE(1-2), ApCREAE(3-5) e ApCREAE(6-9). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

3. Partição de ApCRE-AQ

Foram extraídos 40,6 g da ApCRE-AQ, não liofilizados, com 70 mL de uma mistura Metanol/Acetato de Etila 2:5, fornecendo a fração (1). Ao resíduo foi adicionado 50 mL de uma mistura Metanol/Acetato de Etila 2:3, fornecendo uma fração (2). O resíduo resultante apresentou-se como um sólido granuloso que, após seco e liofilizado, mostrou-se, através de

espectro de RMN ^1H e ^{13}C e em comparação com dados da literatura [DOUGLAS E. DORMAN, S. J. ANGYAL, and JOHN D. ROBERTS *Journal of American Chemical Society*, 92(5), 1351-1354 (1970)], como um derivado de inositol (945 mg), o D-1-O-metil-mio-inositol.

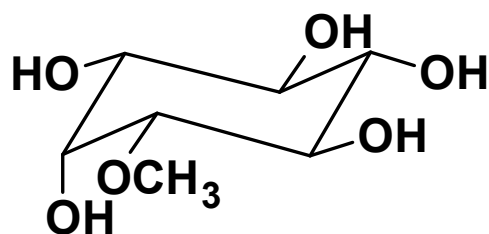


Figura 16. D-1-O-metil-mio-inositol

- **Cromatografia em sílica gel de ApCRE-AE(3-5)**

Foram misturados 1,84 g de ApCRE-AE(3-5) a 5,00 g de sílica gel e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 3,5$ cm) contendo 40,00 g de sílica gel, com uma mistura de clorofórmio:metanol 4:1 coletando-se 19 frações, 1-3 (20 mL cada), 4-17 (10 mL), 18 (20 mL) e 19 (200 mL); e 0:1, coletando-se 3 frações: 20-22 (50 mL cada). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1 (0,02 g), 2 (1,06 g), 3 (0,08 g), 4 (0,08 g), 5 (0,14 g), 6 (0,11 g), 7 (0,07 g), 8-9 (0,09 g), 10-11 (0,06 g), 12-18 (0,06 g), 19-20 (0,03 mg) e 20-22 (0,01 g). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

- **Cromatografia em sílica gel de ApCRE-AE(3-5/5)**

Foram misturados 145,0 mg de ApCRE-AE(3-5/5) a 1 g de sílica gel e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 2,5$ cm) contendo 5 g de sílica gel, com uma mistura de clorofórmio e metanol 4:1 coletando-se 7 frações, 1-3

(2 mL cada), 4-6 (6 mL cada) e 7 (10 mL); e 0:1, coletado-se 1 frações: 8 (25 mL). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1 (1,4 mg), 2 (8,8 mg), 3-5 (109,0 mg), 6-7 (55,8 mg) e 8 (3,5 mg). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

- **Cromatografia em sílica gel de de ApCRE-AE(3-5/5/3-5)**

Foram misturados 109,0 mg de ApCRE-AE(3-5/5/3-5) a 1 g de sílica gel e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 3,5$ cm) contendo 10 g de sílica gel, com uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1 coletando-se 16 frações, 1-3 (4 mL cada), 4 (3 mL cada), 5 (2 mL cada), 6 (1 mL cada), 7-8 (4 mL cada), 9-14 (9 mL cada), 15-16 (25 mL cada). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1 (1,4 mg), 2 (4,6 mg), 3 (5,5 mg), 4 (5,1 mg), 5 (4,0 mg), 6 (5,1 mg), 7 (6,3 mg), 8 (20,1 mg), 9 (30,4 mg), 10-13 (18,0 mg) e 14-16 (4,5 mg). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

A fração de ApCRE-AE(3-5/5/3-5/10-13), denominada ApA-I, apresentou-se como uma resina amarela, solúvel em metanol, que mostrou-se pura para os padrões de RMN ^1H . A feição espectral característica de alcalóide do tipo indólico e comparação com dados da literatura [ROBERT P. BORRIS, DAVID C. LANKIN and GEOFFREY A. CORDELL *Journal of Natural Products*, 46(2), 200-205 (1982)] possibilitaram identificá-lo como uleína (Figura 17).

- **Cromatografia em sílica gel de ApCREAE(3-5/8-9)**

Foram misturados 90,3 mg de ApCREAE(3-5/8-9) a 1 g de sílica gel e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 2,5$ cm) contendo 5 g de sílica gel, com uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1 coletando-se 27 frações, 1-2 (8 mL cada), 3-4 (5 mL cada), 5 (3 mL cada), 6-17 (1 mL cada), 18-19 (3 mL cada), 20-21 (5 mL cada) e 22-27 (8 mL cada). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1 (1,5 mg), 2-3 (5,0 mg), 4 (1,0 mg), 5-10 (6,5 mg), 11-16 (10,0 mg), 17-19 (28,2 mg) e 20-27 (34,1 mg). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

A fração ApCREAE(3-5/8-9/17-19), denominada ApA-II, apresentou-se como uma resina amarela, solúvel em metanol. A feição espectral característica de alcalóide do tipo indólico e comparação com dados da literatura [ROBERT P. BORRIS, DAVID C. LANKIN and GEOFFREY A. CORDELL *Journal of Natural Products*, 46(2), 200-205 (1982)] possibilitaram identificá-lo como um derivado não metilado da uleína (Figura 18).

- **Cromatografia em sílica gel de ApCRE-AE(6-9)**
-

Foram misturados 1,09 g de ApCRE-AE(6-9) misturados a 5 g de sílica gel e eluidos em uma coluna de vidro ($\varnothing = 3,5$ cm) contendo 40 g de sílica gel, com uma mistura de clorofórmio e metanol 4:1 coletando-se 13 frações, 1 (15 mL), 2-8 (10 mL cada), 9-11 (20 mL cada), 12 (125 mL), 13 (75 mL); e 0:1, coletando-se uma fração: 14 (50 mL). As frações foram comparadas por CCD e reunidas como segue: 1 (13,4 mg), 2 (16,1 mg), 3 (32,5 mg), 4 (46,1 mg), 5 (63,7 mg), 6 (76,8 mg), 7 (63,5 mg), 8 (67,1 mg), 9-10 (242,8 mg), 11-12 (345,5 mg) e 13-14 (101,4 mg). Todas as frações foram liofilizadas antes da obtenção do rendimento.

A fração ApCRE-AE(6-9), originou 36,5 mg de um precipitado branco, denominado ApA-III, solúvel em dimetilsulfóxido. A feição espectral característica de alcalóide do tipo indólico e comparação com dados da literatura [SYLVIE MICHEL,

FRANÇOIS TILLEKIN et MICHEL KOCH *Journal of Natural Products*, 45(4), 489-494 (1981)] possibilitaram identificá-lo como a tetrahydro-3,14,4,21-elipticina (Figura 19).

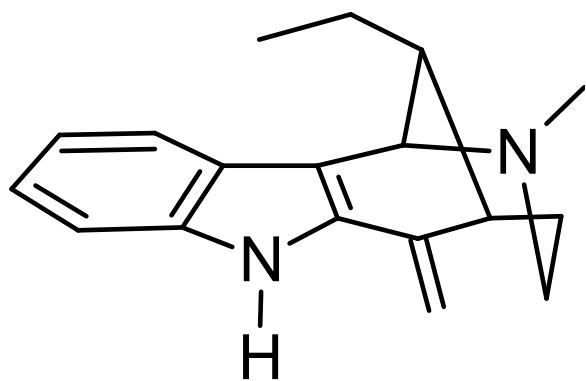


Figura 17. Uleína.

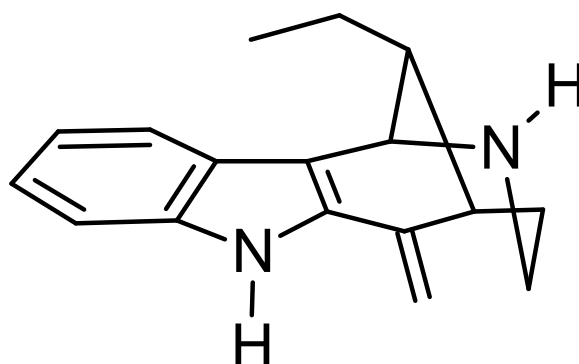


Figura 18. *nor*-uleína.

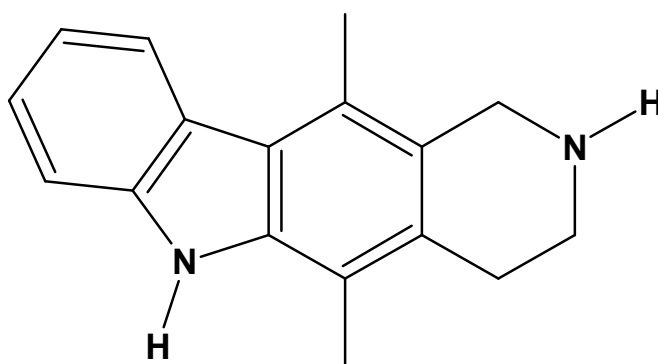


Figura 19. Tetrahydro-3,14,4,21-elipticina.

4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SF₃₋₅

- Determinação da CL₅₀ - Teste da *Artemia salina*

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia sp.* com atividade citotóxica (SAHPAZ ET AL., 1994). Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido este teste dentro de suas rotinas no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBUEGER & HOSTETTMANN, 1991).

Neste modelo, foi seguida a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), onde os ovos de artemia (50 mg) foram colocados para eclodir em um recipiente contendo água marinha artificial (1000 mL) e aerado durante 48 h (colocado um foco de luz após as primeiras 24h). Após este período, as larvas foram coletadas com auxílio de uma pipeta Pasteur.

Várias concentrações de SF₃₋₅ (1-1000 µg/mL) foram preparadas e colocadas em frascos aos quais adicionou-se água marinha artificial, sendo 5 mL o volume final em cada frasco. Dez larvas foram adicionadas a cada frasco e utilizados três frascos para cada dose de SF₃₋₅, sendo o número de mortes dentre as trinta larvas verificado após 24h.

A CL₅₀ (concentração letal para 50% das larvas) com intervalo de confiança de 95% foi determinada de acordo com o método descrito por Miller e Tainter (1944). Controle água marinha artificial, veículo (DMSO 3%) ou dicromato de potássio (10 - 100 µg/ml) foram adicionados ao estudo com finalidade de comparação.

- Determinação da DL₅₀

Para a determinação da toxicidade aguda de SF₃₋₅, camundongos Swiss, 25-30g, foram divididos em grupos de 5 machos e 5 fêmeas, em jejum de sólidos de 18h e

tratados, com veículo (DMSO 3%), SF₃₋₅ (100 – 600 mg/Kg; via intraperitoneal). Durante o período de 120 minutos após a administração das drogas os animais foram observados quanto aos parâmetros: estado de alerta, sedação, ptose, dispnéia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, nocicepção e morte.

4.4. EFEITO DE SF₃₋₅ NO COMPORTAMENTO GERAL DE CAMUNDONGOS

A atividade comportamental dos animais, especialmente roedores, em vários equipamentos de laboratório pode ser resultado de diferentes tendências ou impulsos, isto é, pode ser uma atividade específica relacionada à exploração do ambiente ou à esquiva de aspectos particulares do ambiente, ou ainda, simplesmente uma atividade geral inespecífica (LAPA ET AL., 2003).

4.4.1. Teste de coordenação motora

- Teste do “Rota-rod”

Este teste permite avaliar se SF₃₋₅ promove incoordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 r.p.m. Os camundongos foram selecionados 24 h antes do teste, em sessões de 2 min de duração, antes da administração de SF₃₋₅, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período.

No dia do teste, os animais selecionados foram divididos em grupos (n = 8) e tratados, por via intraperitoneal, com SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg ou veículo (10 mL/Kg) e 30 min após os tratamentos foram recolocados na barra. Foi registrado o tempo de permanência na barra (em segundos), com três reconduções, no máximo, à barra.

4.4.2. Teste de atividade locomotora

- Teste do campo aberto – “open-field”

A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente (MONTGOMERY, 1955). O objetivo deste teste é avaliar a atividade estimulante ou depressora de SF₃₋₅, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ansiolítica/ansiogênica. Um campo aberto, confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto, 30 x 30 x 15 cm) é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de autolimpeza (“grooming”) e de levantar (“rearing”), registrados durante um período de 4 min, após os tratamentos.

Os camundongos foram divididos em grupos (n = 8) e tratados, por via intraperitoneal, com SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg ou veículo (10 mL/Kg) e 30 min após foram colocados no centro do campo. Houve um período de 1 min de ambientação ao local.

4.4.3. Testes de atividade ansiolítica/ansiogênica

- Teste da placa perfurada – “hole-board”

Os camundongos foram divididos em grupos (n = 8) e tratados, por via intraperitoneal, com SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg ou veículo (10 mL/Kg) e 30 min após foram colocados no “hole-board”, que consiste numa placa (30 x 30 cm) a 10 cm de altura com 16 orifícios de 2 cm de diâmetro, eqüidistantes uns dos outros e das bordas.

Neste equipamento os animais foram ambientados por 1 min e é registrado, durante 5 min, o número de vezes que os animais espreitaram os orifícios para uma avaliação de possível ação ansiolítica/ansiogênica de SF₃₋₅. Uma diminuição do número de mergulhos da cabeça implica numa ação ansiogênica.

- Teste do labirinto em cruz elevado - “plus-maze”

O labirinto em cruz elevado (LCE) é baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow e File (1985) e validado por Lister (1990) para camundongos, e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados são conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min e 30 min após os tratamentos com SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg veículo (10 mL/Kg). Os animais foram ambientados por 1 min no aparelho. As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entrada e o tempo despendido nos braços abertos e fechados.

4.4.4. Teste de atividade hipno-sedativa

- Tempo de sono induzido por barbitúrico

Os animais foram divididos em grupos (n = 8) e receberam, por via intraperitoneal, SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg ou veículo (10 mL/Kg) 30 min antes da administração de pentobarbital sódico (50 mg/Kg/i.p.). A duração da perda do reflexo postural (tempo de recuperação) dos animais, após a administração do barbitúrico foi registrada em minutos.

4.4.5. Teste de atividade antidepressiva

- Teste da natação forçada

Os animais foram divididos em grupos (n = 8) e receberam, por via intraperitoneal, SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg ou veículo (10 mL/Kg) 30 min depois foram colocados, individualmente, num cilindro de vidro (altura = 40 cm; diâmetro = 25 cm), contendo 15 cm de água por um período de 6 min, no qual foi registrado o tempo total

de imobilidade para cada animal. Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água.

4.5. EFEITO DE SF₃₋₅ SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE CAMUNDONGOS

4.5.1. Avaliação do efeito pró-erétil em camundongos

Os camundongos receberam SF₃₋₅ 25 ou 50 mg/Kg (i.p.) e foram habituados por 5 min numa câmara transparente (30 x 30 x 15 cm). Após a ambientação, os animais foram observados durante 30 min e foram registradas as seguintes respostas:

I – ereção: quando o animal permanecia somente sobre as patas traseiras, inclinava o corpo para frente e levava a cabeça de encontro à área genital e lambia o pênis (Figura 20). O pênis ereto era visível, mas por pouco tempo.

II – erection-like: quando o animal permanecia somente sobre as patas traseiras, inclinava o corpo para frente e levava a cabeça de encontro a área genital, lambia o abdômen mas não o pênis (Figura 21). O pênis ereto não era visível.

III – grooming genital: o animal elevava uma das patas traseiras e lambia a área genital (Figura 22). Não ocorria ereção.

Além destes três parâmetros, também foi registrada a latência para a primeira ereção (RAMPIN ET AL., 2003).

Como drogas controle foram utilizados a loimbina (2 mg/Kg/i.p.), Apomorfina (1,1 µg/Kg/s.c.) e Vardenafil (0,3 mg/Kg/i.p.). Para avaliar o possível mecanismo de ação, utilizou-se Clonidina (0,1 mg/Kg/i.p.), Haloperidol (2 mg/Kg/i.p.) , L-NAME (10 mg/Kg/i.p.) e Azul de metileno (1 mg/Kg/i.p.).



Figura 20. Ereção.

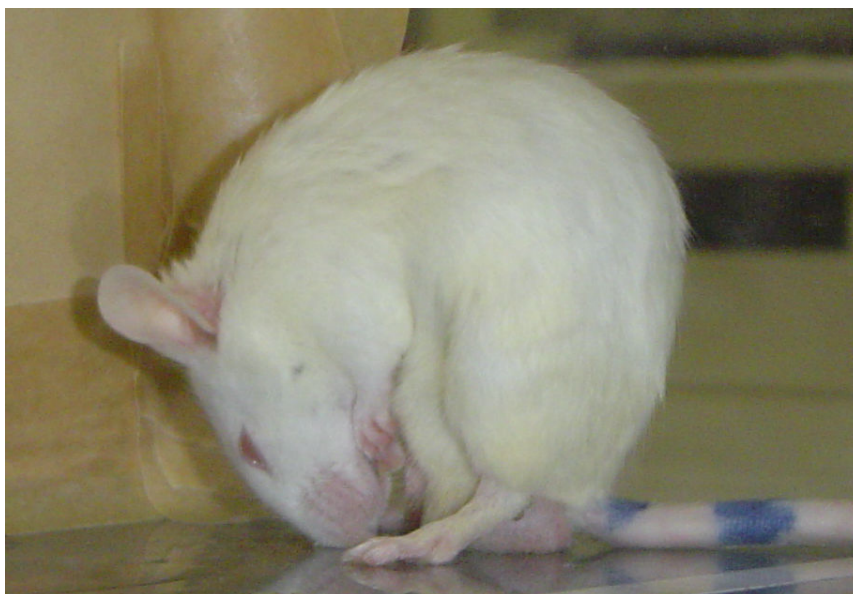


Figura 21. *Erection-like.*

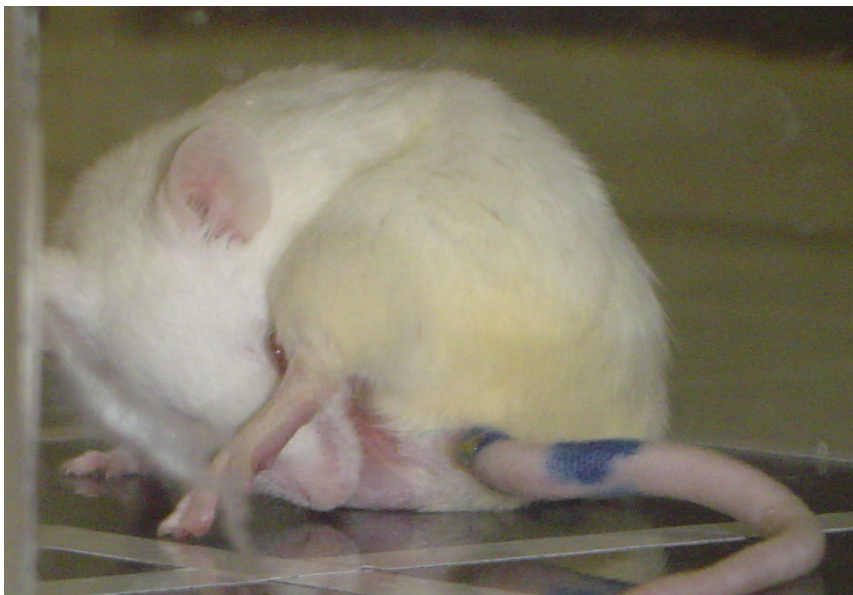


Figura 22. *Grooming genital.*

4.5.2. Avaliação da influência da fluoxetina no efeito pró-erétil de SF₃₋₅ em camundongos

Foram utilizados camundongos (n = 8) tratados da seguinte maneira:

Grupo I – Controle (veículo 10 mL/Kg/i.p.) durante 13 dias;

Grupo II – SF₃₋₅ (25 mg/Kg/i.p.) durante 13 dias;

Grupo III – Fluoxetina (10 mg/Kg/s.c.) durante 13 dias;

Grupo IV – Fluoxetina (10 mg/Kg/s.c.) durante 13 dias e SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.) no 13º dia.

No 1º e 13º dia de tratamento os animais foram habituados por 5 min numa câmara transparente (30 x 30 x 15 cm). Após a ambientação, os animais foram observados durante 30 min e foram registradas as seguintes respostas: latência para a primeira ereção, número de ereções, erection-like e grooming genital.

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE SF₃₋₅ *IN VITRO*

4.6.1. Estudo do efeito de SF₃₋₅ na junção neuromuscular autonômica de canal deferente de camundongos

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os canais deferentes rapidamente removidos. Um segmento de aproximadamente 1 cm de comprimento, livre de tecido adiposo e conjuntivo aderentes e de vasos sanguíneos, foi retirado da porção prostática de um dos canais (Figura 23). O tecido foi montado sob tensão de repouso de 0,3 g, em uma cuba orgânica de 3 mL de volume, contendo solução de Krebs livre de Mg⁺⁺, pH 7,4. O meio foi mantido a 37 °C e aerado com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂.

Os nervos intramurais foram estimulados por campo elétrico produzido por pulsos simples retilineares (voltagem supramáxima, 1 ms, 0,1 Hz) entre dois eletrodos de platina em forma de anéis, situados acima e abaixo do tecido isolado.

As contrações longitudinais foram registradas através da fixação da extremidade superior do tecido a um transdutor de força isométrico, o qual foi conectado a um amplificador e este a um registrador. SF₃₋₅ foi adicionada em concentrações variando de 1 – 64 µg/mL e o DMSO (Controle) de forma isovolumétrica. Em conjuntos separados de experimentos foi avaliado o efeito de SF₃₋₅ (64 µg/mL) nas respostas contráteis de Noradrenalina 10 µM e ATP 30 µM.

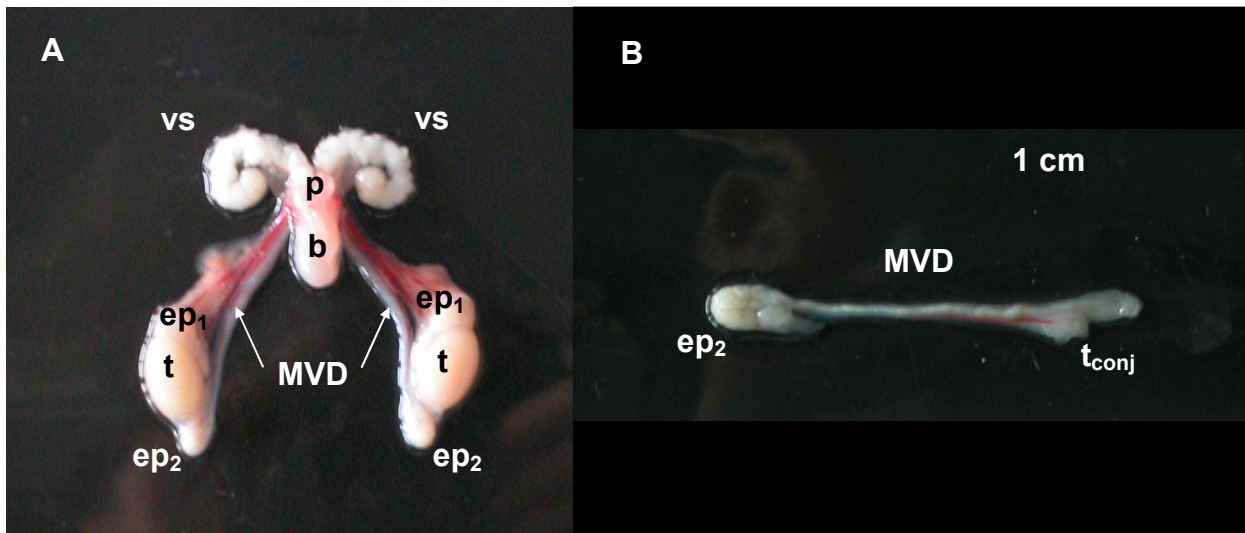


Figura 23. Anatomia do sistema reprodutor masculino de camundongo. A. Identificação das estruturas: (MVD (canais deferentes), vs (vesícula seminal), p (próstata), b (bexiga), t (testículo), ep₁ (cabeça do epidídimo), ep₂ (cauda do epidídimo). B. Canal deferente de camundongo (MVD) com cauda do epidídimo (ep₂) e tecido conjuntivo anexo (t_{conj}).

4.6.2. Estudo do efeito de SF₃₋₅ no corpo cavernoso de coelhos

Coelhos Nova Zelândia foram sacrificados por injeção de pentobarbital sódico (30 – 40 mg/Kg) pela veia marginal e os pênis dos mesmos foram removidos e colocados em placas de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit e dissecados com bisturi para remoção do corpo cavernoso (Figura 24). Os corpos cavernosos foram isolados e montados em banhos de 5 mL em Krebs-Henseleit mantido a 37 °C, pH 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica. Os tecidos foram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 1 h com lavagens sucessivas de 15 em 15 min. As alterações na tensão foram registradas utilizando-se um transdutor de força isométrico conectado a um polígrafo de 4 canais. Após o período de equilíbrio, o corpo cavernoso foi contraído com 10 μM de fenilefrina e as respostas a estimulação de campo elétrico (ECE; 0,5 ms; 20 V, 2 – 16 Hz) e Ach (1 μM) obtidas em experimentos isolados. SF₃₋₅ foi adicionada nas concentrações de 1 – 300 μg/mL e o DMSO (Controle) de forma

isovolumétrica. A indometacina (10 μM) e a guanetidina (10 μM) foram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit para diminuir a atividade mecânica basal do tecido.

Em um conjunto isolado de experimentos, o efeitos de SF₃₋₅ nas respostas da fenilefrina, K⁺ 60 mM ou PGF_{2 α} 100 μM foram comparadas na presença de um inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME 100 μM), de um inibidor da guanilato cilcase solúvel (ODQ 10 μM), de um bloqueador dos canais de sódio neuronais (Tetrodotoxina TTX 1 μM), de um bloqueador dos canais de potássio ATP-dependentes (Glibencamida 100 μM), de inibidores dos canais de potássio cálcio-dependentes de alta, intermediária e baixa condutância (caribdotoxina e apamina 0,1 μM), de um bloqueador muscarínico (Atropina 10 μM), de um antagonista dos receptores noradrenérgicos (Fentolamina e 10 μM), de um bloqueador dos canais de cloreto (Ácido niflúmico 100 μM) ou de um bloqueador dos canais de cálcio voltagem-dependentes e de um quelante de cálcio (Nifedipina 10 μm e EGTA 100 μm).



Figura 24. Corpo cavernoso de coelho.

4.6.3. Estudo do efeito de SF₃₋₅ no corpo cavernoso de humanos

Este estudo foi realizado com corpos cavernosos de doadores cadáveres, onde os fragmentos foram obtidos por ocasião da captação de órgãos para transplantes.

Os corpos cavernosos foram dissecados para retirada dos tecidos circunjacentes e da túnica albugínea. Após isolamento foram montados em banhos de 5 ml em Krebs-Henseleit mantido a 37° C, pH 7,4 e oxigenado com mistura carbogênica. Os tecidos foram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 1 h com lavagens sucessivas de 15 em 15 min.

As alterações na tensão foram registradas por intermédio de polígrafo com transdutor de força isométrico (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). Após o período de equilíbrio, o corpo cavernoso foi contraído com Fenilefrina 10 µM. SF₃₋₅ foi adicionada nas concentrações de 1 – 300 µg/mL e o DMSO (Controle) de forma isovolumétrica. A indometacina (10 µM) e guanetidina (1 µM) foram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit para diminuir a atividade mecânica basal do tecido.

5 Resultados

5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE SF₃₋₅

- Determinação da CL₅₀ em cistos de *Artemia sp.*

Neste teste, as substâncias são consideradas ativas quando a toxicidade para *Artemia sp.* for menor que 1.000 ppm (Meyer, 1982), ou seja, quando em cada 1000 mL da solução existir menos que 1 mL da substância teste. A CL₅₀ encontrada para a SF₃₋₅ foi de 3,94 [1,84 – 6,92] µg/mL, cerca de cinco vezes mais tóxico que o dicromato de potássio, conhecida substância tóxica para *Artemia sp.* que possui CL₅₀ entre 20 e 40 µg/mL.

- Determinação da DL₅₀ em camundongos

Através da utilização do método de probitos determinou-se a DL₅₀ de SF₃₋₅, via intraperitoneal, em 400 ± 40 mg/kg. Os animais apresentavam convulsões seguida de morte.

5.2. EFEITO DE SF₃₋₅ NO COMPORTAMENTO GERAL DE CAMUNDONGOS

5.2.1. Teste de coordenação motora

- Teste do “Rota-rod”

A fração SF₃₋₅, nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal, não alterou o tempo de permanência dos animais no aparelho de “rota-rod”, mostrando que SF₃₋₅ não promove incoordenação motora nos animais, como na visto na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito de SF₃₋₅ no teste do “Rota-rod” em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Permanência na barra (s)
Controle	-	120,00 ± 0,00
SF ₃₋₅	12,5	112,50 ± 7,50
	25	104,00 ± 12,28
	50	103,85 ± 10,68

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de permanência no aparelho (ANOVA seguida de Student-Newman-Keul).

5.2.2. Teste de atividade exploratória

- Teste do campo aberto - open-field

Neste teste, SF₃₋₅ em todas as doses utilizadas (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), aumentou significativamente (**p < 0,01 e *p < 0,05, respectivamente) a ambulação dos animais (número de cruzamentos entre as divisões do campo (Anexo A e Gráfico 1). No entanto não alterou os parâmetros levantar (“rearing”) e de auto-limpeza (“grooming”).

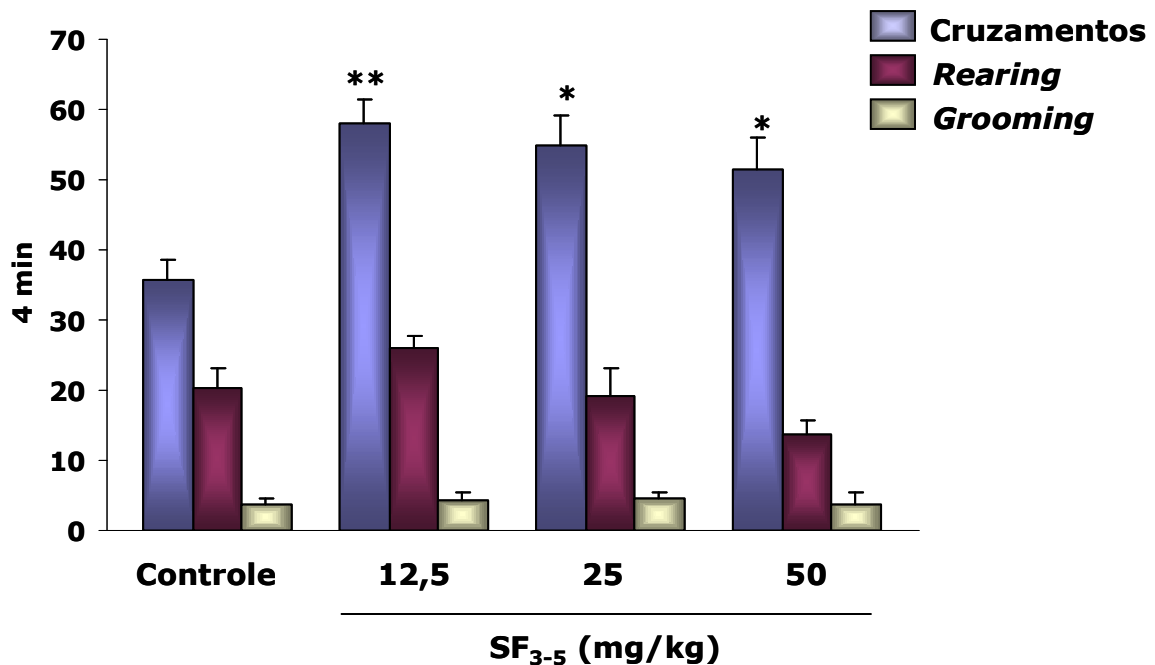


Gráfico 1. Efeito de SF₃₋₅ no teste do campo aberto em camudongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de cruzamentos, rearing e grooming durante 4 minutos. *p < 0,05 e **p < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.2.3. Teste de atividade ansiolítica/ansiogênica

- Teste da placa perfurada - hole-board

O comportamento de mergulhar a cabeça, em roedores, é relacionado como medida de ansiedade. Drogas ansiolíticas aumentam o número de explorações (mergulhos), enquanto que drogas ansiogênicas diminuem este comportamento. A fração SF₃₋₅ na dose de 50 mg/kg/ip ($16,75 \pm 2,40$) diminuiu de forma significativa (**p < 0,01) em relação ao grupo controle ($31,62 \pm 3,12$), mostrando um efeito do tipo ansiogênico (Anexo B e Gráfico 2)

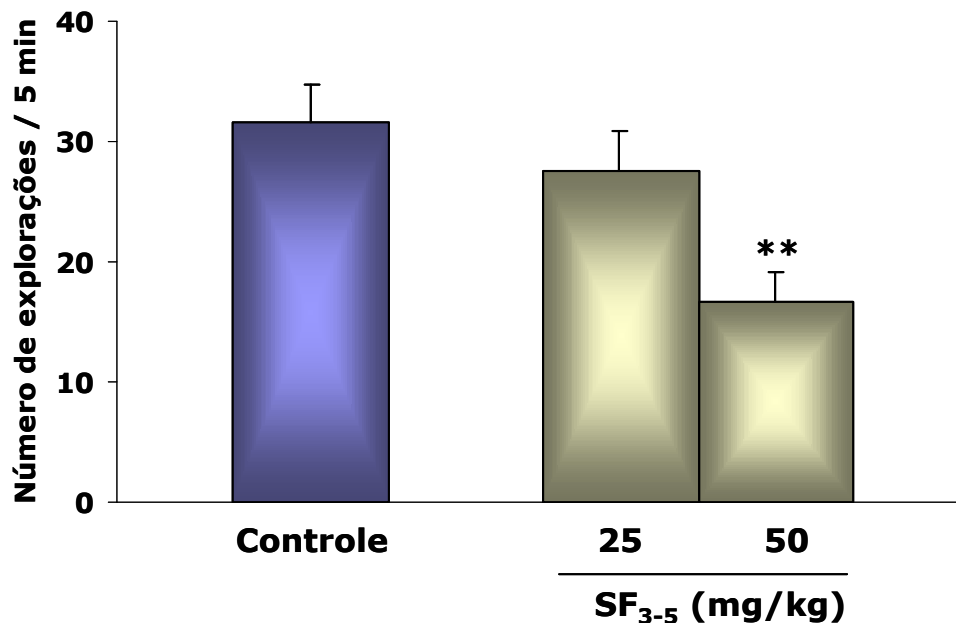
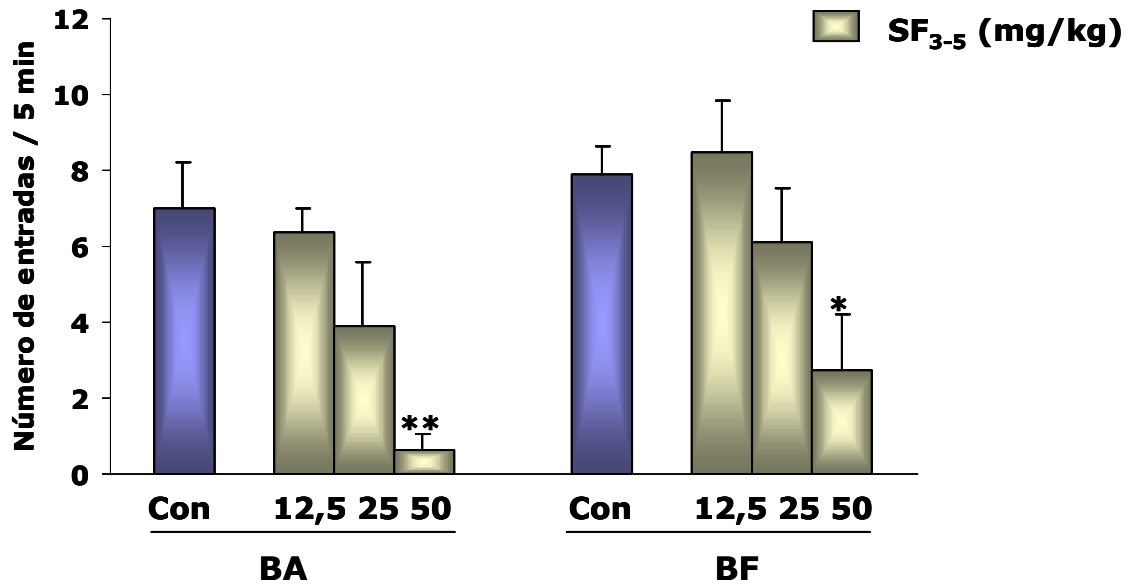


Gráfico 2. Efeito de SF₃₋₅ no teste da placa perfurada em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de explorações durante um período 5 min. **p < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

- Teste do labirinto em cruz elevado – plus-maze

Este modelo de ansiedade tem sido extensivamente utilizado para a avaliação de novas drogas ansiolíticas e para investigar as bases psicológicas e neuroquímicas da ansiedade. Um agente ansiogênico aumenta o número de entradas e o tempo de permanência no braço fechado. Os animais tratados com SF₃₋₅ 25 e 50 mg/kg/i.p apresentaram comportamento de ansiedade permanecendo boa parte do tempo do teste (360 s) no braço fechado ($228,62 \pm 25,24$ **p < 0,01 e $274,75 \pm 12,12$ ***p < 0,001 vs Controle ($131,75 \pm 15,90$). Os dados estão demonstrados no Anexo C no Gráfico 3.

A



B

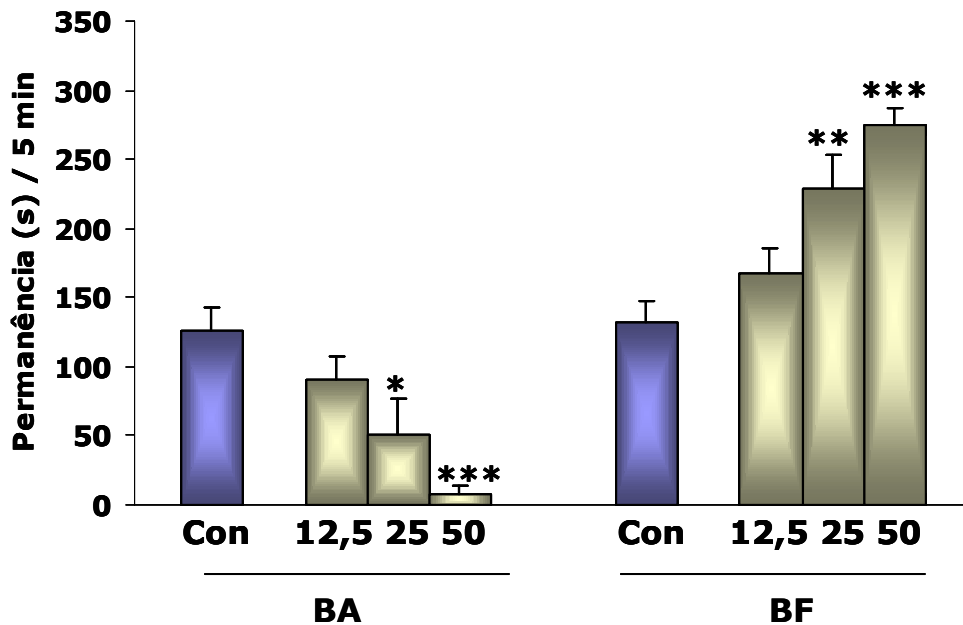


Gráfico 3. Efeito de SF₃₋₅ no número de entradas (A) e tempo de permanência (B) nos braços abertos (BA) e fechados (BF) do labirinto em cruz elevado durante um período de 5 minutos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs Controle (veículo), ANOVA, seguida de Student-Newman-Keul.

5.2.4. Teste de atividade hipno-sedativa

- Tempo de sono induzido por barbitúrico

O pré-tratamento com SF₃₋₅ 50 mg/kg/i.p. diminuiu significativamente ($40,00 \pm 3,16$ * $p < 0,05$; Anexo D e Gráfico 4) o duração do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg/i.p.) em relação ao grupo Controle ($65,62 \pm 3,96$).

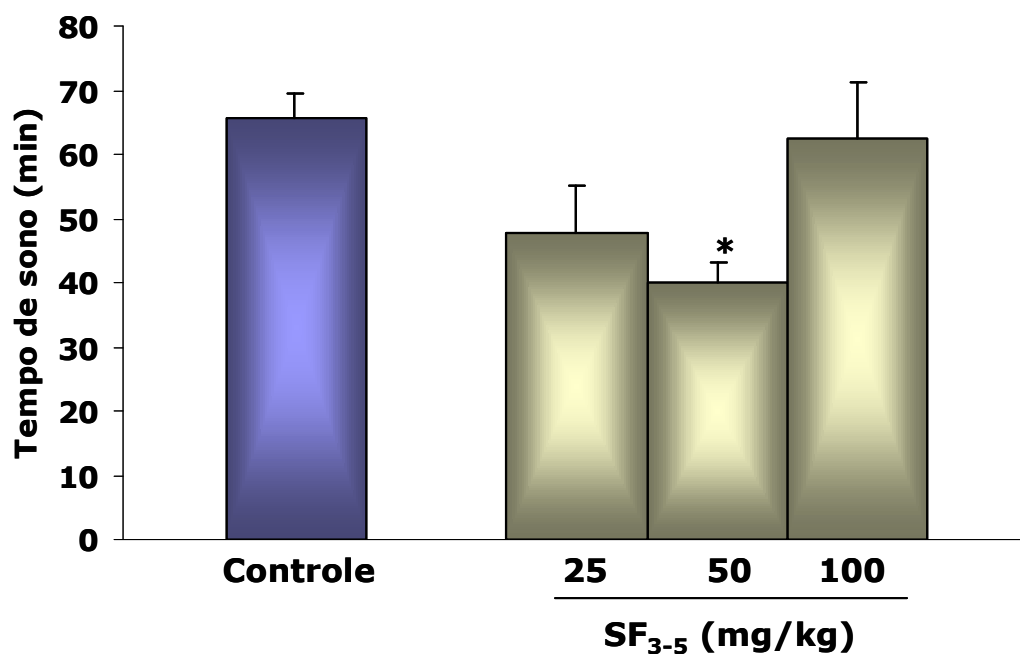


Gráfico 4. Efeito de SF₃₋₅ no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25, 50 e 100 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 8) do tempo de sono (min). * $p < 0,05$ vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.2.5. Teste de atividade antidepressiva

- Teste da natação forçada

As drogas antidepressivas, em geral, aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais no teste da natação forçada. Os animais que receberam SF₃₋₅ 50 mg/kg/i.p. apresentaram um menor tempo de imobilidade ($92,85 \pm 10,27$ **p < 0,01; Anexo E e Gráfico 5) em relação ao grupo Controle ($154,25 \pm 12,76$), mostrando que SF₃₋₅ pode promover um efeito do tipo antidepressivo.

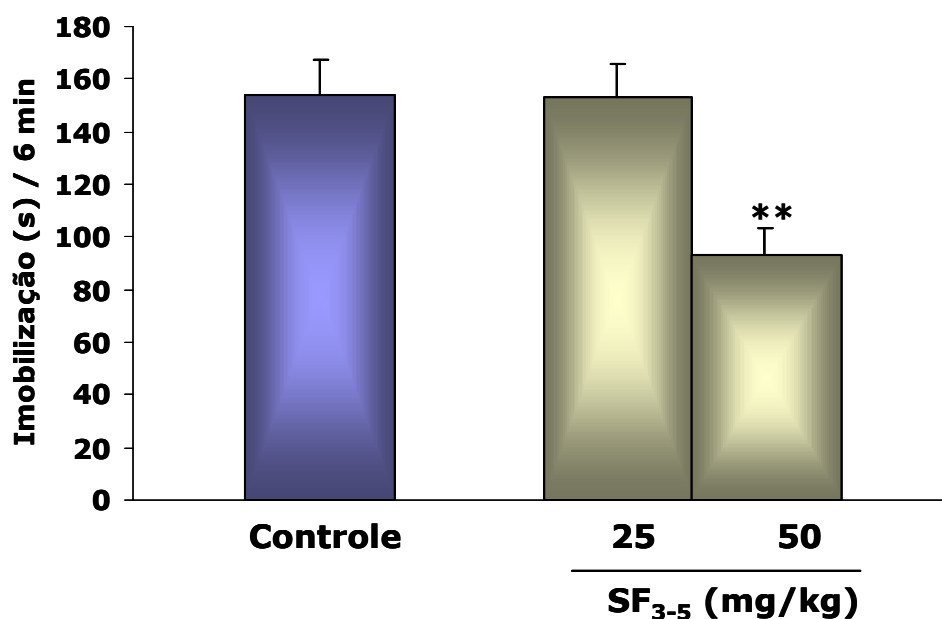


Gráfico 5. Efeito de SF₃₋₅ no teste da natação forçada em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de imobilização durante um período de 6 min. **p < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SF₃₋₅ SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DE CAMUNDONGOS

5.3.1. Avaliação do efeito pró-erétil de SF₃₋₅ em camundongos

Os animais tratados com SF₃₋₅ apresentaram três comportamentos distintos, já descritos anteriormente. SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p) promoveu ereção em 50 % (*p < 0,05), 75 % (**p < 0,001) e 62,5 % (**p < 0,01) dos animais tratados durante o período de observação de 30 minutos. O Anexo F sumariza as características das ereções promovidas por SF₃₋₅, loimbina, Apomorfina e Vardenafil (Anexo G, Gráfico 6)

Erection-like e *grooming* genital foram observados após os tratamentos com SF₃₋₅, loimbina, Apomorfina e Vardenafil. No entanto, somente no grupo tratado com SF₃₋₅ houve aumento significativo destes parâmetros (*p < 0,05) em relação com grupo Controle (Anexo H e Gráficos 7 e 8).

O efeito pró-erétil de SF₃₋₅ 25 mg/kg/i.p. foi bloqueado por Clonidina (**p < 0,001; Tabelas 5 e 6), por Haloperidol (**p < 0,001; Tabelas 7 e 8), pelo L-NAME (**p < 0,01; Tabela 9) e pelo Azul de Metileno (*p < 0,05; Tabela 10).

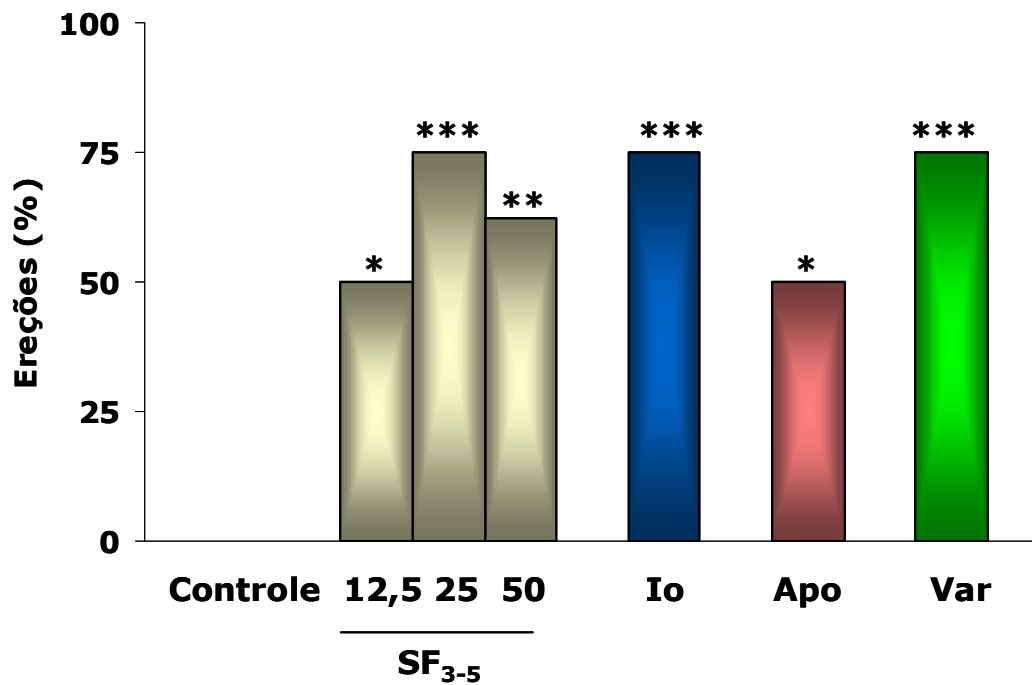


Gráfico 6. Efeito pró-erétil de SF₃₋₅, Ioimbina, Apomorfina e Vardenafil em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), Ioimbina 2 mg/kg/i.p. (Io), Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c. (Apo) ou Vardenafil 0,3 mg/kg/i.p. (Var) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como porcentagem de animais (n = 8) com ereção durante um período de observação de 30 min. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

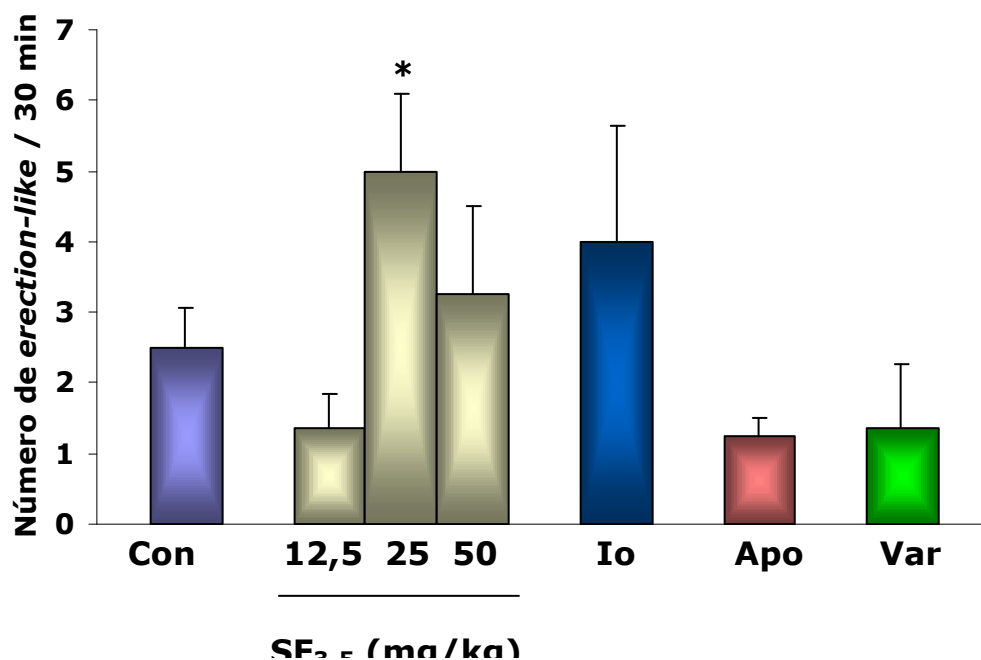


Gráfico 7. Efeito de SF₃₋₅, loimbina, Apomorfina, Vardenafil no parâmetro de erection-like em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), loimbina 2 mg/kg/i.p. (Io), Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c. (Apo) ou Vardenafil 0,3 mg/kg/i.p. (Var) 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de erection-like e durante um período de observação de 30 min. *p < 0,05 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

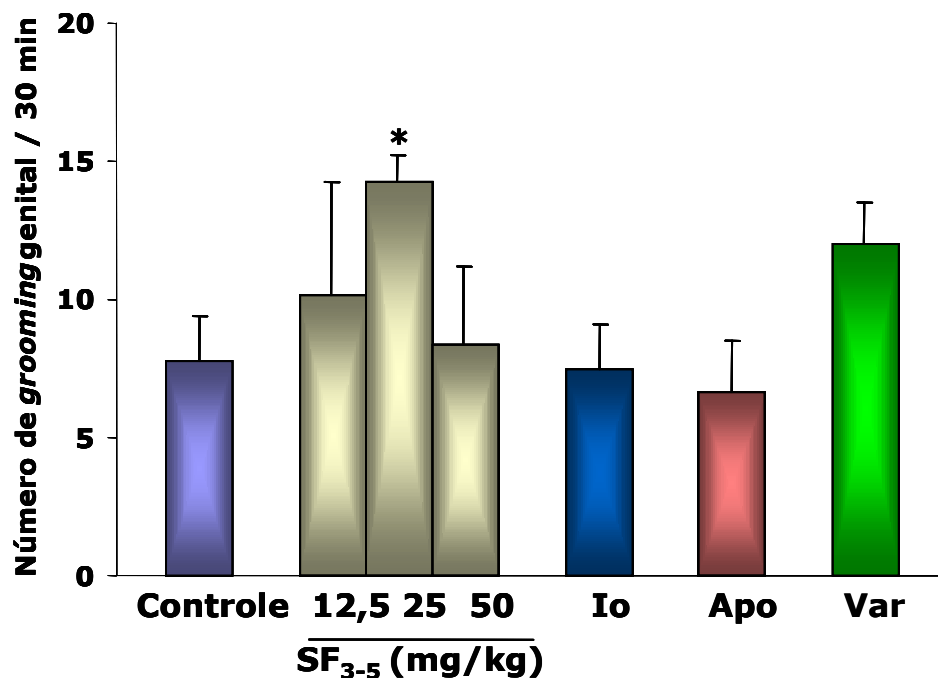


Gráfico 8. Efeito de SF₃₋₅, loimbina, Apomorfina, Vardenafil no parâmetro de grooming genital em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), loimbina 2 mg/kg/i.p. (Io), Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c. (Apo) ou Vardenafil 0,3 mg/kg/i.p. (Var) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de grooming genital e durante um período de observação de 30 min. *p < 0,05 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 5. Efeito da clonidina sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Latência 1^a ereção (s)	Nº de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF₃₋₅	25	556,63 ± 168,11	1,25±0,36**	75***
loimbina	2	698,62 ± 198,23	1,12±0,29*	75***
Clonidina	0,1	-	0,00 ± 0,00	0
+ loimbina	2	-	0,00±0,00 ^a	0 ^a
+ SF₃₋₅	25	-	0,00±0,00 ^b	0 ^b

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), loimbina 2 mg/kg/i.p., Clonidina 100 µg/kg/i.p. sozinha ou em combinação com loimbina ou SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção e do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 vs Controle, ^a*p* < 0,001 vs loimbina e ^b*p* < 0,001 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 6. Efeito da clonidina sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF ₃₋₅	25	3,87 ± 0,95*	14,25 ± 2,84*
loimbina	2	4,00 ± 1,64	7,50 ± 1,63
Clonidina	0,1	0,00 ± 0,00*	0,62 ± 0,32*
+ loimbina	2	0,00 ± 0,00 ^c	0,00±0,00 ^{***c}
+ SF ₃₋₅	25	0,37 ± 0,26 ^a	1,50 ± 0,70 ^{*b}

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), loimbina 2 mg/kg/i.p., Clonidina 100 µg/kg/i.p. sozinha ou em combinação com loimbina ou SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de *erection-like* e de *grooming* genital durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05 vs Controle, ^a*p* < 0,05 e ^b*p* < 0,001 vs SF₃₋₅ e ^c*p* < 0,001 vs loimbina, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 7. Efeito do haloperidol sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅.

Grupo	Dose	Latência 1 ^a ereção (s)	Nº de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF ₃₋₅	25	556,63 ± 168,11	1,25±0,36**	75***
Apomorfina	1,1	536,12 ± 249,15	1,25±0,25	50*
Haloperidol	2	-	0,00 ± 0,00	0
+ Apomorfina	1,1	-	0,00±0,00 ^b	0 ^b
+ SF ₃₋₅	25	-	0,00±0,00 ^a	0 ^a

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c., Haloperidol 2 mg/kg/i.p. sozinho ou em combinação com Apomorfina ou SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção e do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 vs Controle, ^a*p* < 0,001 vs SF₃₋₅ e ^b*p* < 0,001 vs Apomorfina, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 8. Efeito do haloperidol sobre a atividade de SF₃₋₅ nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos.

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF ₃₋₅	25	3,87 ± 0,95*	14,25 ± 2,84*
Apomorfina	1,1	4,00 ± 1,64	7,50 ± 1,63
Haloperidol	100	0,00 ± 0,00*	0,62 ± 0,32*
+ Apomorfina	1,1	0,12 ± 0,12*** ^c	1,12 ± 0,98* ^c
+ SF ₃₋₅	25	0,25 ± 0,16* ^a	1,12 ± 0,85* ^b

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c., Haloperidol 2 mg/kg/i.p. sozinho ou em combinação com Apomorfina ou SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de erection-like e de grooming genital durante um período de observação de 30 min. *p < 0,05 e ***p < 0,001 vs Controle, ^ap < 0,01 vs SF₃₋₅ e ^bp < 0,5 vs Apomorfina e ^cp < 0,001 vs Apomorfina, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 9. Efeito do L-NAME sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ (A) e sobre a atividade de SF₃₋₅ nos parâmetros comportamentais (B) em camundongos.

A

Grupo	Dose	Latência 1 ^a ereção (s)	Nº de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF ₃₋₅	25	663,87 ± 178,60	1,00±0,26**	75***
L-NAME	10	64,12 ± 45,40	0,25 ± 0,16	25
+ SF ₃₋₅	25	72,37 ± 72,37	0,12 ± 0,12 ^a	12,5 ^a

B

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF ₃₋₅	25	3,87 ± 0,78*	18,00 ± 3,75**
L-NAME	10	1,87 ± 0,51	5,12 ± 1,15
+ SF ₃₋₅		3,00 ± 1,15	5,12 ± 1,16 ^a

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), L-NAME 10 mg/kg/i.p. sozinho ou em combinação com SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção ou do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção ou do número de erection-like ou do número de grooming genital durante um período de observação de 30 min. **p < 0,01 e ***p < 0,001 vs Controle, ^ap < 0,01 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 10. Efeito do azul de metileno sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ (A) e sobre a atividade de SF₃₋₅ nos parâmetros comportamentais (B) em camundongos.

A

Grupo	Dose	Latência 1^a ereção (s)	Nº de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF ₃₋₅	25	663,87 ± 178,60	1,00±0,26**	75***
Azul de metileno	1	187,5 ± 187,50	0,12 ± 0,12	12,5
+ SF ₃₋₅	25	381,122 ± 203,71	0,50 ± 0,26	37,5 ^a

B

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	3,12 ± 0,78	7,62 ± 1,69
SF ₃₋₅	25	3,87 ± 0,78*	18,00 ± 3,75**
Azul de metileno	1	5,62 ± 0,12	15,50 ± 3,85
+ SF ₃₋₅	25	3,75 ± 1,65	12,87 ± 6,21

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), Azul de Metileno 1 mg/kg/i.p. sozinho ou em combinação SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção ou do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção ou do número de erection-like ou do número de grooming genital durante um período de observação de 30 min. *p < 0,05 e **p < 0,01 vs Controle, ^ap < 0,01 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.3.2. Avaliação do efeito da fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅.

A administração subcutânea de uma única dose de Fluoxetina (10 mg/kg, 30 min antes da observação) diminuiu o número de erection-like (*p < 0,01 vs Controle). Não foram observados efeitos significativos no número de grooming genital e 25 % dos animais apresentaram ereção (Tabela 11). O efeito pró-erétil de SF₃₋₅ foi reduzido em 50 % (*p < 0,05 vs SF₃₋₅) pela Fluoxetina bem como o número de grooming genital (**p < 0,01 vs SF₃₋₅).

Após 13 dias de tratamento, não houve alterações significativas nos parâmetros observados nos animais que receberam Fluoxetina. Os animais que foram tratados durante 13 dias com Fluoxetina e no 13^o dia receberam SF₃₋₅ apresentaram um menor número de erection-like e grooming genital, bem como uma redução do número de animais com ereção para 50 % (Tabela 12).

Tabela 11. Efeito da fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ (A) e nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos (B).

A

Grupo	Dose	Latência 1^a ereção (s)	Nº de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF ₃₋₅	25	666,87 ± 170,42	1,50±0,56*	75***
Fluoxetina	10	265,62 ± 204,35	0,25 ± 0,46	25
+ SF ₃₋₅	25	166,00 ± 108,32	0,75 ± 0,36	37,5 ^a

B

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF ₃₋₅	25	5,00 ± 1,08*	15,25 ± 2,82**
Fluoxetina	10	1,12 ± 0,35*	6,37 ± 1,55
+ SF ₃₋₅	25	0,50 ± 0,18	3,62 ± 2,25 ^a

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), Fluoxetina 10 mg/kg/s.c. sozinha ou em combinação SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção e do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção (A) ou do número de *erection-like* e de *grooming* genital (B) durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 vs Controle e ^a*p* < 0,05 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

Tabela 12. Efeito do tratamento durante 13 dias com Fluoxetina sobre a atividade pró-erétil de SF₃₋₅ (A)) e nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos (B).

A

Grupo	Dose	Latência 1^a ereção (s)	N^o de ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF ₃₋₅	25	666,87 ± 170,42	1,50±0,56*	75***
Fluoxetina ^(13 d)	10	86,12 ± 44,16	0,37 ± 0,18	37,5
+ SF ₃₋₅	25	496,12 ± 194,37	0,75 ± 0,25	50*

B

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF ₃₋₅	25	5,00 ± 1,08*	15,25 ± 2,82**
Fluoxetina ^(13 d)	10	0,75 ± 0,18	4,37 ± 1,14
+ SF ₃₋₅	25	2,12 ± 1,14	10,37 ± 2,22

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (25 mg/kg/i.p.), Fluoxetina 10 mg/kg/s.c. (^{13 d} durante 13 dias sozinha ou em combinação SF₃₋₅ 30 ou 60 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção e do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção (A) ou do número de *erection-like* e de *grooming* genital (B) durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05 e ****p* < 0,001 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO PRÓ-ERÉTIL DE SF₃₋₅ *IN VITRO*

5.4.1. Efeito de SF₃₋₅ na junção neuromuscular autonômica de canal deferente de camundongo.

O canal deferente é um tubo com inervação predominantemente simpática (STJÄRNE, 1989) que contrai fortemente durante a ejaculação para expelir de forma unidirecional o esperma através do ducto ejaculatório. Esta é uma preparação clássica para a elucidação da transmissão neuromuscular autonômica.

A neurotransmissão do canal deferente de roedor é estudada através da estimulação elétrica da inervação de preparações isoladas. Isso é feito através da aplicação de estímulos em pulsos simples ou trens de estímulo (VENTURA 1998). As contrações musculares são mediadas pela liberação de noradrenalina e ATP, agindo como co-transmissores (WITT, 1991).

A incubação dos tecidos com SF₃₋₅ afetou a resposta ao estímulo elétrico (SF₃₋₅ 8, 16 e 32 µg/mL; **p* < 0,05 vs Controle e SF₃₋₅ 64 µg/mL; ***p* < 0,01 vs controle). Os dados podem ser vistos no Anexo I e no Gráfico 9. Também houve inibição da contração induzida por Noradrenalina 10 µM (***p* < 0,001 vs Controle, Anexo J), no entanto no SF₃₋₅ não interferiu na contração induzida por ATP (Gráfico 10).

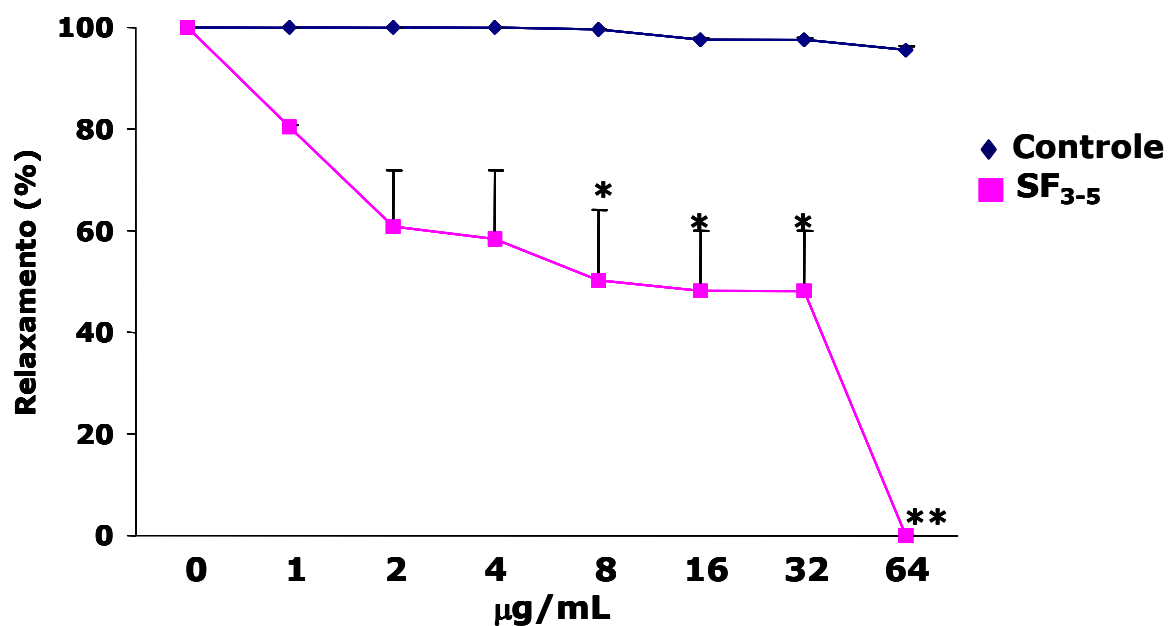


Gráfico 9. Efeito de SF₃₋₅ no canal deferente de camundongo estimulado eletricamente (ECE 0,1 Hz). Os dados estão dispostos como média ± erro padrão da média da porcentagem da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) obtida. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

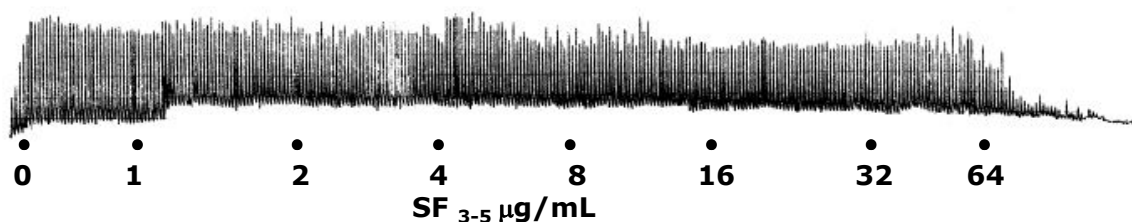


Figura 25. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por estímulo elétrico (0,1 Hz) em canal deferente de camundongos.

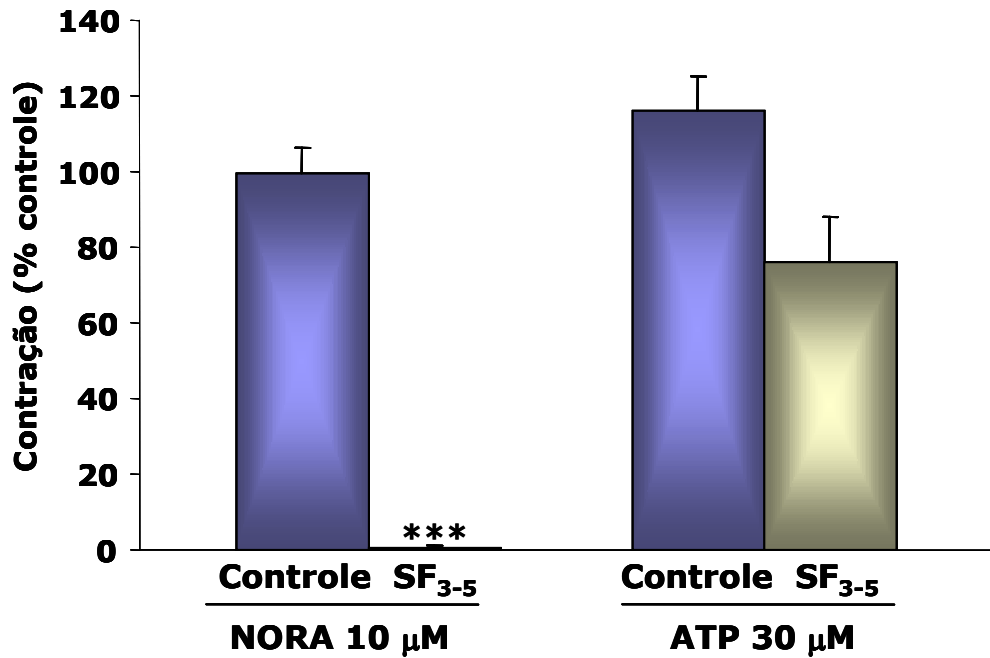


Gráfico 10. Efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Noradrenalina e ATP em canal deferente de camundongo. Os tecidos foram incubados com SF₃₋₅ 64 μg/mL ou DMSO (Controle – adicionado de forma isovolumétrica) e em seguida estimulados com Noradrenalina 10 μM (NORA) ou ATP 30μM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. ***p < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.4.2. Efeito de SF₃₋₅ no corpo cavernoso de coelhos

5.4.2.1. Efeito sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (ECE)

Em experimentos controle iniciais o efeito da estimulação por ECE, que evoca uma resposta nervosa não-adrenérgica não-colinérgica cujo maior componente é nitrérgico, isto é mediado por NO de origem neuronal. A resposta relaxante obtida na frequência máxima utilizada (16 Hz) foi de $61,22 \pm 9,18$ % e de $70,33 \pm 1,40$ % para a frequência mínima (2 Hz) . A incubação dos tecidos com SF₃₋₅ afetou a resposta ao ECE na frequência mínima estudada (SF₃₋₅ 30 µg/mL; $46,88 \pm 0,73$ %; * $p < 0,05$ vs controle e SF₃₋₅ 100 µg/mL; $40,38 \pm 9,62$; ** $p < 0,01$ vs controle DMSO). Os dados podem ser vistos no Anexo L e no Gráfico 11.

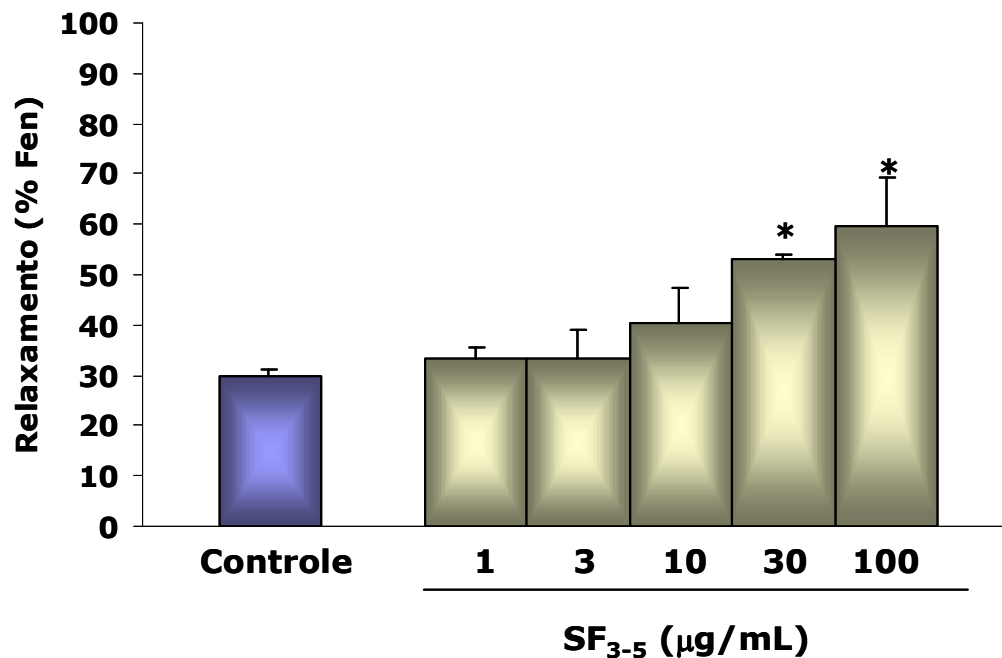


Gráfico 11. Aumento do relaxamento induzido por ECE (2 Hz) por SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com Fenilefrina 10 µM. * $p < 0,05$ vs Controle. ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

5.4.2.2. Efeito sobre a contração induzida por Fenilefrina 10 μ M

A resposta relaxante máxima induzida por SF₃₋₅ em tiras de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com Fenilefrina 10 μ M foi de $5,69 \pm 7,64$ % (SF₃₋₅ 300 μ g/mL; $**p < 0,01$ vs Controle), como visto no Anexo M e no Gráfico 12. A Figura 26 mostra o relaxamento e a recuperação do tecido após um período de 30 minutos de lavagem. Em tecidos incubados com L-NAME 100 μ M houve relaxamento total (SF₃₋₅ 300 μ g/mL; $***p < 0,001$ vs Controle, Anexo M e Gráfico 14). Nos tecidos incubados com ODQ 10 μ M a resposta relaxante máxima foi de $2,26 \pm 5,25$ % (SF₃₋₅ 300 μ g/mL; $**p < 0,01$ vs Controle, Anexo N e Gráfico 15). A resposta máxima em tecidos incubados com TTX 1 μ M foi $6,66 \pm 0,00$ % (SF₃₋₅ 100 μ g/mL; $**p < 0,01$ vs Controle, Anexo O e Gráfico 16). A pré-incubação com Glibenclamida 100 μ M, assim como com Atropina 10 μ M, também levou ao relaxamento máximo dos tecidos ($***p < 0,001$ vs Controle, Anexo P e Gráfico 17 e $**p < 0,01$ vs Controle, Anexo R e Gráfico 19, respectivamente). SF₃₋₅ 300 μ g/mL levou a um relaxamento de $3,57 \pm 7,14$ % nos tecidos pré-incubados com Apamina+Caribdotoxina 0,1 μ M ($**p < 0,01$ vs Controle, Anexo Q e Gráfico 18).

A incubação dos tecidos com Ácido Niflúmico 100 μ M levou a um incremento da resposta de SF₃₋₅ nas doses de 1 μ g/mL ($34,09 \pm 11,37$ %, $***p < 0,001$ vs SF₃₋₅ e vs Controle), 3 μ g/mL ($7,57 \pm 7,57$ %, $***p < 0,001$ vs SF₃₋₅ e vs Controle) e 10 μ g/mL ($0,00 \pm 0,00$ %, $***p < 0,00$ vs SF₃₋₅ e vs Controle). Estes dados estão demonstrados no Anexo S e no Gráfico 20.

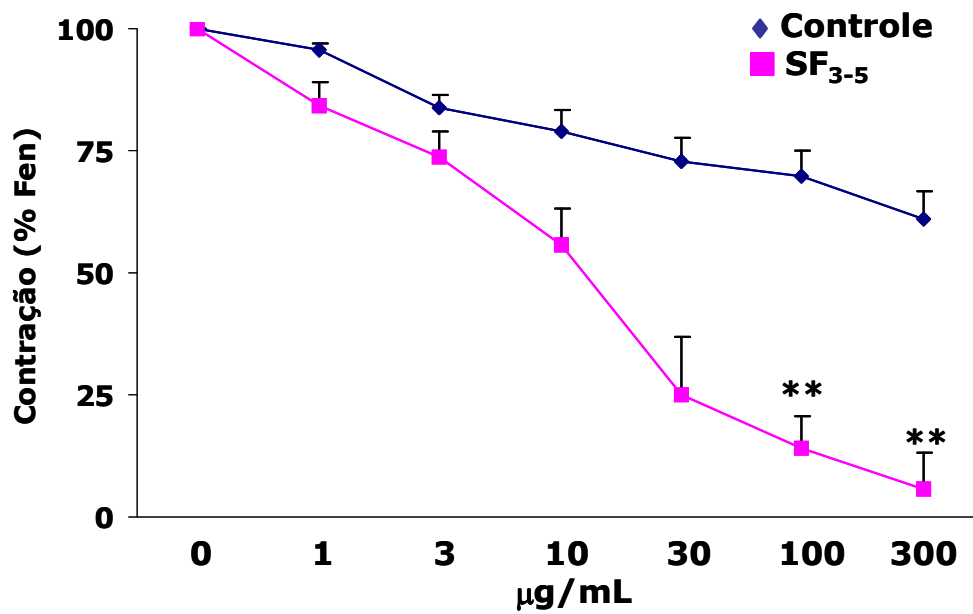


Gráfico 12. Curva dose-resposta de SF₃₋₅ na contração induzida Fenilefrina 10 µM (Fen) no corpo cavernoso de coelhos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). **p* < 0,05, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (veículo).

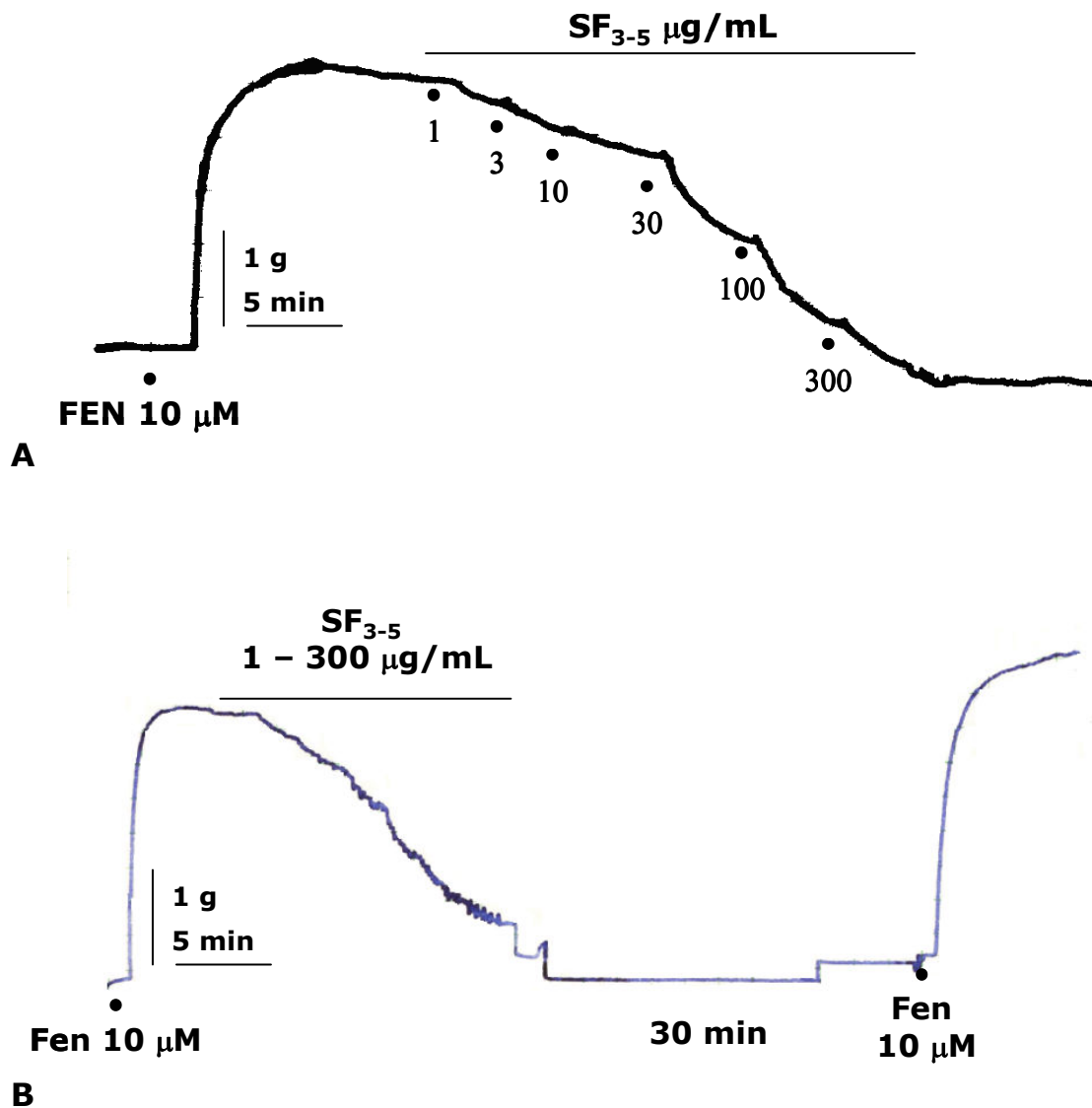


Figura 26. A. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ (A) na contração induzida por Fenilefrina 10 μM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos. B. Recuperação do tecido após um período de 30 min de lavagem.

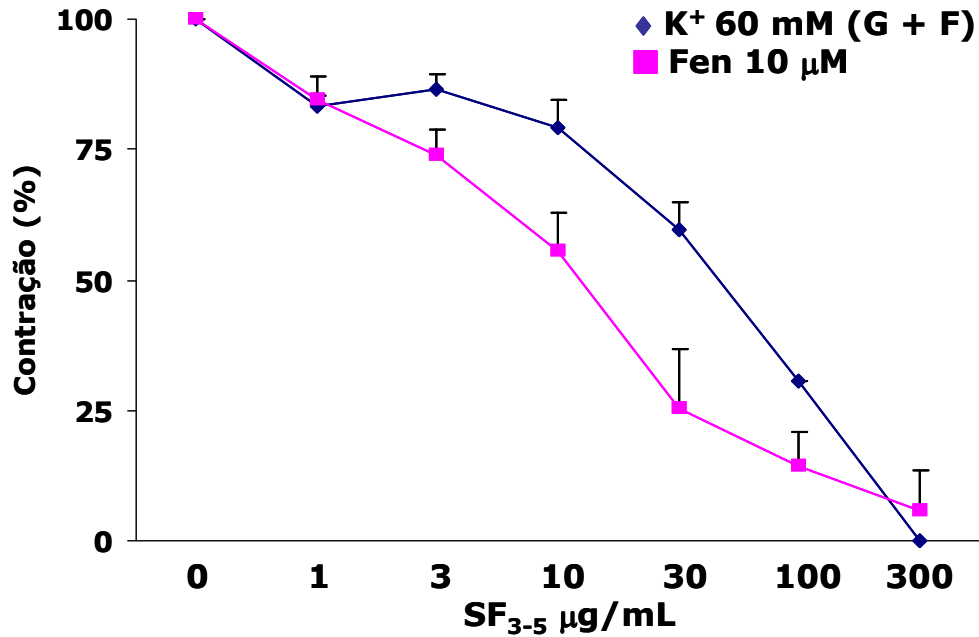


Gráfico 13. Efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) e na contração induzida por K⁺ 60 mM na presença de Guanetidina 10 µM (G) e Fentolamina 10 µM (F) em corpo cavernoso de coelhos.

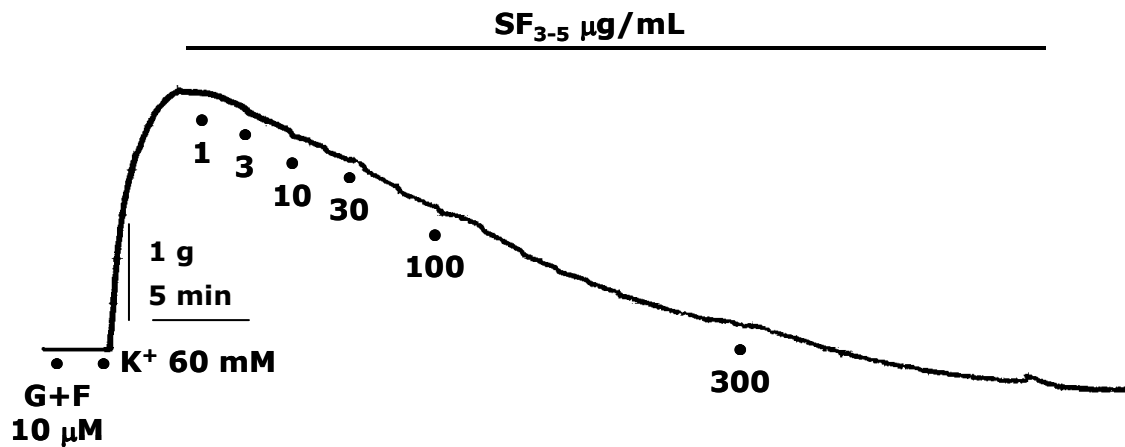


Figura 27. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ (A) na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) e na contração induzida por K⁺ 60 mM na presença de Guanetidina 10 µM (G) e Fentolamina 10 µM (F) em corpos cavernosos de coelhos.

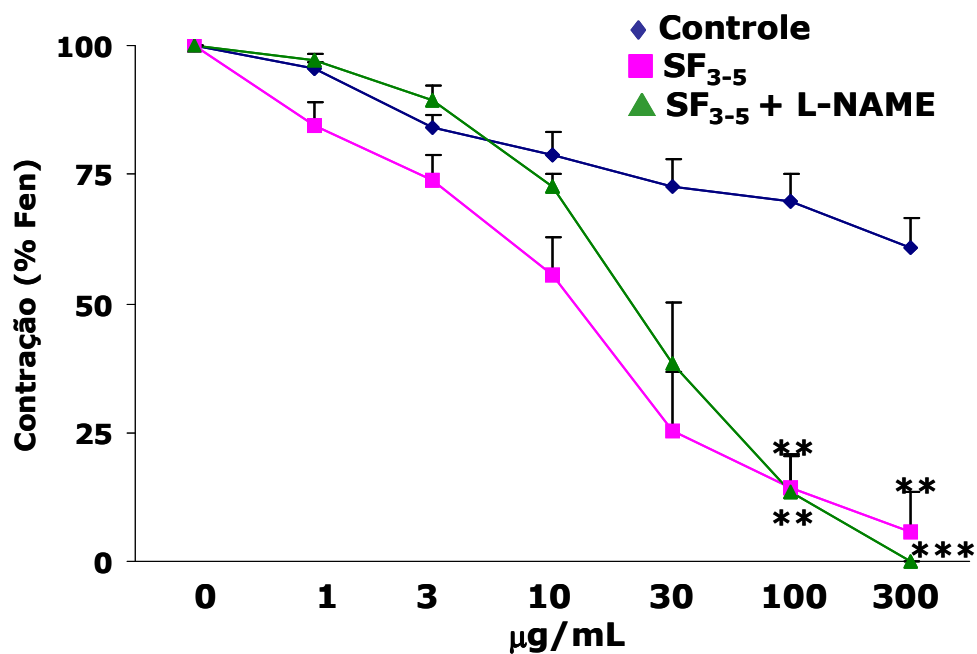


Gráfico 14. Efeito do L-NAME no relaxamento do corpo cavernoso induzido de coelhos por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. **p < 0,01 e ***p < 0,001, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

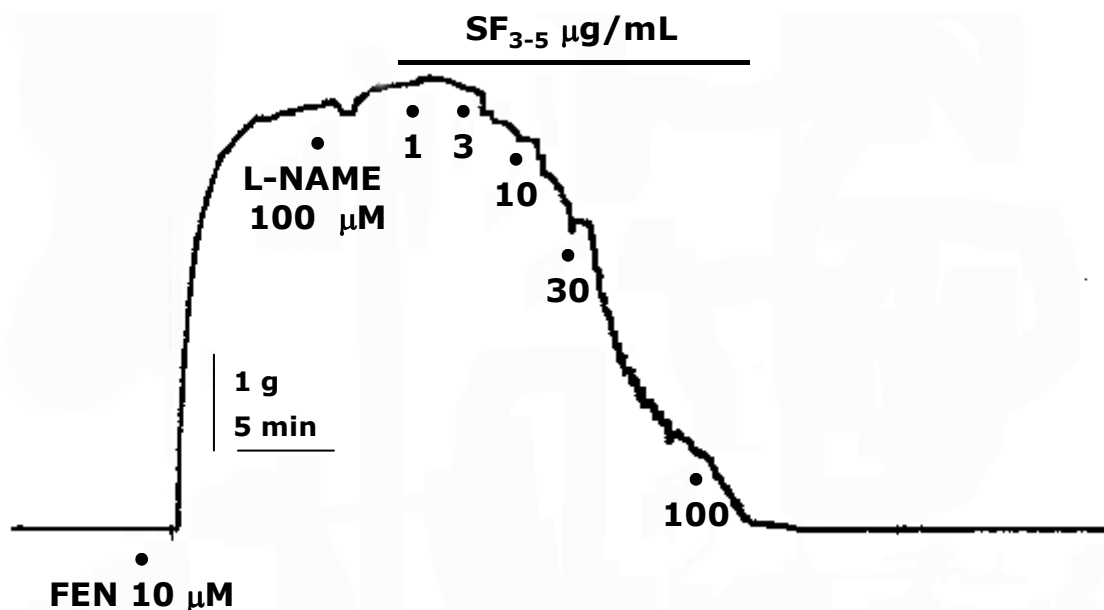


Figura 28. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de L-NAME 100 µM.

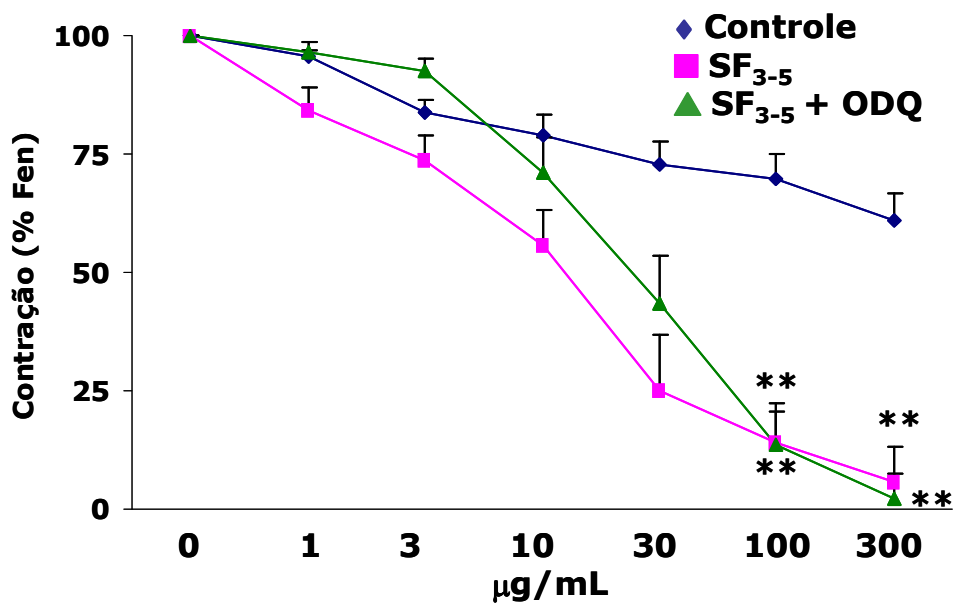


Gráfico 15. Efeito do ODQ no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).**p < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

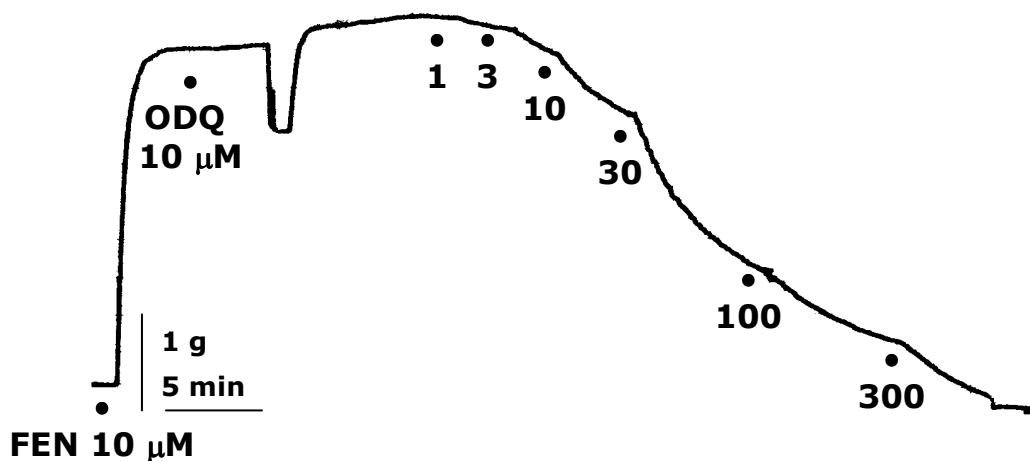


Figura 29. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de ODQ 10 µM.

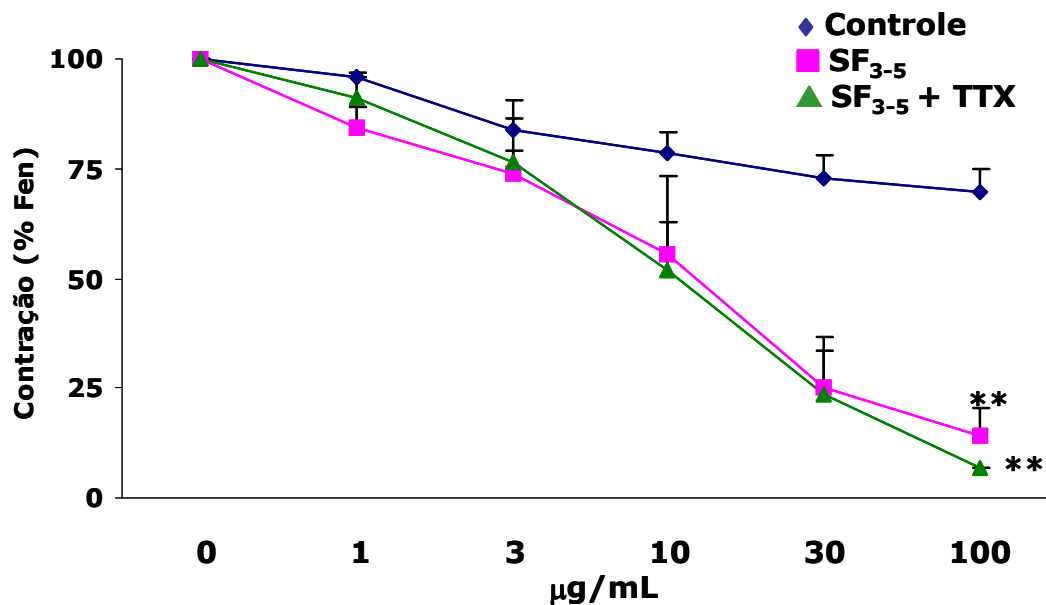


Gráfico 16. Efeito da TTX no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).**p < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

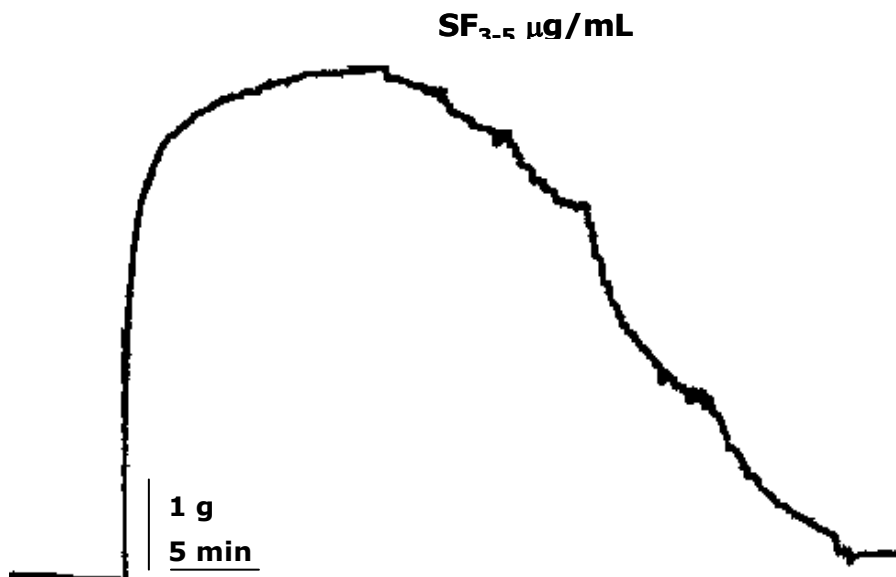


Figura 30. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de TTX 1 µM.

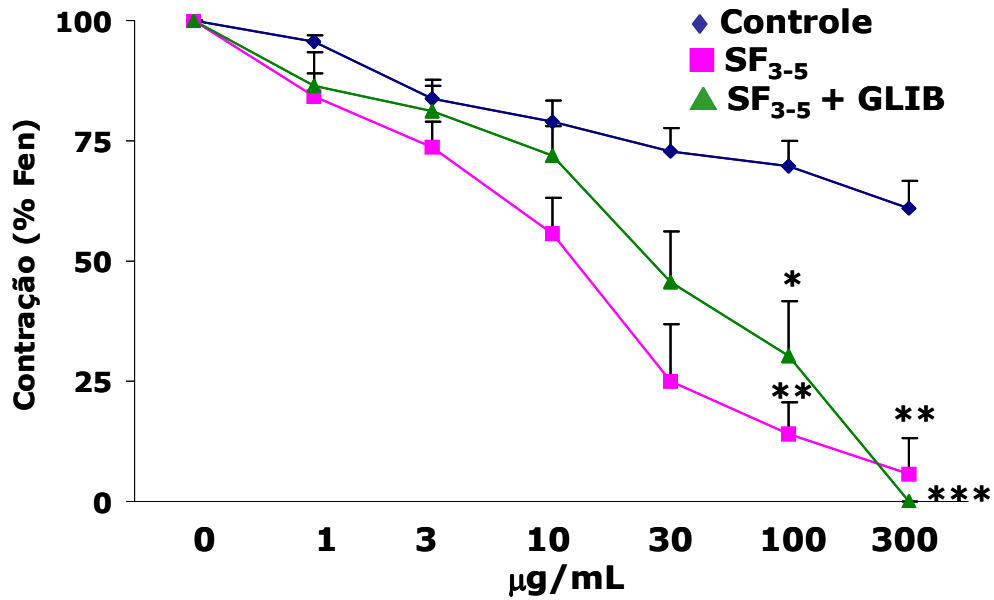


Gráfico 17. Efeito da Glibenclamida no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

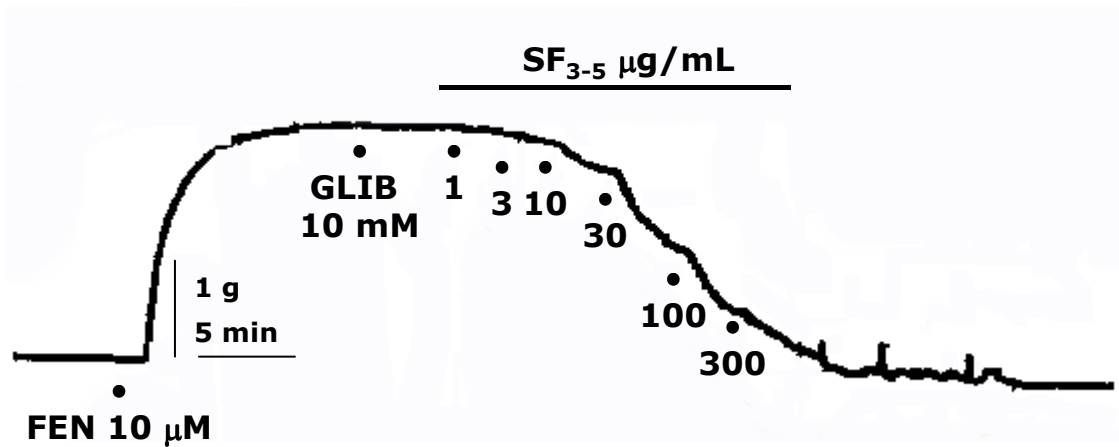


Figura 31. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Glibenclamida (GLIB) 10 mM.

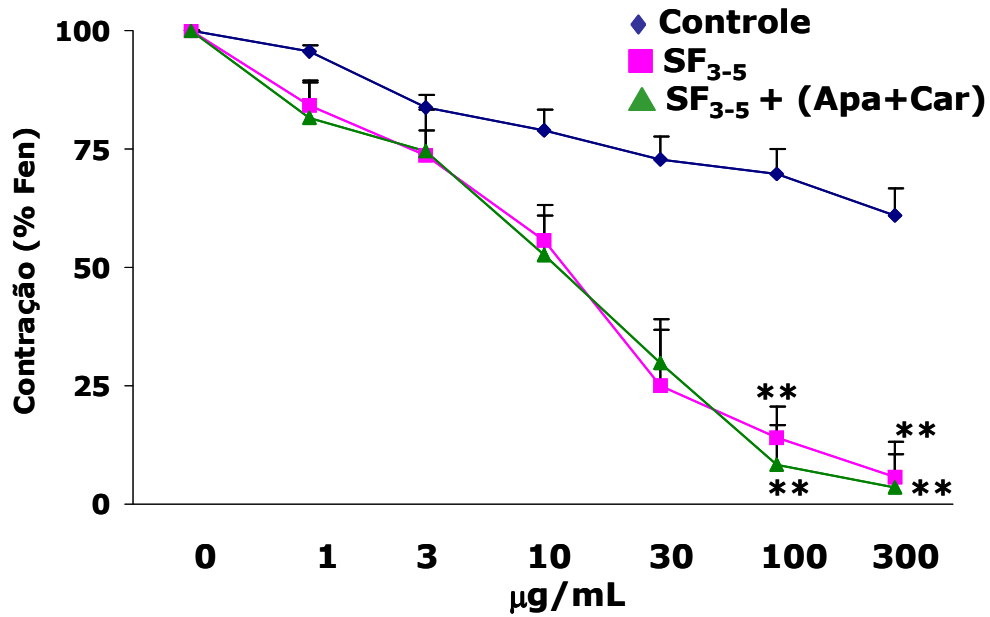


Gráfico 18. Efeito da Apamina (Apa) + Caribdotoxina (Car) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).**p < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (veículo).

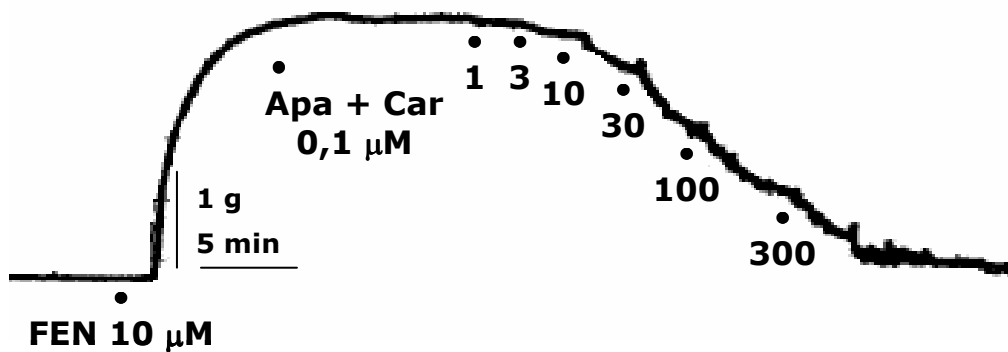


Figura 33. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Apamina (Apa) e Caribdotoxina (Car) 0,1 µM.

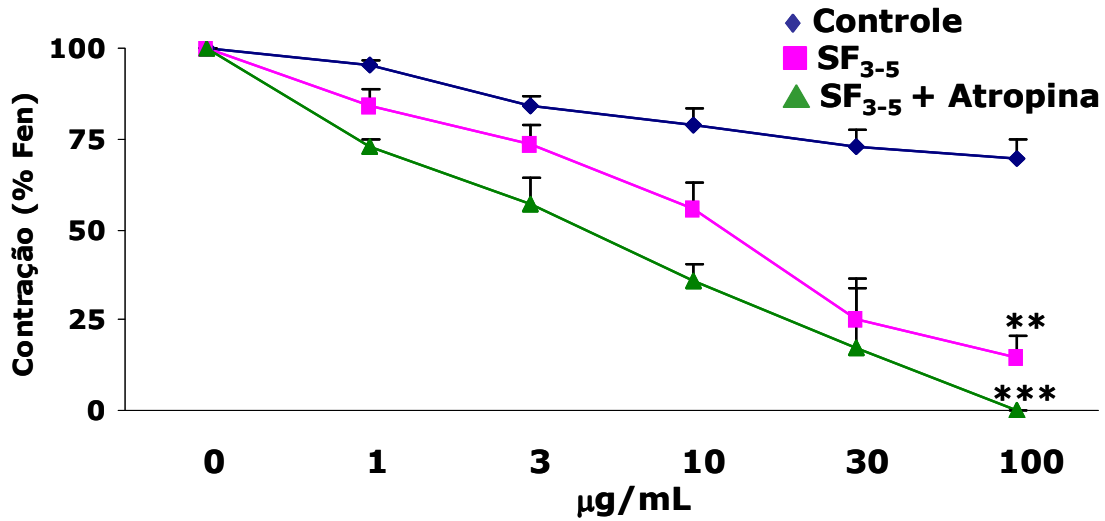


Gráfico 19. Efeito da Atropina no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).**p < 0,01 e ***p < 0,001, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isvolumétrica).

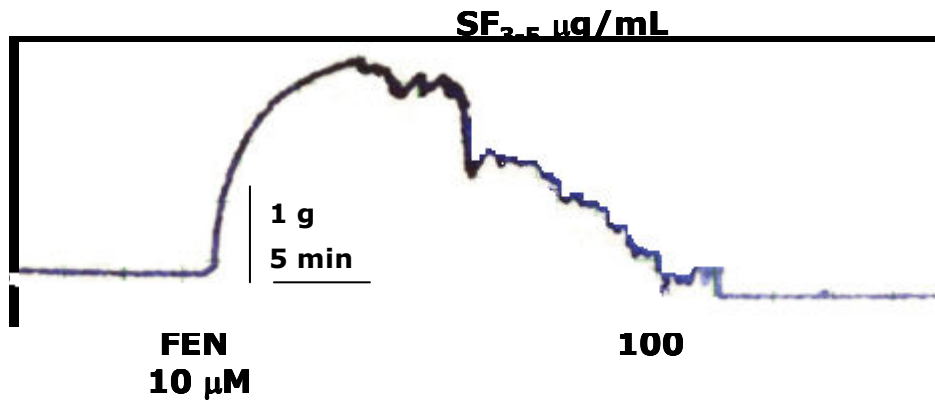


Figura 33. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração do corpo cavernoso de coelhos induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Atropina (Atrop) 10 µM.

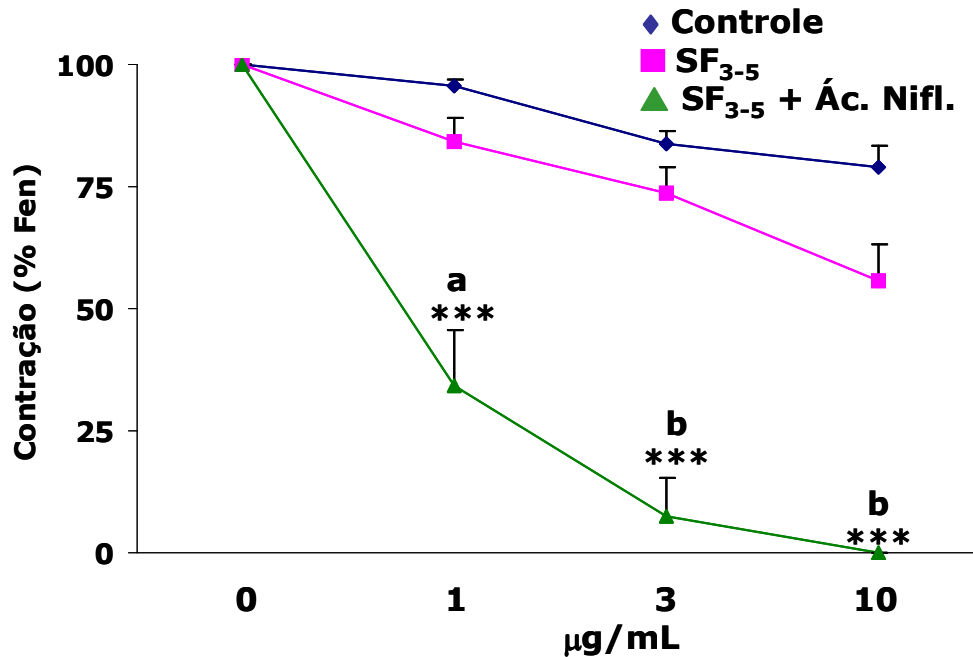


Gráfico 20. Efeito do Ácido Niflúmico (Ac. Nifl) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).***p < 0,001 vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica), ^ap < 0,01 e ^bp < 0,001 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul .

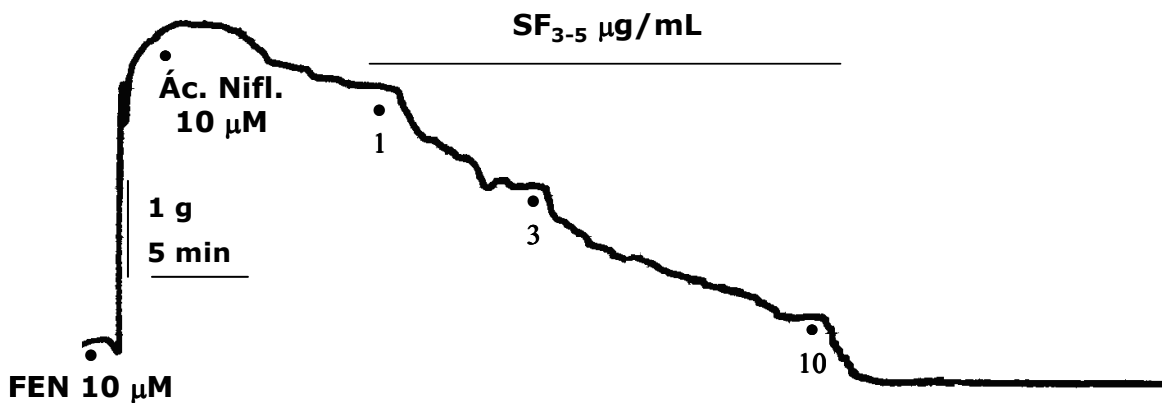


Figura 34. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 µM (Fen) em corpos cavernosos de coelhos na presença de Ácido Niflúmico (Ác. Nifl.) 10 µM.

5.4.2.3. Efeito sobre a contração induzida por K^+ 60 mM

A pré-incubação com SF_{3-5} inibe a contração do corpo cavernoso induzida por K^+ 60 mM. A resposta relaxante máxima induzida por SF_{3-5} foi de $30,73 \pm 17,10$ % (SF_{3-5} 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $*p < 0,01$ vs Controle), como visto no Anexo T e na Figura 35.

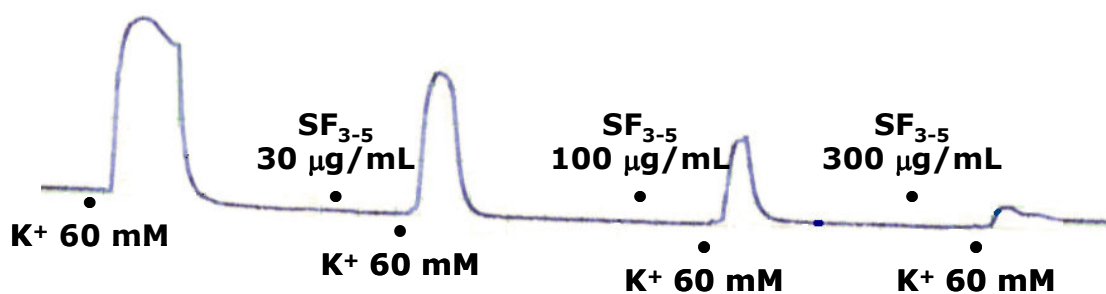


Figura 35. Registo fisiográfico representativo do efeito da pré-incubação com SF_{3-5} na contração induzida por K^+ 60 mM em corpos cavernosos de coelhos.

5.2.2.4. Efeito sobre a contração induzida por $\text{PGF}_{2\alpha} 10^{-3} \text{ M}$

Nos tecidos incubados com Nifedipina $10 \mu\text{M}$ e EGTA $100 \mu\text{M}$ a resposta relaxante máxima foi de $52,45 \pm 8,05 \%$ ($\text{SF}_{3-5} 300 \mu\text{g/mL}$; $***p < 0,01$ vs Controle, Anexo U e Gráfico 21).

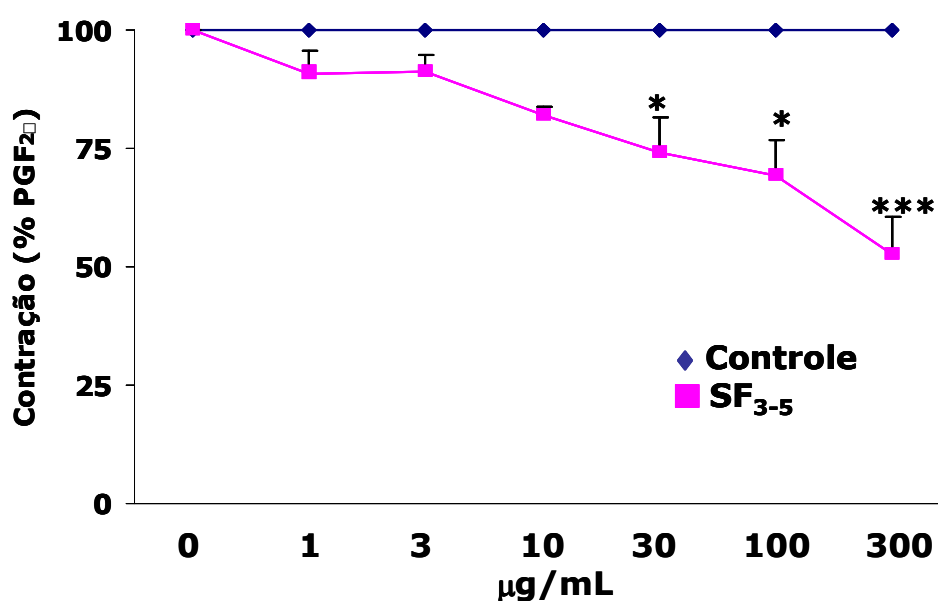


Gráfico 21. Efeito de SF_{3-5} no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos em resposta à contração induzida por $\text{PGF}_{2\alpha} 10^{-3} \text{ M}$ na presença de Nifedipina $10 \mu\text{M}$ e EGTA $100 \mu\text{M}$. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4$) da porcentagem da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) obtida. $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

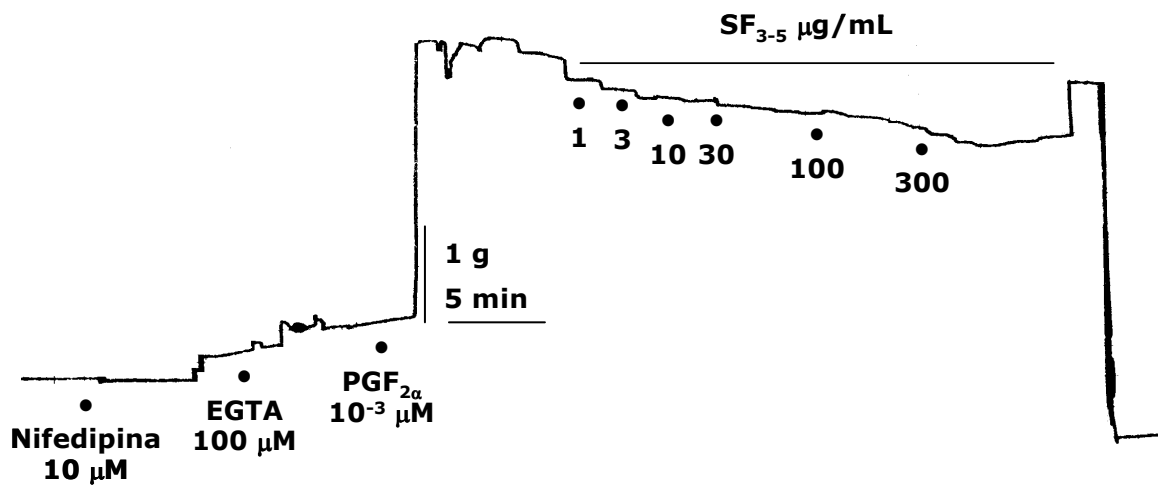


Figura 36. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por PGF_{2α} 10⁻³ M em corpos cavernosos de coelhos na presença de Nifedipina 10 μM e EGTA 100 μM.

5.2.3. Efeito sobre a contração do corpo cavernoso humano induzida por Fenilefrina 10 μM .

A resposta relaxante máxima induzida por SF₃₋₅ em tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídos com Fenilefrina 10 μM foi de 100 % (SF₃₋₅ 100 $\mu\text{g/mL}$; * $p < 0,01$ vs Controle), como visto na Anexo V e no Gráfico 22.

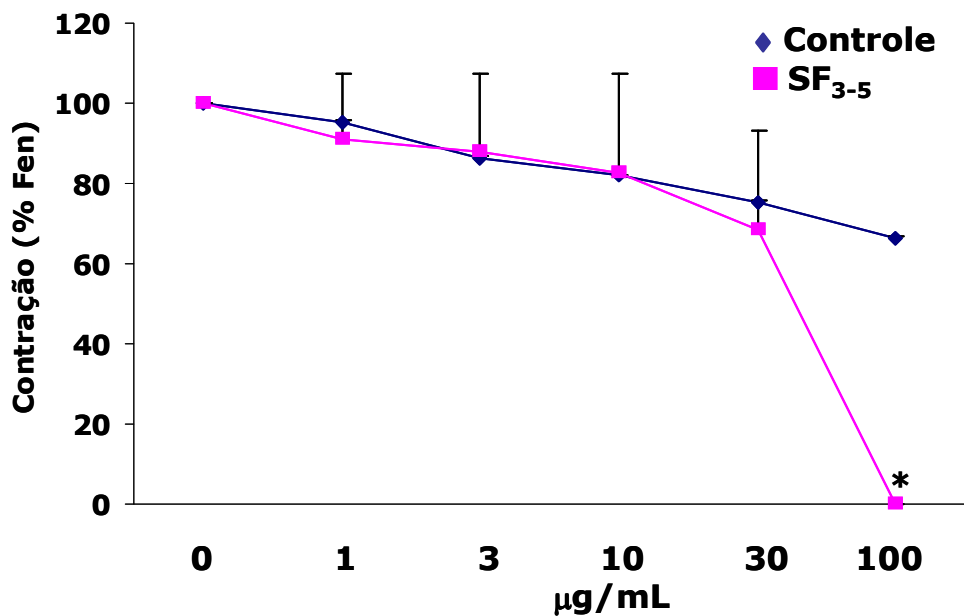


Gráfico 22. Efeito de SF₃₋₅ no corpo cavernoso humano pré-contraído com Fenilefrina 10 μM (Fen). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4$) da porcentagem da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) obtida. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4$). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

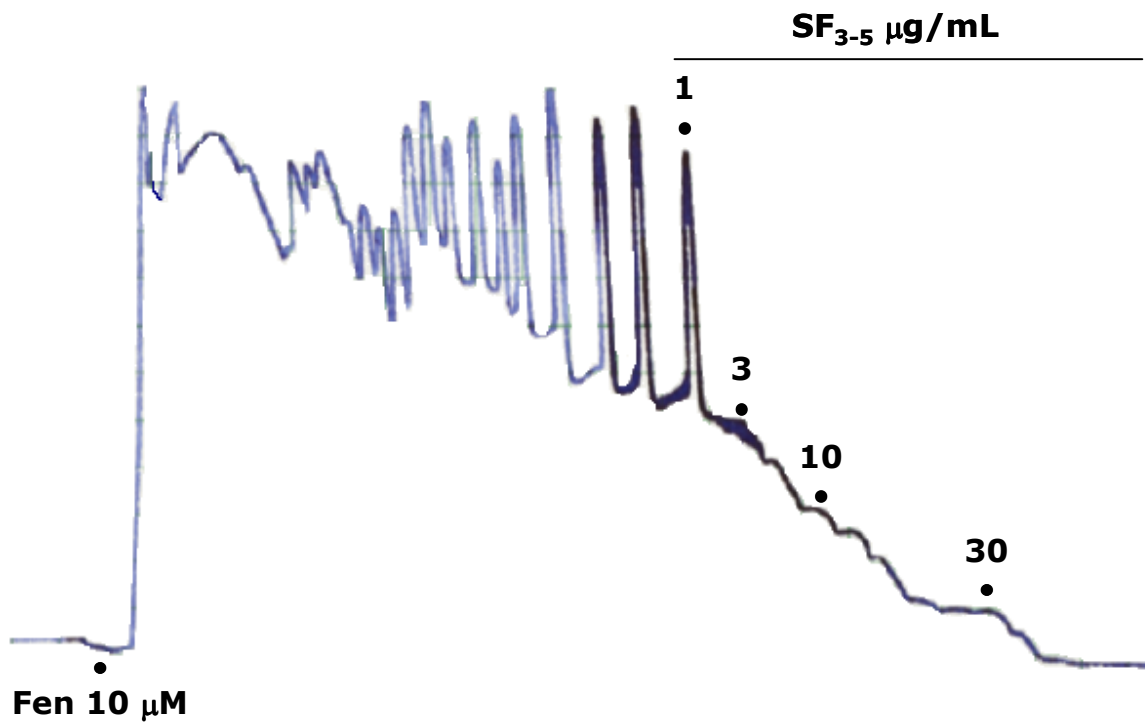


Figura 37. Registro fisiográfico representativo do efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Fenilefrina 10 μM (Fen) em corpos cavernosos humanos.

6 Discussão

As drogas que provocam alterações na mente, especialmente extraídas de plantas, sempre fascinaram o homem (CARLINI, 2003). No entanto, pouca atenção tem sido dada pela comunidade científica ao potencial benéfico das plantas com atividade psicoléptica e psicoanaléptica (DELAY, 1961).

Muitas razões contribuíram para a introdução das plantas na terapêutica, entre elas o fato (errôneo) da população acreditar que a origem natural torna o produto menos tóxico do que as drogas sintéticas. Além disso, a indústria farmacêutica passou a entender que as plantas podem ser um bom negócio, uma vez que a população é disposta a utilizar formas alternativas de terapias (CARLINI, 2003).

Um estudo de Eisenberg et al. (1993) mostrou que em torno de 28 % dos cidadãos americanos utilizam tratamentos alternativos para alterações do SNC como insônia, cefaléia, ansiedade e depressão e dentre estes, 3 % utilizam medicamentos obtidos de plantas.

A natureza proporciona uma variedade de plantas possuidoras de propriedades estimulantes do SNC, entre as plantas brasileiras 103 estão relacionadas como excitatórias, analépticas, antiexaustivas e afrodisíacas (MORS ET AL., 2000).

O estudo químico da fração rica em alcalóides extraída da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr. (SF₃₋₅) demonstrou a presença de três alcalóides indólicos: uleína, *nor*-uleína e tetrahydro-3,14,4,21-elipticina. Um estudo de Banerjee e Lewis (1954) com o caule de *Aspidosperma ulei* mostrou efeito relaxante da musculatura uterina, ação estimulante central, antagonismo do efeito hipertensivo da adrenalina e atividade amebicida *in vitro*. Além deste relato farmacológico existem somente outros dois artigos publicados relatando a presença da uleína, da 1,2-dihidro-olivacina e da

1,2-dihidro-elipticina na casca da raiz de *Aspidosperma ulei* (SCHMUTZ ET AL., 1957; LEHNER E SCHMUTZ, 1961).

- **Aspectos toxicológicos de SF₃₋₅**

Para o lançamento de um fitoterápico no mercado nacional deve-se comprovar, entre outras exigências, a segurança e eficácia do produto (RIBEIRO ET AL., 2005). Esta comprovação pode ser estabelecida através da realização de testes de segurança (toxicologia pré-clínica e clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica). Vale ressaltar que, nos últimos anos, esta opção fez com que houvesse uma aproximação das empresas com os centros de pesquisas brasileiros, possibilitando a realização de parcerias para a execução de alguns desses estudos (ALVES, 2004).

A DL₅₀ de SF₃₋₅, administrada por via intraperitoneal, foi estabelecida utilizando camundongos. O valor encontrado foi de 400 ± 40 mg/kg. No presente estudo, as doses utilizadas para tratamento com SF₃₋₅, definidas após estudos preliminares em nosso laboratório, foram de 25 e 50 mg/kg, correspondendo a 1/16 e 1/8 da DL₅₀, respectivamente. Em um único experimento foi utilizada a dose de 100 mg/kg.

Nas doses utilizadas, os animais tratados não apresentaram sinais de toxicidade ou comportamento anormal, mostrando que as doses empregadas são seguras e livres de toxicidade.

Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBUEGER & HOSTETTMANN, 1991).

Dentre estes bioensaios, encontra-se a toxicidade sobre *Artemia sp.*, que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais utilizando este teste de monitorização de estudos fitoquímicos (SIQUEIRA ET AL., 1998). A *Artemia sp.* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia sp.* com atividades parasiticida (SAHPAZ ET AL., 1994), antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACRAE ET AL., 1998) entre outras.

Neste teste, a CL_{50} encontrada foi de 3,94 $\mu\text{g/mL}$ [1,84 – 6,92], cerca de cinco vezes mais tóxica do que o dicromato de potássio, conhecida substância tóxica para *Artemia sp.* Este resultado pode estar relacionado à presença da tetrahydro-3,14,4,21-elipticina, pois a elipticina e os seus análogos possuem comprovada ação citotóxica (HÄGG ET AL., 2004) ou à presença da uleína, uma vez que o extrato de *Aspidosperma tomentosum* (rico em uleína) mostrou ser ativo no teste de *Artemia sp.* além de atividade tripanosomicida (ABREU E SILVA ET AL., 2002).

- SF₃₋₅ e alterações no SNC

O uso de modelos experimentais em diversas disciplinas médicas é bastante difundido, desde a introdução da patologia experimental por Claude Bernard, no século passado. O campo da Farmacologia Comportamental usa conceitos derivados tanto da Farmacologia quanto da Psicologia para estudar as interações entre drogas e comportamentos (LAPA ET AL., 2003) e o camundongo tornou-se rapidamente o mamífero preferido para os estudos comportamentais em neurociências (BURNS-CUSATO ET AL., 2004). Apesar da variedade de animais disponíveis, o camundongo possui características únicas além de possuir semelhanças genéticas e comportamentais com os humanos (VAN MEER & RABER, 2005).

Como SF₃₋₅ é constituída de alcalóides indólicos e foi relatada uma ação estimulante central em camundongos e coelhos tratados com alcalóides extraídos do caule de *Aspidosperma ulei* (BANERJEE & LEWIS, 1954), foram realizados testes que detectam atividade sobre o SNC a fim de evidenciar uma possível ação central em camundongos tratados com SF₃₋₅.

A atividade comportamental dos animais, especialmente roedores, em vários equipamentos de laboratório pode ser resultado de diferentes tendências ou “impulsos”, isto é, pode ser uma atividade específica relacionada à exploração do ambiente ou à esquia de aspectos particulares do ambiente, ou ainda, simplesmente um atividade geral inespecífica (LAPA ET AL, 2003)

No *screening* realizado para detectar atividade sobre o SNC, SF₃ mostrou aumentar a atividade locomotora dos animais, indicando estimulação central. No teste do campo aberto, houve um aumento da atividade locomotora espontânea sem, no entanto, alterar o tempo de permanência na barra giratória no teste de “*Rota-rod*”, ou seja, aumentou a motilidade dos animais sem alterar a coordenação motora.

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE), um dos mais populares modelos animais para o estudo da ansiedade, é baseado na aversão natural que os roedores apresentam aos lugares abertos (PELLOW & FILE, 1986). Neste modelo, os animais tratados com SF₃₋₅ apresentaram comportamento do tipo ansiogênico caracterizado pelo aumento do tempo de permanência nos braços fechados do LCE.

O teste da placa perfurada é uma medida do comportamento exploratório de roedores (FILE & WARDILL, 1975). Os mergulhos de cabeça dos camundongos são aceitos como um parâmetro de avaliação do estado de ansiedade do animal. Neste modelo, doses não sedativas de benzodiazepínicos e outras drogas ansiolíticas aumentam o número de explorações feitas pelos camundongos, enquanto os seus antagonistas diminuem (CRAWLEY, 1985). SF₃₋₅ diminuiu significativamente o número

de explorações, demonstrando uma atividade do tipo ansiogênica, como demonstrada no LCE.

Este efeito do tipo ansiogênico não pode ser relacionado a depressão motora uma vez que SF₃₋₅ induziu aumento da atividade locomotora espontânea como demonstrado no teste do campo aberto. Pode-se especular se esta atividade não estaria relacionada à ativação de receptores 5-HT_{1B/2C}, atuação como agonista inverso dos receptores para benzodiazepínicos ou antagonismo do receptor GABA_A (RODGERS ET AL., 1997). Pode-se ainda avaliar um aumento nas concentrações de GMP_c intracelular, uma vez que já foi sugerido que a via NO/GMP_c hipocampal é responsável por alterações no humor (KURT ET AL., 2004).

Houve redução no tempo de sono induzido por pentobarbital nos animais pré-tratados com SF₃₋₅. As drogas estimulantes do SNC, em geral, reduzem a duração do sono induzido. No entanto, drogas metabolizadas no fígado podem alterar os parâmetros registrados como consequência de uma interação farmacocinética (LAPA ET AL., 2003).

O termo adaptógeno foi inicialmente utilizado por Lazarev em 1947 para definir uma substância que pode desenvolver um estado de resistência, permitindo o organismo trabalhar em diferentes situações de estresse. As plantas adaptógenas são capazes de aumentar a capacidade física do animal (CARLINI, 2003). Como consequência, existe uma melhora nas condições de saúde, que podem ser manifestadas como aumento da função cognitiva e aumento da performance sexual (CARLINI, 1989). Por outro lado, torna-se difícil saber se os benefícios são mediados diretamente pelo SNC ou pelo sistema endócrino (WAGNER ET AL., 1994).

O teste da natação forçada (PORSOLT ET AL., 1977) é extensamente utilizado para prever eficácia antidepressiva e adaptógena (BORSINI & MELI, 1988). O fenômeno comportamental observado neste procedimento parece ser resultado da exposição a uma situação inescapável, e o animal divide seu comportamento em

períodos de atividade vigorosa (comportamento de procura) e de imobilidade (comportamento de espera) (STERU ET AL., 1985). A imobilidade observada neste modelo significa um “comportamento de desespero” e drogas antidepressivas a antagonizam (FERNANDEZ-TERUEL ET AL., 1990).

Neste estudo, os animais tratados com SF₃₋₅ mostraram uma diminuição significativa na imobilidade induzida pelo nado forçado quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma atividade do tipo antidepressiva. Contudo, pode-se ainda relacionar este efeito ao aumento da atividade locomotora, uma vez que a mesma dose que levou a uma diminuição do tempo de imobilidade (50 mg/kg) promoveu aumento do número de cruzamentos no teste do campo aberto.

- Efeito pró-erétil de SF₃₋₅ in vivo

A disfunção erétil (DE) afeta uma grande fração da população adulta masculina e pode alterar a qualidade de vida dos pacientes e de suas parceiras (SPERLING ET AL., 2002). No Brasil, a DE é uma queixa comum afetando em algum grau cerca de 25 milhões de indivíduos do sexo masculino (MOREIRA ET AL., 2001).

Apesar do sildenafil ser um agente farmacológico extremamente utilizado para o tratamento da DE, o seu uso possui contra-indicações, como a utilização concomitante com os nitratos (LUE, 2000). Esta droga também está associada ao risco cardiovascular em alguns pacientes, como aqueles com doença cardíaca coronariana grave e recentemente foram relatados casos de perda da visão em pacientes usuários (POMERANZ & BHAVSAR, 2005). Além do mais, formas alternativas de tratamento possuem interesse clínico, incluindo os extratos de plantas, que muitos pacientes preferem como modalidade terapêutica (GUIRGUIS, 1998).

A popularidade dos agentes fitoterapêuticos entre muitos pacientes e médicos contrasta com a escassez de evidências científicas que confirmem a efetividade, segurança e mecanismo de ação (SPERLING ET AL., 2002). Vários extratos de

produtos naturais têm sido utilizados extensivamente com o intuito de tratar a impotência (DEUTSCH ET AL., 1994). Um destes extratos, denominado “Quebracho” derivado do caule de *Aspidosperma quebracho blanco* tem sido utilizado durante séculos na América do Sul e foi introduzido, com esta indicação, na Europa no século XIX (GUIRGUIS, 1998).

Uma variedade de mecanismos tem sido descrita como alvos potenciais para o tratamento médico da DE, incluindo as fosfodiesterases, receptores dopaminérgicos centrais, receptores periféricos para prostaglandinas e receptores noradrenérgicos α (MORELAND ET AL., 2001). A fração SF₃₋₅ apresentou efeito estimulante central e a ioimbina, um alcalóide indólico antagonista dos receptores noradrenérgicos α_2 utilizado no tratamento da impotência masculina (TAM ET AL., 2001), também apresenta estimulação central (EROGLU & GUVEN, 1998; MATSUMOTO ET AL., 1997). O fato de SF₃₋₅ apresentar em sua composição três alcalóides indólicos e de mostrar efeito estimulante central levou-nos a avaliar uma possível atividade de SF₃₋₅ sobre o comportamento sexual de camundongos machos.

Os estudos sobre a fisiologia do músculo liso cavernoso aumentaram o número de drogas disponíveis para o tratamento da disfunção erétil (MAGGI ET AL., 2000). Muitos extratos de plantas são tradicionalmente utilizados em diferentes culturas com o objetivo de melhorar a performance sexual (CICERO ET AL., 2001). A pesquisa de produtos naturais pode ser guiada pelo conhecimento etnofarmacológico, e este conhecimento contribui de forma substancial para a descoberta de drogas inovadoras através da introdução de novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação (HARVEY, 1999).

Dentre os vários extratos de produtos naturais que têm sido utilizados para o tratamento da DE temos o “Quebracho” originado do caule de *Aspidosperma quebracho blanco*, este extrato já mostrou inibir as contrações do músculo liso de tecidos humanos, do corpo esponjoso e cavernoso de coelhos e do canal deferente de cobaias e além disso é constituinte de uma droga afrodisíaca conhecida como Afrodor 2000

(Farco-Pharma GmbH, Cologne, Germany) (DEUTSCH ET AL., 1994). Em 2002, Sperling et al. mostraram que o extrato do caule de *Aspidosperma quebracho blanco*, que é utilizado como droga de prescrição para o tratamento da DE em alguns países, liga-se aos receptores noradrenérgicos α_1 e α_2 e esta ação parece ser causada predominantemente pela ioimbina contida no extrato.

O objetivo inicial deste trabalho foi avaliar a ocorrência de ereções em camundongos tratados com SF₃₋₅. Os resultados demonstram que SF₃₋₅ exerce efeito pró-erétil em camundongos. As duas doses de SF₃₋₅ utilizadas (25 e 50 mg/kg/i.p.) aumentaram significativamente o número de camundongos apresentando ereções de 0/8 para 6/8. Neste estudo a dose de 25 mg/kg mostrou ser mais eficaz.

Os eventos vasculares que promovem a ereção peniana são dependentes da inervação simpática e parassimpática (DE GROAT & BOOTH, 1993). Estes neurônios medulares estão sob o controle supramedular. A noradrenalina e a adrenalina são potenciais candidatas a mediar o relacionamento entre os centros supramedulares envolvidos no controle da ereção peniana e os neurônios medulares pré-ganglionares (GIULIANO & RAMPIN, 2000ab). A inervação simpática modula a contração tônica do músculo liso peniano durante o estado flácido (GIULIANO ET AL., 1993) e também regula indiretamente a ereção peniana através do controle dos vasos sangüíneos e da vasculatura peniana em modelo animal de ereção induzida centralmente.

Os estudos sugerem que um aumento da atividade noradrenérgica estimula a função sexual, enquanto que a diminuição desta atividade inibe (BITRAN & HULL, 1987). Ratos que receberam clonidina diretamente na MPOA tiveram o comportamento sexual suprimido (CLARK, 1991). Esta supressão foi inibida pelo pré-tratamento com antagonistas α_2 .

Contudo, apesar de vários antagonistas α_2 , principalmente a ioimbina, terem mostrado aumentar a resposta sexual em ratos, a pobre eficácia terapêutica da ioimbina no uso clínico, em homens com DE provoca dúvidas

em relação à significância dos mecanismos noradrenérgicos centrais no controle da função erétil (ANDERSSON, 2001; ANDERSSON & STIEF, 2001).

A participação da dopamina da fisiologia da ereção foi sugerida nos anos 60 pelo achado ocasional em pacientes com Parkinson que utilizavam agonistas dopaminérgicos e apresentavam aumento da atividade sexual (GIULIANO, 2002). A apomorfina, em particular, suprime as oscilações motoras da doença e ao mesmo tempo, em alguns pacientes masculinos, estimula a ereção (COTZIAS ET AL., 1974). Estudos subseqüentes demonstraram que a apomorfina, um agonista dopaminérgico semi-sintético, poderia induzir ereções em homens portadores de disfunção erétil (GIULIANO, 2002).

Os receptores dopaminérgicos estão distribuídos em várias regiões cerebrais, com alta densidade nos núcleos da base (ANDERSSON & STIEF, 2001). Tanto a família de receptores D₁ (D₁ e D₅) como a D₂ (D₂, D₃ e D₄) está associada à função erétil de origem central (SIBLEY, 1999). O receptor D₂ parece ser responsável pela maioria dos efeitos comportamentais relacionados a dopamina (ANDERSSON, 2001).

A ereção derivada da estimulação dos receptores D₂ na região paraventricular aparentemente envolve a neurotransmissão ocitocinérgica (CARTER, 1992). Os neurônios dopaminérgicos estimulam os corpos celulares ocitocinérgicos no PVN (BUJIS, 1978) e a ereção peniana induzida por apomorfina é prevenida de forma dose-dependente por antagonistas dos receptores ocitocinérgicos (MELIS ET AL., 1989) ou pela depleção do conteúdo central de ocitocina (ARGIOLAS ET AL., 1987).

Ao contrário, a injeção de ocitocina no PVN induz ereções que não são atenuadas por antagonistas dopaminérgicos, sugerindo que os neurônios dopaminérgicos ativam os neurônios ocitocinérgicos no PVN e que a ocitocina liberada contribui para a resposta erétil (ANDERSSON & STIEF, 2001).

O NO liberado pelos neurônios parassimpáticos penianos é reconhecido como o principal neuromediador periférico responsável pela ereção peniana (RAMPIN & GIULIANO, 2001). O NO também atua centralmente para controlar a ereção. Injeções intracerebroventriculares e intra-PVN de L-NAME inibem as ereções em ratos machos na presença de inacessíveis fêmeas na fase e estro. Estes dados reforçam a hipótese de um papel central para o NO no controle da ereção peniana. A produção de NO aumenta no PVN durante as ereções sem contato e copulação (MELIS ET AL., 1998).

Em outro estudo, os níveis de NO foram alterados no PVN de ratos conscientes tanto por diálise de L-arginina, levando a um aumento localizado da produção de NO (SATO ET AL., 1999). Os corpos neuronais nitrérgicos estão presentes nas populações pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas, mas o papel do NO na regulação medular da ereção peniana ainda não está esclarecido (RAMPIN & GIULIANO, 2001).

A clonidina, uma droga agonista dos receptores α_2 , inibiu as ereções induzidas por SF₃₋₅, mostrando que SF₃₋₅ pode estar atuando através do sistema noradrenérgico. O haloperidol, na dose testada, não induziu nenhuma resposta sexual nos camundongos. Os dados obtidos após o tratamento combinado com SF₃₋₅ revelaram que o haloperidol, um antagonista dopaminérgico não seletivo, inibe as ereções induzidas por SF₃₋₅. Baseado nos dados mencionados pode-se dizer que o sistema dopaminérgico pode ser responsável pela expressão do comportamento sexual induzido por SF₃₋₅ em camundongos.

Como a ioimbina atua tanto no sistema noradrenérgico como dopaminérgico (RODRÍGUEZ-MANZO, 1999) e os resultados mostraram que SF₃₋₅ possui efeito do tipo ioimbina, é provável que o efeito de SF₃₋₅ seja devido ao alto teor de alcalóides indólicos contido na fração. Os agonistas dopaminérgicos aumentam a atividade da NO sintase e sabe-se que o NO participa na condução de importantes sinais intra e extracelulares da função erétil (HEATON, 2000). Considerando isto, foi utilizado um inibidor da NO sintase (L-NAME) e houve uma diminuição da atividade de SF₃₋₅.

Foi avaliado ainda se SF₃₋₅ estaria atuando de forma similar ao sildenafil, um inibidor específico da PDE₅. Para isto foi utilizado o azul de metileno, um inibidor da guanilato ciclase. O pré-tratamento com azul de metileno e conseqüente diminuição dos níveis de GMP_c reduziu em 50 % a resposta pró-erétil de SF₃₋₅. A inibição do efeito pró-erétil de SF₃₋₅ pelo azul de metileno pode indicar uma atuação de SF₃₋₅ através do sistema NO/GMP_c.

De acordo com os resultados demonstrados pode-se constatar que SF₃₋₅ induz ereção peniana em camundongos e que os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e nitrérgico podem estar envolvidos nesta ação.

Neste mesmo modelo avaliou-se a presença do *grooming* genital. Os resultados mostram que SF₃₋₅ aumenta o número de *grooming* genital e estas respostas foram inibidas pela clonidina, haloperidol e L-NAME. Pode-se observar uma correlação entre a presença de ereção e o *grooming* genital.

Este resultado é consistente com estudos anteriores que sugerem um importante papel do *grooming* genital na manifestação do comportamento sexual (HERNANDEZ-GONZALEZ, 2000). No entanto não é claro se estas duas respostas são verdadeiramente distintas ou se a presença de ereção ocorre paralelamente ao aumento de outros tipos de comportamentos associados ao ato de lambar a região genital (RAMPIN ET AL., 2003).

A perda do interesse sexual é uma resposta típica da depressão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). Infelizmente, entre os efeitos colaterais mais freqüentes das drogas antidepressivas está a diminuição da atividade sexual (GITLIN, 1995). Os antidepressivos tricíclicos, em particular, causam DE (CRENSHAW, 1996) enquanto os ISRS causam a perda do desejo sexual e retardo do orgasmo ou anorgasmia. Muitos dados experimentais mostram que a serotonina cerebral inibe o comportamento sexual em machos (BENELLI ET AL., 2004). Em particular, a ejaculação retardada e a disfunção orgásmica parecem ser originadas da ativação do

receptor 5-HT_{2c} (BOYARSKY ET AL., 1999). Por isso, a influência adversa dos ISRS na atividade sexual pode estar relacionada à inibição da recaptação da serotonina e ao subsequente aumento das concentrações sinápticas de serotonina.

Os resultados mostram que a administração aguda de fluoxetina reduziu em 50 % o efeito pró-erétil de SF₃₋₅ bem como os valores de *erection-like* e de *grooming* genital. O efeito pró-erétil de SF₃₋₅ nos animais tratados com fluoxetina durante 13 dias não foi alterado, no entanto houve uma redução no *erection-like* e no *grooming* genital.

O efeito benéfico de SF₃₋₅ pode estar relacionado ao antagonismo dos receptores α_2 cerebrais, levando a um aumento de noradrenalina (BENELLI ET AL., 2004). A influência positiva dos antagonistas noradrenérgicos α_2 é amplamente descrita. A administração sistemática de ioimbina, bem como de idazoxan, imiloxan e efaroxan (antagonistas α_2 mais específicos) estimula o comportamento sexual de ratos machos (CLARK, 1984; SMITH ET AL., 1987ab; BENELLI ET AL., 1993). Devido aos alcalóides indólicos presentes em SF₃₋₅, a fração pode estar atuando de forma similar a ioimbina.

A ioimbina que apresentava resultados questionáveis em homens com disfunção erétil orgânica apresentou resultados satisfatórios em um estudo utilizando 18 homens com DE, indicando que esta droga é uma terapia eficaz para tratar a DE orgânica (GUAY ET AL., 2002). Estes dados são importantes uma vez que novas drogas com mecanismo similar a ioimbina podem ser testadas e introduzidas na prática clínica.

- ***Efeito pró-erétil de SF₃₋₅ in vitro***

Como a ereção peniana envolve o relaxamento vascular e muscular liso durante a estimulação sexual, a aplicação de modelos *in vitro* aumentou significativamente o nosso entendimento dos eventos bioquímicos em nível celular (ANDERSSON & WAGNER, 1995). Estes modelos permitem o esclarecimento dos vários neurotransmissores e fatores vasoativos envolvidos neste processo e as vias de sinalização (MORELAND ET AL., 2001).

A restrita disponibilidade de tecidos eréteis humanos levou ao uso do tecido cavernoso isolado de coelho como sendo o principal modelo *in vitro* para o “*screening*” e análise detalhada dos mecanismos previamente demonstrados no tecido humano. As vantagens deste método incluem a fácil preparação, poucos equipamentos necessários e o fato de obterem-se curvas concentração-efeito reprodutíveis quando se estuda agentes contráteis ou relaxantes. A resposta à estimulação farmacológica através da adição de agentes contráteis como a fenilefrina, KCl ou outros fatores é o método mais comumente utilizado para contrair o corpo cavernoso *in vitro* para analisar a potência e eficácia de agentes relaxantes (MORELAND ET AL., 2001).

As contrações também podem ser obtidas pela estimulação por campo elétrico, de forma similar a utilizada para o estudo da resposta neuronal (KIM ET AL., 1993). Como o tônus muscular liso é controlado principalmente pela concentração intracelular de Ca^{+2} (HOROWITZ, 1996), qualquer evento que limite a entrada de Ca^{+2} na célula ou libere Ca^{+2} do estoque intracelular terá impacto significativo no tônus muscular liso corporal (ANDERSSON, 1995).

O canal deferente de roedor é uma preparação clássica para a elucidação da transmissão neuromuscular autonômica e tem sido utilizada para estudos na estrutura da junção formada entre as varicosidades nervosas simpáticas e o músculo liso (RICHARDSON, 1962), bem como para identificação de zonas ativas nessas varicosidades terminais (BRAIN & BENNETT, 1997).

A contração neurogênica em canal deferente de roedor é mediada principalmente por NA e ATP (VENTURA, 1998). Até pouco tempo, era amplamente aceito que ambos os neurotransmissores fossem estocados nas mesmas vesículas sinápticas e que, quando liberados, eram apresentados aos receptores simultaneamente e em proporções constantes a despeito de uma modulação de liberação frequência-dependente (STJÄRNE, 1989; STJÄRNE ET AL., 1994). No entanto, recentemente Stjärne (2001) sugeriu que existem duas classes de vesículas

pequenas que contêm diferentes *quanta* de neurotransmissores e que os receptores em suas membranas possuem diferentes afinidades por cálcio, habilitando o nervo a secretar seletivamente grande *quanta* a baixas freqüências e pequeno *quanta* a altas freqüências durante trens de estímulo elétrico.

A adição de SF₃₋₅ diminuiu a contração induzida por ECE e a pré-incubação do tecido com SF₃₋₅ (64 µg/mL) reduziu significativamente a resposta contrátil da noradrenalina sem alteração na resposta do ATP. As contrações do canal deferente em resposta ao ECE são mediadas pela combinação de NA e ATP liberados como co-transmissores dos neurônios simpáticos (HOYLE, 1990).

Uma vez estabelecido o efeito pró-erétil *in vivo* e o relaxamento do canal deferente *in vitro* promovido por SF₃₋₅, resolveu-se então avaliar o efeito de SF₃₋₅ sobre o corpo cavernoso de coelhos.

Os experimentos em corpo cavernoso de coelhos foram realizados em banho de registro isométrico em solução de KHS (pH 7,4 e 37 °C), enriquecida com guanetidina e indometacina (10 µM), constantemente aerada (O₂ – 95 % e CO₂ – 5 %), sob tensão de 1,0 g. A guanetidina bloqueia seletivamente a transmissão pós-ganglionar dos nervos noradrenérgicos, inibindo a liberação de NA, depletando-a no neurônio terminal simpático periférico e nos tecidos, equivalendo a uma simpatectomia química (BENOWITZ, 1998). A indometacina é um inibidor das ciclooxigenases (COX₁ e COX₂), estando entre os mais potentes inibidores da síntese de prostaglandinas (KATZUNG & FURTS, 1998). Assim, os dois fármacos conferem ao meio de estudo um ambiente livre da interferência noradrenérgica e de prostanóides.

Neste banho, em uma primeira série de experimentos, SF₃₋₅ relaxou as tiras de corpo cavernoso de coelhos pré-contraídas com solução de potássio (K⁺ 60 mM), PGF_{2α} (100 µM) e fenilefrina (10 µM). O relaxamento dos corpos cavernosos foi revertido quando os tecidos foram lavados, mostrando que SF₃₋₅ não causa lesão no

aparelho contrátil. Esta reversão ocorreu tanto nos tecidos pré-contraídos com fenilefrina como naquele pré-contraídos com K^+ .

Há no mínimo quatro mecanismos contráteis para o músculo liso: despolarização da célula muscular aumentando o fluxo de Ca^{+2} para dentro da célula via ativação do canal de cálcio tipo L (por exemplo, aumento do potássio extracelular); agonistas que liberam cálcio do estoque intracelular (como por exemplo a NA *via* IP_3); aqueles que ativam os canais de cálcio dependentes e independentes de voltagem para além do fluxo esperado para o grau de despolarização (por exemplo, Ach no intestino) e os agonistas que aumentam a sensibilidade da maquinaria contrátil para o Ca^{+2} intracelular (como os ésteres de forbol) (REMBOLD, 1996).

As soluções despolarizantes de KCl induzem a contração do músculo liso por acoplamento eletromecânico, *via* aumento da $[K^+]$ e despolarização da membrana celular ativando o canal de cálcio tipo L, incrementando assim a entrada de Ca^{+2} para dentro da célula (REMBOLD, 1996).

Na célula em repouso, por gradiente químico, o K^+ tende a sair para o espaço extracelular onde a sua concentração é menor, mantendo assim a célula hiperpolarizada (CHRIST ET AL., 2000). Com a mudança brusca de sua concentração extracelular perde-se este equilíbrio e a corrente iônica é invertida, perturbando o potencial de membrana, resultando na abertura dos canais de cálcio regulados por voltagem, culminando com a contração muscular (REMBOLD, 1996).

A flacidez e a ereção peniana são controladas por um equilíbrio entre fatores contráteis e relaxantes, envolvendo sofisticados sistemas de transmissores de sinais (ANDERSON, 2001). Os nervos e o endotélio dos sinusóides e vasos do pênis produzem e liberam transmissores e moduladores que por fim interagem no controle do estado contrátil de seu músculo liso (MORELAND ET AL., 2001).

O neurônio provê a maior parte do NO do tecido peniano, o que aponta para um papel relevante no processo de ereção, no entanto, o endotélio é uma importante fonte adicional da molécula gasosa (TEIXEIRA ET AL., 2001). Na verdade, o NO neuronal é considerado como o mais importante fator para o relaxamento cavernoso, entretanto o NO endotelial parece ser de capital importância na manutenção da ereção e um dano endotelial pode contribuir para a DE (ANDERSON, 2003).

A Ach, o neurotransmissor parassimpático, relaxa o músculo liso cavernoso, estimulando a liberação de NO através da ativação dos receptores muscarínicos M_3 do endotélio vascular (TRAISH ET AL., 1990). Evidências de vários estudos sugerem que o estímulo por campo elétrico (ECE) relaxa o corpo cavernoso de coelhos através da liberação neuronal de NO (BURNETT, 1997). Vemulapalli e Kurowski (2001) demonstraram que o ECE produz relaxamento frequência-dependente, do músculo liso peniano, que é atenuado pelo L-NAME e ODQ e completamente abolido pela TTX, concluindo-se que a liberação neuronal de NO contribui efetivamente para o fenômeno.

Para examinar se SF_{3-5} estaria atuando *via* NO, foram realizados experimentos utilizando-se um inibidor da NO sintase (L-NAME). Os resultados mostram que o relaxamento é independente de NO, o L-NAME não reduziu o relaxamento induzido por SF_{3-5} .

O sistema NO - guanilato ciclase – GMP_c é um dos maiores efetores do relaxamento do músculo liso peniano e portanto de sua função erétil (BRIONI ET AL., 2002). Quando em estado flácido, as arteríolas helicinas estão contraídas principalmente através do mecanismo α -adrenérgico. A ereção peniana é o resultado final do relaxamento do músculo liso iniciado a partir de estimulação sensorial ativando o SNC. O NO liberado dos nervos e do endotélio ativa a guanilato ciclase solúvel. Esta última converte por efeito enzimático o GTP a GMP_c , que por fim dilata o músculo cavernoso (BRIONI ET AL., 2002).

A molécula 1H-[1,2,4] *Oxadiazole* [4,3-*a*] *quinoxalin-1-one* (ODQ) é um potente e seletivo inibidor da guanilato ciclase solúvel. O ODQ inibe por mecanismo competitivo a estimulação promovida pelo NO, no seu sítio de ligação, através da oxidação reversível da fração heme. Constitui uma excelente ferramenta farmacológica para investigar a via de sinalização dependente daquela enzima (SCHRAMMEL ET AL., 1996).

Neste estudo foram feitos experimentos utilizando o ODQ para substanciar a investigação e definir se SF₃₋₅ estaria agindo através do sistema NO/guanilato ciclase/GMP_c. A participação da via guanilato ciclase foi descartada pelo fato de que o ODQ não inibiu o relaxamento produzido por SF₃₋₅ em tiras de corpo cavernoso de coelho pré-contraídas com fenilefrina. SF₃₋₅ pode estar atuando através de um mecanismo independente da via NO/GMP_c (SHARABI ET AL., 2005).

Na verdade não é o NO *per se* que promove a ereção peniana, mas seu segundo mensageiro GMP_c através da ativação da proteína cinase C (ARCHER, 2002). Evidências recentes colhidas de estudos em músculo liso vascular e não vascular e de séries de experimentos com tecido contrátil peniano apontam para o envolvimento dos canais de potássio (MALYSZ ET AL., 2001).

Os canais de potássio são os reguladores do potencial de membrana celular e do fluxo de Ca⁺² conseqüente, e, portanto, do grau de contração do músculo liso, incluindo o do corpo cavernoso de humanos (WANG ET AL., 2000). Especialmente o K_{Ca} e o K_{ATP} são os maiores moduladores do tônus do músculo liso dos tecidos eréteis (LEE ET AL., 1999).

As correntes de potássio têm um papel importante na determinação do potencial de membrana, nas células excitáveis, incluindo a muscular lisa do corpo cavernoso. O fluxo do íon é controlado por três principais vias metabólicas: as duas primeiras AMP_c/PKA e GMP_c/PKG ativados por PGE₁ e NO respectivamente, aparentemente modulam a atividade do K_{Ca}. A terceira via é aquela dos moduladores dos canais que

exercem seu efeito relaxante no corpo cavernoso alterando a atividade do K_{ATP} (MOON ET AL., 1999).

Para investigar se SF_{3-5} relaxa o corpo cavernoso de coelhos via ativação de canais de potássio, foram realizados experimentos com bloqueadores específicos. Inicialmente foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia de segunda geração de uso definido como hipoglicemiante oral. Esta droga é um bloqueador específico do canal de potássio regulado por ATP, K_{ATP} (MOON ET AL., 1999).

A glibenclamida não bloqueou o relaxamento induzido por SF_{3-5} em tiras de corpo cavernoso de coelho pré-contraídas com fenilefrina, sugerindo a não participação do canal K_{ATP} no efeito relaxante de SF_{3-5} . Com o objetivo de dar maior consistência ao achado anterior, foram realizados experimentos utilizando uma associação de caribdotoxina e apamina, infundidos antes de SF_{3-5} . Estas duas drogas exibem um efeito inibitório sobre o canal K_{Ca} . A caribdotoxina é um bloqueador potente deste canal na sua variedade de alta condutância, não afetando aqueles sensíveis a apamina, que são considerados ativos em baixa condutância (ARCHER, 2002).

A maioria dos efeitos relaxantes do NO é mediada pelo GMPc que atua como agente modificador de canais iônicos, PDEs e proteínas cinases (WERNER ET AL, 2005). Tiras de músculo liso cavernoso de camundongos com ausência da proteína cinase 1 dependente de GMPc (PKG1), quando pré-contraídas, não relaxam em resposta à estimulação nervosa (HEDLUND ET AL., 2000), mostrando que existe um papel central da PKG1 no corpo cavernoso. A PKG1 fosforila um grande número de proteínas, incluindo bombas e canais iônicos, que são conhecidos por reduzir a concentração intracelular de Ca^{+2} (LINCOLN & CORNWELL, 1993). Foi mostrado que a PKG1 ativa os canais de potássio de alta condutância sensíveis ao Ca^{+2} (ALIOUA ET AL., 1998) levando a hiperpolarização das membranas celulares do músculo liso, e por isso agindo de forma oposta a contração.

O bloqueio destes canais com a caribdotoxina leva ao aumento das contrações do corpo cavernoso induzidas por fenilefrina *in vitro*, enquanto que a abertura destes canais reduz as contrações (SPEKTOR ET AL., 2002). Estudos promovem a idéia de que o aumento da expressão dos K_{Ca} de alta condutância podem restabelecer a função erétil em homens idosos ou com enfermidades subjacentes (MELMAN ET AL., 2003; CHRIST & LUE, 2004).

A pré-incubação com caribdotoxina e apamina em tiras de corpo cavernoso de coelhos pré-contraídas com fenilefrina não exerceu qualquer influência sobre o relaxamento induzido por SF_{3-5} , tornando improvável a participação dos canais de potássio na sua ação relaxante.

Os canais de Na^+ dependente de voltagem presentes no corpo cavernoso são essenciais para função erétil (OLIVEIRA ET AL., 2003). Estudos *in vitro* mostram que o corpo cavernoso de várias espécies de animais relaxa em resposta a estimulação transmural, consistindo em resposta sensível tanto aos inibidores da síntese de NO como aos bloqueadores dos canais de Na^+ (OLIVEIRA ET AL., 2003).

Com base neste conhecimento, investigamos a capacidade da tetrodotoxina (TTX), bloqueador dos canais de Na^+ , de reverter o relaxamento induzido por SF_{3-5} . Neste estudo, a resposta relaxante das preparações de músculo liso cavernoso de coelhos induzida por SF_{3-5} não foi reduzida pela TTX, indicando que a resposta não se origina da estimulação dos nervos que suprem o tecido cavernoso (TEIXEIRA ET AL., 2001).

A Ach possui efeito inibitório pré- e pós-juncional na neurotransmissão noradrenérgica no tecido erétil peniano isolado (HEDLUND & ANDERSSON, 1985). A falência do antagonista dos receptores muscarínicos atropina em reduzir o relaxamento induzido por SF_{3-5} sugere que a liberação de Ach não contribui para o relaxamento induzido por SF_{3-5} e exclui o envolvimento dos nervos colinérgicos no seu mecanismo de ação.

A fração SF₃₋₅ relaxa o corpo cavernoso de coelhos por um mecanismo independente do bloqueio dos receptores noradrenérgicos, uma vez que o seu efeito relaxante permanece, mesmo quando a contração é induzida por um agonista não adrenérgico (K⁺ 60 mM) num meio contendo um agente simpatolítico (guanetidina) e de um antagonista não seletivo dos receptores adrenérgicos (fentolamina).

Recentemente, foi proposto a importância dos canais de Ca⁺² ativados por Cl⁻ na geração do tônus miogênico espontâneo do corpo cavernoso (KARKANIS ET AL., 2003). Neste sentido, foi investigado se o ácido niflúmico (bloqueador dos canais de Cl⁻) alteraria a resposta relaxante de SF₃₋₅ no corpo cavernoso de coelho pré-contraídos com fenilefrina. Os bloqueadores dos canais de Cl⁻, por bloquear uma influência excitatória, promovem vasodilatação, que é essencial para a ereção. O ácido niflúmico potenciou o efeito relaxante de SF₃₋₅.

Foi avaliada a influência de um meio isento de Ca⁺² sobre o efeito de SF₃₋₅. As tiras de corpo cavernoso de coelho foram incubadas em banho com cálcio nominal zero acrescido de EGTA e nifedipina, pré-contraído com PGF_{2α} e infundidos com SF₃₋₅. Houve uma redução do relaxamento induzido por SF₃₋₅, demonstrando que a sua ação se faz, pelo menos parcialmente, em nível extracelular, não atuando na liberação intracelular de cálcio, na interação cálcio-calmodulina ou quaisquer outros eventos relacionados à ação do cálcio como segundo mensageiro e, que não afeta a maquinaria contrátil intracelular.

Como SF₃₋₅ induziu relaxamento do corpo cavernoso de coelhos, foi verificado se este efeito seria reproduzido no corpo cavernoso humano. Os experimentos foram realizados em banho de registro isométrico em condições semelhantes aquelas do estudo do corpo cavernoso de coelhos. Neste banho, SF₃₋₅ inibiu o tônus simpático e relaxou as tiras de corpo cavernoso humano pré-contraídas com solução de fenilefrina 10 μM. No entanto, devido a dificuldade de obtenção do tecido humano ainda não foram

realizados estudos para avaliar se o mecanismo de relaxamento no tecido peniano humano seriam os mesmos do corpo cavernoso de coelho.

- Considerações finais

Qualquer composto que melhore a atividade sexual tem potencial para ser extremamente proveitoso. Vários produtos naturais que têm sido utilizados por séculos como agentes para melhorar a função sexual masculina estão agora sob investigação científica. Infelizmente não existe um método uniforme aceitável para identificar uma substância que melhora a função erétil (McKAY, 2004).

O corpo cavernoso isolado é um dos modelos utilizados para avaliar a atividade erétil de compostos. Outros modelos para estimar a atividade pró-erétil incluem a observação do comportamento animal após a administração da droga teste (latência para a ereção, frequência copulatória, latência para ejaculação). Outros comportamentos copulatórios incluem o comportamento do macho em relação à fêmea.

Os métodos animais atuais não proporcionam um meio acurado para a avaliação da atividade pró-erétil de um novo composto. Os modelos animais baseiam-se somente nas funções sexuais mecânicas ou instintivas dos animais observados. Além disso, os testes em humanos podem ser de difícil interpretação devido ao grau de subjetividade na auto-avaliação. Apesar das complicações, os estudos controlados e randomizados são geralmente considerados como a técnica mais precisa (McKAY, 2004).

Um medicamento contendo extrato de *Aspidosperma quebracho blanco* (Afrodor 2000) é utilizado na Europa para o tratamento da DE (SPERLING ET AL., 1999). Estudos clínicos mostraram melhora da performance sexual e aumento da libido em pacientes tratados cronicamente com Afrodor 2000 (BAUMBUSCH ET AL., 1995; SPERLING ET AL., 1999).

Este estudo mostra que SF₃₋₅ possui atividade estimulante do SNC e apresenta efeito pró-erétil *in vivo* e *in vitro*. Drogas que atuam no SNC reduzindo o tônus simpático (anti-erétil) e aumentando o tônus parassimpático (pró-erétil) no pênis podem restabelecer a ereção peniana nos casos de DE de origem psicogênica e orgânica (ALLARD & GIULIANO, 2001). Além disso, drogas que atuam no SNC podem interferir no desejo sexual de forma mais importante do que aquelas que atuam periféricamente. Apesar do restrito conhecimento sobre o controle central da ereção peniana, existem muitos alvos potenciais para o tratamento da DE utilizando drogas de ação central (GIULIANO & VARANESE, 2002)

O estudo farmacodinâmico mostrou que SF₃₋₅ relaxa tiras de corpo cavernoso de coelhos pré-contraídos com fenilefrina, PGF_{2 α} e K⁺. Esta ação manteve-se na presença de várias outras drogas, em ambiente livre da influência adrenérgica e de prostanóides, evidenciando efeito por outra via.

Os achados apontam para uma ação através do Ca⁺², uma vez que SF₃₋₅ em ambiente livre de Ca⁺² e na presença de um bloqueador do canal de Ca⁺² (nifedipina) não apresentou o mesmo efeito relaxante quando na presença deste íon. A contração fásica induzida por K⁺ (60 mM) foi bloqueada por SF₃₋₅ de maneira concentração-dependente. Este componente da contração é dependente principalmente do influxo de Ca⁺² através de canais voltagem-dependentes (BOLTON, 1979). Além disso, o seu efeito foi potenciado pela presença de um bloqueador dos canais de Ca⁺² ativado por cloreto (ácido niflúmico).

SF₃₋₅ estaria agindo então, como antagonista noradrenérgico e dopaminérgico *in vivo* e no corpo cavernoso de coelhos por um mecanismo não adrenérgico não colinérgico, atuando de forma inespecífica como ocorre com o conhecido alcalóide papaverina. Estudos com os alcalóides isolados de SF₃₋₅ serão necessários para verificarmos qual destes componentes possui o efeito pró-erétil, além da utilização de outros modelos experimentais para que possamos estabelecer o mecanismo de ação pró-erétil.

7 Conclusões

- ✿ O estudo químico da fração alcaloídica isolada das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr. (SF₃₋₅) demonstrou a presença de três alcalóides indólicos – uleína, *nor*-uleína e tetrahydro-3,14,4,21-elipticina;
- ✿ SF₃₋₅ exibiu toxicidade para *Artemia sp.* e a DL₅₀ de SF₃₋₅, pela via intraperitoneal em camundongos, foi estimada em 400 ± 40 mg/Kg;
- ✿ SF₃₋₅ mostrou ser estimulante do Sistema Nervoso Central em camundongos, mas não promoveu incoordenação motora;
- ✿ SF₃₋₅ apresentou efeito pró-erétil em camundongos envolvendo os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e nitrérgico;
- ✿ SF₃₋₅ relaxa o corpo cavernoso de coelhos e humano;
- ✿ O mecanismo do relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ possivelmente envolve o fluxo de cálcio.

8 Referências Bibliográficas

ABREU E SILVA M; OLIVEIRA, A,B.; SOUZA FILHO, J.D.; CHIARI, E.; BRAGA, F.C.; LOMBARDI, J.A. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por testes *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. **Anais da II Semana da Pós-Graduação da UFMG**, 2002.

ABSIL, P.; BAILLIEN, M.; BALL, G.F.; PANZICA, G.C.; BALTHAZART, J. The control of preoptic aromatase activity by afferent inputs in Japanese quail. **Brain Research Reviews**, v. 37, n. 1-3, p. 38 – 58, 2001.

ADAIKAN, P.G.; NG SC. Physiological significance of nitregeric transmission in human penile erection. **Asian Journal of Andrology**, v. 2, n. 1, p. 51 – 56, 2000.

ALARANTA, S.; UUSITALO, H.; HAUTAMAKI, A.M.; KLINGE, E. Calcitonin gene-related peptide: immunohistochemical localization in, and effects on, the bovine penile artery. **International Journal of Impotence Research**, v. 3, p. 49 – 59, 1991.

ALIOUA, A.; TANAKA, Y.; WALLNER, M.; HOFMANN, F.; RUTH, P.; MEERA, P.; TORO, L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation *in vivo*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 49, p. 32950 – 32956, 1998.

ALLARD, J.; GIULIANO, F. Central nervous system agents in the treatment of erectile dysfunction: how do they work? **Current Urology Reports**, v.6, p. 488 – 494, 2001.

ALM, P.; ALUMETS, J.; HAKANSON, R.; OWMAN, C.; SJOBERG, N.O.; STJERNQVIST, M.; SUNDLER, F. Enkephalin-immunoreactive nerve fibers in the feline genito-urinary tract. **Histochemistry**, v. 72, n. 3, p. 351 - 355, 1981.

ALVES, F.N.R. Desafios para o desenvolvimento de fitomedicamentos no Brasil no contexto da indústria farmacêutica. Rio de Janeiro: 248p. Dissertação de Mestrado – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, **Fundação Oswaldo Cruz**, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Estatistical Manual of Mental Disorders. fth. Ed. Washington; DC, **American Psychiatric Press**, 1994.

ANDERSSON, K.E.; HEDLUND, H.; MATTIASSON, A.; SIOGREN, C.; SANDLER, F. Relaxation of isolated human corpus spongiosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation. **World Journal of Urology**, v. 1, p. 203 – 208, 1983.

ANDERSSON, K.E.; GARCIA PASCUAL, A.; FORMAN, A.; TOTTRUP, A. Non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation of rabbit urethra is caused by nitric oxide. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 141, n. 1, p. 133 – 134, 1991.

ANDERSSON, K.E.; PERSSON, K. The L-arginine/nitric oxide pathway and non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the lower urinary tract. **General Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 833 - 839, 1993.

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

ANDERSSON, K.E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 417 – 450, 2001.

ANDERSSON, K.E.; STIEF, C. Oral alpha adrenoceptor blockade as a treatment of erectile dysfunction. **World Journal of Urology**, v. 19, n. 1, p. 9 - 13, 2001.

ANDERSON, K.E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. **World Journal of Urology**, v.170, :S13 – S14, 2003.

ANG, H.H.; SIM, M.K. *Eurycoma longifolia* increases sexual motivation in sexually naive male rats. **Archives of Pharmacology Research**, v. 21, n. 6, p. 779 - 781, 1998.

ANGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; SAENZ DE TEJADA, I. Combination of phentolamine and L-arginine or sildenafil synergistically improves neurogenic relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. **Urology**, v. 57, n. 3, p. 585 - 589, 2001.

ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 5, p. 416 – 421, 2001.

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

ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R.; MAURI, A.; GESSA, G.L. Paraventricular nucleus lesion prevents yawning and penile erection induced by apomorphine and oxytocin, but not ACTH 1-24. **Brain Research**, v. 421, p. 349 - 352, 1987.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R. Oxytocin-induced penile erection. Role of nitric oxide. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 395, p. 247 – 254, 1995.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R. Central control of penile erection: Role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 1, p. 1 - 21. 2005

AYAJIKI, K.; HAYASHIDA, H.; OKAMURA, T.; TODA, N. Pelvic nerve stimulation-induced pressor responses in corpus cavernosum of anesthetized dogs. **American Journal of Physiology**, v. 273 , p. H2141 – H2145, 1997.

AZADZOI, K.M.; KIM, N.; BROWN, M.L.; GOLDSTEIN, I.; COHEN, R.A.; SAENZ DE TEJADA, I. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. **The Journal of Urology**, v. 147, n. 1, p.220 - 225, 1992.

AZADZOI, K.M.; VLACHIOTIS, J.; PONTARI, M.; SIROKY, M.B. Hemodynamics of penile erection: III. Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. **The Journal of Urology**, v. 153, n. 2, p. 521 – 526, 1995.

BALLARD, S.A.; GINGELL, C.J.; TANG, K.; TURNER, L.A.; PRICE, M.E.; NAYLOR, A.M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **The Journal of Urology**, v. 159, p. 2164 – 2171, 1998.

BALTHAZART, J.; ABSIL, P. Identification of catecholaminergic inputs to and outputs from aromatase-containing brain areas of the Japanese quail by tract tracing combined with tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 382, n. 3, p. 401 - 28, 1997.

BALTHAZART, J.; BALL, G.F. The Japanese quail as a model system for the investigation of steroid-catecholamine interactions mediating appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior. **Annual Review of Sex Research**, v. 9, p. 96 - 176, 1998a.

BALTHAZART, J.; BALL, G.F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends in Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 243 - 249, 1998b.

BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; BALL, G.F. Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 1, p. 37 - 55, 2002.

BANCROFT, J. Effects of alpha-2 blockade on sexual response: experimental studies with delequamine (RS15385). **International Journal of Impotence Research**, v. 12, n. 1, p. S64 - S69, 2000.

BANERJEE, J.N.; LEWIS, J.J. Pharmacological studies in the apocynaceous genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Aspidosperma ulei* MGF. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 42 – 45, 1954.

BAUER, F.E.; CHRISTOFIDES, N.D.; HACKER, G.W.; BLANK, M.A.; POLAK, J.M.; BLOOM, S.R. Distribution of galanin immunoreactivity in the genitourinary tract of man and rat. **Peptides**, v. 7, n. 1, p. 5 – 10, 1986.

BAUMBUSCH, F.; PAPP, G.K.; KOPA, Z.S. Treatment for potency problems with Afrodor 2000. **Acta Chirurgica Hungarica**, v. 35, n. 1-2, p. 87 – 92, 1995.

BENELLI, A.; ARLETTI, R.; BASAGLIA, R.; BERTOLINI, A. Male sexual behaviour: further studies on the role of alpha 2-adrenoceptors. **Pharmacological Research**, v.28, n. 1, p. 35 – 45, 1993.

BENELLI, A.; FRIGERI, C.; BERTOLINI, A.; GENEDANI, S. Influence of mirtazapine on the sexual behavior of male rats. **Psychopharmacology**, v. 171, n. 3, p. 250 – 258, 2004.

BENOWITZ, N.L. Antihypertensive agents. In: KATZUNG BG. **Basic and clinical pharmacology**. 7th ed. Stamford : Appleton & Lange, cap. 11, p. 153 – 178, 1998.

BENSON, G.S.; MCCONNELL, J.; LIPSHULTZ, L.I.; CORRIERE, J.R.; WOOD, J. Neuromorphology and neuropharmacology of the human penis: an in vitro study. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 2, p. 506 – 513, 1980.

BISCHOFF, E.; MONDRITZKI, T.; NIEWOEHNER, U.; HANING, A.; ZIMMER, D. Vardenafil improved erections in rabbits longer than expected from plasma half-life. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 4, p. S42, 2002.

BITRAN, D.; HULL, E.M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 11, n. 4, p. 365 – 389, 1987.

BLUM, M.D.; BAHNSON, R.R.; PORTER, T.N.; CARTER, M.F. Effect of local alpha-adrenergic blockade on human penile erection. **The Journal of Urology**, v. 134, n. 3, p. 479 – 481, 1985.

BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 606 - 718, 1979

BOLZANI, V.S.; SERUR, L.M.; MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187 – 200, 1987.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 147 – 160, 1998.

BOYARSKY, B.K.; HAQUE, W.; ROULEAU, M.R.; HIRSCHFELD, R.M. Sexual functioning in depressed outpatients taking mirtazapine. **Depression & Anxiety**, v. 9, n. 4, p. 175 – 179, 1999.

BRAIN, K.L.; BENNETT, M.R. Calcium in sympathetic varicosities of mouse vas deferens during facilitation, augmentation and autoinhibition. **The Journal of Physiology**, v. 502, p. 521 - 536, 1997.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, v. 87, n. 2, p. 682 – 685, 1990.

BRINDLEY, G.S. Pilot experiments on the actions of drugs injected into the human corpus cavernosum penis. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 495 – 500, 1986.

BRIONI, J.D.; NAKANE, M.; HSIEH, G.C.; MORELAND, R.B.; KOLASA, T.; SULLIVAN, J.P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 1, p. 8 – 14, 2002.

BUJIS, R.M. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. **Cell and Tissue Research**. v. 92, p. 423 - 435, 1978.

BURNETT, A.L. Role of nitric oxide in the physiology of erection. **Biology of Reproduction**, v.52, p. 485- 489, 1997

BURNS-CUSATO; SCORDALAKES, E.M.; RISSMAN, E.F. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. **Physiology & Behavior**, v. 83, p. 217 – 232, 2004.

BUSCH, P.A.; ARONSON, W.J.; BUGA, G.M.; RAJFER, J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. **The Journal of Urology**, v. 147, p. 1650 – 1655, 1992a.

BUSCH, P.A.; GONZALEZ, N.E.; IGNARO, L.J. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from l-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 186, p. 308– 314, 1992b.

CARLINI, E.L. Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas. In: Buchillet D, editor. **Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia**. Belém: Edições CEJUP; p. 45 – 59, 1989.

CARLINI, E.L. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 75, n. 3, p. 501 – 512, 2003.

CARTER, C.S. Oxytocin and sexual behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 16, p. 131 – 144, 1992.

CASHEN, D.E.; MACINTYRE, D.E.; MARTIN, W.J. Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 5, p. 693 – 700, 2002.

CELLEK, S.; MONCADA, S. Nitrenergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, v. 94, n. 15, p. 8226 – 8231, 1997.

CELLEK, S. Nitrenergic-noradrenergic interaction in penile erection: a new insight into erectile dysfunction. **Drugs Today**, v. 36, n. 2-3, p. 135 - 146, 2000.

CHIOU, W.F.; CHEN, J.; CHEN, C.F. Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 8, p. 1677 - 1684, 1998.

CHOI, H.K.; SEONG, D.H.; RHA, K.H. Clinical efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 7, n. 3, p. 181 – 186, 1995.

CHOUDHARY, I.; UR-RAHMAN, A. Elixirs of love. **Chem. Br.** V. October, p. 25 – 27, 1997.

CHRIST, G.J.; KIM, D.C.; TAUB, H.C.; GONDRE, C.M.; MELMAN, A. Characterization of nitroglycerine-induced relaxation in human corpus cavernosum smooth muscle: implications to erectile physiology and dysfunction. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1714 – 1726, 1995.

CHRIST, G.J.; WANG, H.Z.; VENKATESWARLU, Z.; ZHAO, W.; DAY, N.S. Gap junctions and ion channels: relevance to erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, p. S12 – S20, 2000.

CHRIST, G.J.; LUE, T. Physiology and biochemistry of erections. **Endocrine**, v. 23, n. 2-3, p. 93 – 100, 2004.

CICERO, A.F.; BANDIERI, E.; ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 225 – 259, 2001.

CIRINO, G. Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside. **Digestive and Liver Disease**, v. 35, n. 2, p. S2 - S8, 2003.

CLARK, J.T.; SMITH, E.R.; DAVIDSON, J.M. Enhancement of sexual motivation in male rats by yohimbine. **Science**, v. 225, p. 847 – 848, 1984.

CLARK, J.T. Suppression of copulatory behavior in male rats following central administration of clonidine. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 4, p. 373 - 82, 1991.

COHAN, P.; KORENMAN, S.G. Erectile dysfunction. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 6, p. 2391 – 2394, 2001.

CONTI, M.; JIN, S.L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 63, p. 1 – 38, 1999.

CORNIL, C.A.; BALTHAZART, J.; MOTTE, P.; MASSOTTE, L.; SEUTIN, V. Dopamine activates noradrenergic receptors in the preoptic area. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 21, p. 9320 – 9330, 2002.

COTZIAS, G.C.; MENA, I.; PAPAVALIOU, P.S.; MENDEZ, J. Unexpected findings with apomorphine and their possible consequences. **Advances in Neurology**, v. 5, p. 295 – 259, 1974.

CRAWLEY, J.N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience & Biobehavior Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37 – 44, 1985.

CRENSHAW, T.L.; GOLDBERG, J.P. **Sexual Pharmacology**. Drugs that affect sexual function. W. W. Norton & Company. New York. London, 1996.

DAIL, W.G.; WALTON, G.; OLMSTED, M.P. Penile erection in the rat: stimulation of the hypogastric nerve elicits increases in penile pressure after chronic interruption of the sacral parasympathetic outflow. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 28, n. 3, p. 251 – 257, 1989.

DAUSSE, J.P.; LERICHE, A.; YABLONSKY, F. Patterns of messenger RNA expression for alpha-1-adrenoceptor subtypes in human corpus cavernosum. **Journal of Urology**, v. 160, p. 597 – 600, 1998.

DE GROAT, W.C.; BOOTH, A.M. Neural control of penile erection, in **The Autonomic Nervous System, Nervous Control of the Urogenital System** (Maggi CA ed) 6 : 465 - 513, Harwood Academic Publishers, London, UK, 1993.

DE GROAT, W.C. Anatomy of the central neural pathways controlling the lower urinary tract. **European Urology**, v. 34, n. 1, p. 2 – 5, 1998.

DE OLIVEIRA, F.J.; TEIXEIRA, C.E.; ARANTES, E.C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Urology**, v. 62, n. 3, p. 581 – 588, 2003.

DELAY, J. Psychotropic drugs and experimental psychiatry. **Recent Advances in Biological Psychiatry**, v. 4, p. 111 – 132, 1961.

DEUTSCH, H.F.; EVENSON, M.A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P.O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an

Aspidosperma tree source. **Journal of Pharmacy and Biomedicine Analytical**, v. 12, n. 10, p. 1283 – 1287, 1994.

DHABUWALA, C.B.; RAMAKRISHNA, C.V.; ANDERSON, G.F. Beta adrenergic receptors in human cavernous tissue. **The Journal of Urology**, v. 133, n. 4, p. 721 – 723, 1985.

DOLLERY, C. Phentolamine mesylate. In: DOLLERY, C. **Therapeutic drugs**. 2nd ed. New York : Churchill Livingstone, p. 97 – 99, 1999.

DREWES, S.E.; GEORGE, J.; KHAN, F. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1019 -1025, 2003.

DU, J.; LORRAIN, D.S.; HULL, E.M. Castration decreases extracellular, but increases intracellular, dopamine in medial preoptic area of male rats. **Brain Research**, v. 782, n. 1-2, p. 11 – 17, 1998.

EARDLY, I.; CARTLEDGE, J. Tadalafil (CIALIS) for men with erectile dysfunction. **International Journal of Clinical Practice**, v. 56, p. 300 – 304, 2002.

EISENBERG, D.M.; KESSLER, R.C.; FOSTER, C.; NORLOCK, F.E.; CALKINS, D.R.; DELBANCO, T.L. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 4, p. 246 - 252., 1993.

EMMICK, J.T.; STUEWE, S.R.; MITCHELL, M. Overview of the cardiovascular effects of tadalafil. **European Heart Journal**, v.4, n. H, p. H32 – H47, 2002.

EROGLU, L.; GUVEN, O. The effects of moclobemide on the yohimbine-induced anxiogenic action in the elevated plus-maze. **Pharmacological Research**, v. 37, n. 2, p. 137 – 43, 1998.

FAHRENKRUG, J.; OTTESEN, B. Nervous release of vasoactive intestinal polypeptide from the feline uterus: pharmacological characteristics. **The Journal of Physiology**, v. 331, p. 451 – 460, 1982.

FELDMAN, H.A.; GOLDSTEIN, I.; HATZICHRISTOU, D.G. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **The Journal of Urology**, v. 151, p. 54-61, 1994.

FERNANDEZ-TERUEL. A.; ESCORIHUELA, R.M.; BOIX, F.; LONGONI, B.; CORDA, M.G.; TOBENA, A. Imipramine and desipramine decrease the GABA-stimulated chloride uptake, and antigabaergic agents enhance their action in the forced swimming test in rats. **Neuropsychobiology**, v. 23, n. 3, p. 147 – 152, 1990.

FERREIRA, I.C.P.; LONARDONI, M.V.C.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L.H.B.; OLIVEIRA, A.J.B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal

extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325 – 327, 2004.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 47 – 51, 1975.

FILIPPI, S.; LUCONI, M.; GRANCHI, S.; NATALI, A.; TOZZI, P.; FORTI, G.; LEDDA, F.; MAGGI, M. Endothelium-dependency of yohimbine-induced corpus cavernosum relaxation. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 4, p. 295 – 307, 2002.

FOIDART, A.; HARADA, N.; BALTHAZART, J. Aromatase-immunoreactive cells are present in mouse brain areas that are known to express high levels of aromatase activity. **Cell and Tissue Research**, v. 280, n. 3, p. 561 – 574, 1995.

FORSTERMANN, U.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E.I.; KLEINERT, H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 9, p. 1321 - 1332, 1995.

FRANCA, O.O.; BROWN, R.T.; SANTOS, C.A. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 208 – 210, 2000.

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 53, n. 5, p. 557 – 573, 1983.

GARCIA RUBEN, M.F.; KEITH, S.B. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1093 – 1095, 1976.

GEELLEN, P.; DROLET, B.; RAIL, J.; BERUBE, J.; DALEAU, P.; ROUSSEAU, G. Sildenafil (VIAGRA) prolongs cardiac repolarization by blocking rapid component of the delayed rectifier potassium current. **Circulation**, v. 102, p. 275 – 277, 2000.

GITLIN, M.J. Effects of depression and antidepressants on sexual functioning. **Bulletin Menninger Clinical**, v. 59, n. 2, p. 232 – 248, 1995.

GIULIANO, F.; BERNABE, J.; JARDIN, A.; ROUSSEAU, J.P. Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. **The Journal of Urology**, v. 150, p. 519 – 524, 1993.

GIULIANO, F.; RAMPIN, O. Central control of erection and its pharmacological modification. **Current Opinion in Urology**, v. 10, n. 6, p. 629 – 633, 2000.

GIULIANO, F.; RAMPIN, O. Central regulation of penile erection. **Neuroscience & Biobehavior Reviews**, v. 24, p. 517 – 533, 2000a.

GIULIANO, F.; RAMPIN, O. Central noradrenergic control of penile erection. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, p. 13 – 19, 2000b.

GIULIANO, F.; ALLARD, J. Dopamine and male sexual function. **European Urology**, v. 40, n. 6, p. 601 - 618, 2001.

GIULIANO, F.; VARANESE, L. Tadalafil: a novel treatment for erectile dysfunction. **European Heart Journal**, v. H, p. H24 – H31, 2002.

GIULIANO, F. Apomorphine SL: Evolution of a centrally acting treatment for erectile dysfunction. **European Urology Supplements**, v. 1, p. 1 – 3, 2002.

GOLDBERG, M.R.; ROBERTSON, D. Yohimbine: a pharmacological probe for study of the α_2 -adrenoreceptor. **Pharmacology Reviews**, v. 35, p. 143 – 180, 1983.

GOLDSTEIN, I. Vasomax Study Group. Efficacy and safety of oral phentolamine (Vasomax) for the treatment of minimal erectile dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 159, p. 240 (abstract), 1998.

GOMES, S.M.; CAVALCANTI, T.B. Morfologia floral de *Aspidosperma* Mart. & Zucc. (Apocynaceae). **Acta Botânica Brasílica**, v. 15, n. 1, p. 73-88, 2001.

GRAENING, T.; SCHMALZ, H.G. Total synthesis of colchicine in comparison: a journey through 50 years of synthetic organic chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 25, p. 3230 – 3256, 2004.

GRUNEWALD, K.K.; BAILEY, R.S. Commercially marketed supplements for bodybuilding athletes. **Sports Medicine**, v. 15, n. 2, p. 90 – 103, 1993.

GU, J.; POLAK, J.M.; LAZARIDES, M.; MORGAN, R.; PRYOR, J.P.; MARANGOS, P.J.; BLANK, M.A.; BLOOM, S.R. Decrease of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the penises from impotent men. **The Lancet**, v. 2, n. 8398, p. 315 - 318, 1984.

GUAY, A.T. Erectile dysfunction. Are you prepared to discuss it? **Postgraduate Medical Journal**, v. 97, n. 4, p. 127 - 140, 1995.

GUAY, A.T.; SPARK, R.F.; JACOBSON, J.; MURRAY, F.T.; GEISSER, M.E. Yohimbine treatment of organic erectile dysfunction in a dose-escalation trial. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 1, p. 25 – 31, 2002.

GUIRGUIS, W.R. Oral treatment of erectile dysfunction: from herbal remedies to designer drugs. **Journal of Sex and Marital Therapy**, v. 24, p. 69 - 73, 1998.

GUPTA, S.; MORELAND, R.B.; DLEY, J.T.; YANG, S.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A.M. Corpus cavernosum smooth muscle expresses functional postsynaptic alpha-2-ARs. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1237 – 1245, 1998.

GWINUP, G. Oral phentolamine in nonspecific erectile insufficiency. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, n. 2, p. 162 – 163, 1998.

HÄGG, M.; BERNDTSSON, M.; MANDIC, A.; ZHOU, R.; SHOSHAN, M.C.; LINDER, S. Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids. **Molecular Cancer Therapy**, v. 3, n. 4, p. 489 – 497, 2004.

HALL, I.P. Isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors: potential clinical uses. British Journal of Clinical Pharmacology, v. 35, p. 1 – 7, 1993.

HAMBUEGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864 – 3874, 1991.

HARVEY, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 196 – 198, 1999.

HAYASHIDA, H.; OKAMURA, T.; TOMOYOSHI, T.; TODA, N. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. **The Journal of Urology**, v. 155, n. 3, p. 1122 – 1127, 1996.

HEATON, J.P. Apomorphine: an update of clinical trial results. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, n. 4, p. S67 - S73, 2000.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E. Comparison of the responses to drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 81 – 8, 1985 .

HEDLUND, P.; ASZODI, A.; PFEIFER, A.; ALM, P.; HOFMANN, F.; AHMAD, M.; FASSLER, R.; ANDERSSON, K.E. Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, v. 97, n. 5, p. 2349 – 2354, 2000.

HELM, G.; OTTESEN, B.; FAHRENKRUG, J.; LARSEN, J.J.; OWMAN, C.; SJOBERG, N.O.; STOLBERG, B.; SUNDLER, F.; WALLEES, B. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the human female reproductive tract: distribution and motor effects. **Biology of Reproduction**, v. 25, n. 1, p. 227 - 234, 1981.

HERNANDEZ-GONZALEZ, M. Prepubertal genital grooming and penile erections in relation to sexual behavior of rats. *Physiology & Behavior*, v. 71, n. (1-2), p. 51 –6, 2000.

HOKFELT, T.; JOHANSSON, O.; HOLETS, V.; MEISTER, B.; MELANDER, T. Distribution of neuropeptides with special reference to their coexistence with classical transmitters. In: **Psychopharmacology, the Third Generation of Progress**. P 401 – 406. Ed. H. Y. Meltzer. Raven Press : New York, 1987.

HOLMQUIST, F.; ANDERSSON, K.E; HEDLUND, H. Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 139, n. 1, p. 113 - 122, 1990.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **Journal of Physiology**, v. 449, p. 295 – 311, 1992.

HOLMQUIST, F.; KIRKEBY, H.J.; LARSSON, B.; FORMAN, A.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. Functional effects, binding sites and immunolocalization of endothelin-1 in isolated penile tissues from man and rabbit. **The Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v. 261, n. 2, p. 795 - 802, 1992a.

HOYLE, C.H. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. **General Pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 827 - 831, 1990.

HUANG, Y.L.; LEU, S.F.; LIU, B.C.; SHEU, C.C.; HUANG, B.M. In vivo stimulatory effect of *Cordyceps sinensis* mycelium and its fractions on reproductive functions in male mouse. **Life Sciences**, v. 75, n. 9, p. 1051 – 1062, 2004.

IGNARRO, L.J.; BUSH, P.A.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; FUKUTO, J.M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 170, n. 2, p. 843 – 850, 1990.

ISHIKURA, F.; BEPPU, S.; HAMADA, T.; KHANDHERIA, B.K.; SEWARD, J.H. Effects of sildenafil citrate (VIAGRA) combined with nitrate on heart. **Circulation**, v. 102, p. 2516 – 2521, 2000.

JÁCOME, R.L.R.P.; SOUZA, R.A.; OLIVEIRA, A.B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico “Pau-Pereira”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 39- 41, 2003.

JARDIN, A.; WAGNER, G.; KHOURY, S. Recommendations of the 1st International Consultation on Erectile Dysfunction. Co-sponsored by the World Health Organization (WHO), **International Consultation on Urological Diseases (ICUD) and Société Internationale d’Urologie (SIU)** and held July 1-3, 1999, Paris. p. 713., 2000.

JEREMY, J.Y.; BALLARD, S.A.; NAYLOR, A.M.; MILLER, M.A.; ANGELINI, G.D. 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. **British Journal of Urology**, v. 79, n. 6, p. 958 - 963, 1997.

KALSI, J.S.; KELL, P.D.; CELLEK, S.; RALPH, D.J. NCX-911, a novel nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor relaxes rabbit corpus cavernosum in the absence of endogenous nitric oxide. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, n. 2, p. 195 – 200, 2004.

KARKANIS, T.; DEYOUNG, L.; BROCK, G.B.; SIMS, S.M. Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in corpus cavernosum smooth muscle: a novel mechanism for control of penile erection. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 1, p. 301 – 313, 2003.

KATZUNG, B.G.; FURTS, D.E. Nonsteroid anti-inflammatory drugs; disease modifying antirheumatic drugs; nonopioid analgesics; drugs used in gout. In: KATZUNG, B.G. **Basic and clinical pharmacology**. 7th ed. Stamford: Appleton & Lange, cap. 36, p. 588, 1998.

KEENE, L.C; DAVIES, P.H. Drug-related erectile dysfunction. **Adverse Drug Reaction Toxicology Review**, v. 8, n. 1, p. 5 – 24, 1999.

KIELY, E.A.; BLOOM, S.R.; WILLIAMS, G. Penile response to intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide alone and in combination with other vasoactive agents. **British Journal of Urology**, v. 64, n. 2, p. 191 – 194, 1989.

KIM, N.; VARDI, Y.; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLDSTEIN, I.; SAÉNZ DE TEJADA, I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 437-442, 1993.

KINSEY, A.C.; POMEROY, W.R.; MARTIN, C.E. Sexual behavior in the human male. 1948. **American Journal of Public Health**, v. 93, n. 6, p. 894 – 898, 2003.

KIRKEBY, H.J.; JORGENSEN, J.C.; OTTESEN, B. Neuropeptide Y (NPY) in human penile corpus cavernosum tissue and circumflex veins-occurrence and in vitro effects. **The Journal of Urology**, v. 145, n. 3, p. 605 - 609, 1991.

KIRKEBY, H.J.; FAHRENKRUG, J.; HOLMQUIST, F.; OTTESEN, B. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide histidine methionine (PHM) in human penile corpus cavernosum tissue and circumflex veins: localization and in vitro effects. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 1, p. 24 - 30, 1992a.

KIRKEBY, H.J.; LUNDBECH, P.E.; DJURHUUS, J.C.; FORMAN, A. Effects of vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine, and neuropeptide Y on intracavernous pressure in the rabbit. **Urology**, v. 40, n. 3, p. 270 - 276, 1992b.

KIRKEBY, H.J.; SVANE, D.; POULSEN, J.; TOTTRUP, A.; FORMAN, A.; ANDERSSON, K.E. Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 149, n. 3, p. 385 - 392, 1993.

KORENMAN, S.G. New insights into erectile dysfunction: a practical approach. **The American Journal of Medicine**, v. 105, n. 2, p. 135 – 144, 1998.

KURT, M.; BILGE, S.S.; AKSOZ, E.; KUKULA, O.; CELIK, S.; KESIM, Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 353 – 357, 2004.

KÜTHER, A.; WIEDENROTH, A.; MÄGERT, H.J.; ÜCKERT, S.; FORSSMANN, W.G.; STIEF, C.G. Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. **The Journal of Urology**, v. 165, p. 280 – 283, 2001.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, 119 p., Porto Alegre, 2003.

LEBRET, T.; HERVE, J.M.; GORNY, P.; WORCEL, M.; BOTTO, H. Efficacy and safety of a novel combination of L-arginine glutamate and yohimbine hydrochloride: a new oral therapy for erectile dysfunction. **European Urology**, v. 41, n. 6, p. 608 - 613, 2002.

LEE, S.W.; WANG, H.Z.M.; CHRIST, G.J. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in human corporal smooth muscle cells. **International Journal of Impotence Research**, v. 11, p. 179 – 188, 1999.

LEHNER, H.; SHCMUTZ, J. Dihydro-olivacin um dihydro-ellipticin (u-alkaloid D) aus *Aspidosperma ulei* MGF. **Helvetica Chimica Acta**, v. 44, n. 2, p. 444 – 446, 1961.

LIN, C.S.; LAU, A.; BAKIRCIOGLU, E.; TU, R.; WU, F.; WEEK, S.; NUNES, L.; LUE, T.F. Analysis of neuronal nitric oxide synthase isoform expression and identification of human nNOS- μ . **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 388 - 394, 1998.

LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. **FASEB Journal**, v. 7, p. 328 – 338, 1993

LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 119 – 126, 1987.

LITCHFIELD, L.T.J.R.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 19, p. 388 - 397, 1949.

LOPES, J.A.M. Prevalência da disfunção erétil em Poços de Caldas – Minas Gerais. Avaliação com 2000 entrevistados. **Tese de Doutorado**, Escola Paulista de Medicina, 2000.

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

LUNDBERG, J.M.; TATEMOTO, K. Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 116, n. 4, p. 393 - 402, 1982a.

LUNDBERG, J.M.; TATEMOTO, K. Vascular effects of the peptides PYY and PHI: comparison with APP and VIP. **The European Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 143 - 146, 1982b.

MACABEO, A.P.G.; KROHN, K.; GEHLE, D.; READ, R.W.; BROPHY, J.J.; CORDELL, G.A.; FRANZBLAU, S.G.; AGUINALDO, A.M. Indole alkaloids from the leaves for Philippine *Alstonia scholaris*. **Phytochemistry**, *in press*, 2005.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 143 – 172, 1998.

MAGGI, M.; FILIPPI, S.; LEDDA, F.; MAGINI, A.; FORTI, G. Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. **European Journal of Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 143 - 154, 2000.

MALENKA, R.C.; NICOLL, R.A. Dopamine decreases the calcium-activated after hyperpolarization in hippocampal CA1 pyramidal cells. **Brain Research**, v. 379, n. 2, p. 210 - 215, 1986.

MALYSZ, J.; GIBBONS, S.J.; MILLER, S.M.; GETTEMAN, M.; NEHRA, A.; SZURSEWSKI, J.H.; FARRUGIA, G. Potassium outward currents in freshly dissociated rabbit corpus cavernosum myocytes. **The Journal of Urology**, v. 166, n. 1167 – 1177, 2001.

MARCONDES-FERREIRA, W.; KINOSHITA, L. S. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, n. 2, p. 203 – 214, 1996.

MARKOWSKI, V.P.; EATON, R.C.; LUMLEY, L.A.; MOSES, J.; HULL, E.M. A D1 agonist in the MPOA facilitates copulation in male rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 483 - 486, 1994.

MASSIOT, G.; BOUMENJDEL, A.; NUZILLARD, J.M.; RICHARD, B.; MEN-OLIVIER, L.L.; DAVID, B.; HADI, H.A. Alkaloids from *Alstonia undulifolia*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 1078 – 1079, 1992.

MATSUMOTO, K.; KOHNO, S.I.; OJIMA, K.; WATANABE, H. Flumazenil but not FG7142 reverses the decrease in pentobarbital sleep caused by activation of central noradrenergic systems in mice. **Brain Research**, v. 754, n. 1-2, p. 325 – 328, 1997.

MAZZU, A.; NICHOLLS, A.; ZINNY, M. Vardenafil: a new highly selective PDE5 inhibitor, interacts minimally with nitroglycerin in healthy middle-aged subjects. **International Journal of Impotence Research**, v. 3, n. 5, p. S64 (abstract), 2001.

McKAY, D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 1, p. 4 - 16. 2004

MELIS, M.R.; ARGOLAS, A.; GESSA, G.L. Evidence that apomorphine induces penile erection and yawning by releasing oxytocin in the central nervous system. **European Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 565-570, 1989.

MELIS, M.R.; SUCCU, S.; MAURI, A.; ARGOLAS, A. Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 1968 – 1974, 1998.

MELMAN, A.; ZHAO, W.; DAVIES, K.P.; BAKAL, R.; CHRIST, G.J. The successful long-term treatment of age related erectile dysfunction with hSlo cDNA in rats in vivo. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 1, p. 285 – 290, 2003.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31 - 34, 1982.

MEYER-LINDENBERG, A.; MILETICH, R.S.; KOHN, P.D.; ESPOSITO, G.; CARSON, R.E.; QUARANTELLI, M.; WEINBERGER, D.R.; BERMAN, K.F. Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 267 - 271, 2002.

MILLER, L.C.; TAINTER, M.L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 57, p. 261, 1944.

MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of aspidosperma indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 142 – 145, 2002.

MITKA, M. Some men who take VIAGRA die - why? **The Journal of American Medical Association**, v. 283, p. 590 – 591, 2000.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Complementary Physiology and Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254 – 260, 1955.

MOON, D.G.; BYUN, H.S.; KIM, J.J. A K_{ATP}-channel opener as a potential treatment modality for erectile dysfunction. **British Journal of Urology**, v. 83, p. 837 – 841, 1999.

MORALES, A.; CONDRA, M.; OWEN, J.A.; SURRIDGE, D.H.; FENEMORE, J.; HARRIS, C. Is yohimbine effective in the treatment of organic impotence? Results of a controlled trial. **The Journal of Urology**, v. 137, n. 6, p. 1168 – 1172, 1987.

MORALES, A.; JOHNSTON, B.; HEATON, J.W.; CLARK, A. Oral androgens in the treatment of hypogonadal impotent men. **The Journal of Urology**, v. 152, p. 1115 - 1118, 1994.

MORALES, A.; GINGELL, C.; COLLINS, M.; WICKER, P.A.; OSTERLOH, I.H. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 10, n. 2, p. 69 – 73, 1998.

MOREIRA, E.D.; ABDO, C.H.; TORRES, E.B.; LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v. 58, n. 4, p. 583 – 588, 2001.

MOREIRA, E.D.; LISBOA LOBO, C.F.; VILLA, M.; NICOLOSI, A.; GLASSER, D.B. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 2, p. S3 - S9, 2002.

MORELAND, R.B.; HSIEH, G.; NAKANE, M.; BRIONI, J.D. The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutic**, v. 296, n. 2, p. 225 – 234, 2001.

MORS, B.W.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal Plants of Brazil. **Reference Publications**, Algonac. 501p., 2000.

MOURAS, H. Identifying distinct components in the cerebral treatment of visual sexual information through functional neuroimaging. **Journal of Social Biology**, v. 198, n. 3, p. 247 – 253, 2004.

MULHALL, J.P.; DALLER, M.; TRAISH, A.M.; GUPTA, S.; PARK, K.; SALIMPOUR, P.; PAYTON, T.R.; KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I. Intracavernosal forskolin: role in management of vasculogenic impotence resistant to standard 3-agent pharmacotherapy. **The Journal of Urology**, v. 158, n. 5, p. 1752 – 1758, 1997.

NEVES, G.; RATES, S.M.K. Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 949 – 957, 2004.

NIH Consensus Conference – Impotence. **The Journal of American Medical Association**, v. 270, p. 83 – 90, 1993.

OKAMURA, T.; AYAJIKI, K.; TODA, N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. H1075 – H1081, 1998.

OKAMURA, T.; AYAJIKI, K.; FUJIOKA, H.; TODA, M.; FUJIMIYA, M.; TODA, N. Effects of endothelial impairment by saponin on the responses to vasodilators and nitrenergic nerve stimulation in isolated canine corpus cavernosum. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 802 - 808, 1999.

OKAMURA, T.; FUJIOKA, H.; AVAJIKI, K. Effects of calcium antagonists on nitrenergic nerve function in canine corpus cavernosum. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 802 – 808, 2001.

OLIVEIRA, A.J.B. Estudo de Seis Espécies do Gênero *Aspidosperma* Utilizando GC, GC/MS e HPLC: Análise Qualitativa e Quantitativa. Teste Bioautográfico; Cultura de Tecidos e Células Vegetais e Rota de Preparação dos Compostos Diméricos Ramiflorina A e Ramiflorina B, **Tese de Doutorado**, Unicamp, Campinas, 1999.

OLIVEIRA, D.G.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.C.; HAVT, A.; NOBRE, A.C.L.; MARANGONI, S.; CÂMARA, P.R.; ANTUNES, E.; NUCCI, G.; BELIAM, L.O.S.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Structural and biological characterization of a crotopotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, p. 53 - 62, 2003.

OOI, H.; COLUCCI, W.S. Pharmacological treatment of heart failure. In: **The pharmacological basis of therapeutics**, Ed 10. p.901, New York: McGraw-Hill, 2001.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149 – 167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 535 – 529, 1986.

POMERANZ, H.D.; BHAVSAR, A.R. Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (viagra): a report of seven new cases. **Journal of Neuroophthalmology**, v. 25, n. 1, p. 9 – 13, 2005.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives of International Pharmacodynamic Therapy**, v. 229, n. 2, p. 327 – 336, 1977.

PORST, H.; PATMA-NATHAN, H.; GUILIANO, F.; ANGLIN, G.; VARANESE, L.; ROSEN, R. Efficacy of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction at 24 and 36 hours after dosing: a randomized, controlled study. **Urology**, v. 62, p. 121 – 125, 2003.

QUINN, M.M.; WEGMAN, D.H.; GREAVES, I.A.; HAMMOND, S.K.; ELLENBECKER, M.J.; SPARK, R.F.; SMITH, E.R. Investigation of reports of sexual dysfunction among male chemical workers manufacturing stilbene derivatives. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 18, n. 1, p. 55 - 68, 1990.

QUIROS, C.F.; EPPERSON, A.; HU, J.; MIGUEL, H. Physiological and cytogenetical characterization of Maca, *Lepidium mewenii* Walp. **Economical Botany**, v. 50, p. 216 – 233, 1996.

RAMPIN, O.; GIULIANO, F. Brain control of penile erection. **World Journal of Urology**, v. 19, n. 1, p. 1 – 8, 2001.

RAMPIN, O.; JEROME, N.; SUAUDEAU, C. Proerectile effects of apomorphine in mice. **Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 2329 – 2336, 2003.

REID, K.; SURRIDGE, D.H.; MORALES, A.; CONDRA, M.; HARRIS, C.; OWEN, J.; FENEMORE, J. Double-blind trial of yohimbine in treatment of psychogenic impotence. **The Lancet**, v. 2, n. 8556, p. 421 - 423, 1987.

REMBOLD, C.M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARABY M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego: Academic Press, p. 227 – 239, 1996.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 65 – 70, 2005.

RICHARDSON, K.C. The fine structure of autonomic nerve endings in smooth muscle of the rat vas deferens. **Journal of Anatomy**, v. 96, p. 427 – 442, 1962.

RODGERS, R.J.; CUTLER, M.G.; JACKSON, J.E. Behavioural effects in mice of subchronic chlordiazepoxide, maprotiline and fluvoxamine. II. The elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 57, n. 1-2, p. 127 – 136, 1997.

RODRIGUEZ-MANZO, G.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. **Behavioral Brain Research**, v. 62, n. 2, p. 127 – 134, 1994.

RODRIGUEZ-MANZO, G. Yohimbine interacts with the dopaminergic system to reverse sexual satiation: further evidence for a role of sexual motivation in sexual exhaustion. **European Journal of Pharmacology**, v. 372, n. 1, p. 1 – 8, 1999.

ROSEN, R.C.; FISHER, W.A.; 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. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 5, p. 607 – 617, 2004.

ROTELLA, P. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, p. 674 – 682, 2002.

SACHS, B.D.; BAUM, M.J.; MELMAN, A. Normal sexual behavior and penile reflexes in long-term diabetic male rats. **Archives of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 351 – 353, 1982.

SACHS, C.J. Oral analgesics for acute nonspecific pain. **American Family Physician**, v. 71, n. 5, p. 913 – 918, 2005.

SAÉNZ DE TEJADA, I.; BLANCO, R.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; DE LAS MORENAS, A.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. Cholinergic neurotransmission in human

corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. **The American Journal of Physiology**, v. 254, p. H459 – H467, 1988.

SAÉNZ DE TEJADA, I.; CARSON, M.P.; DE LAS MORENAS, A.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A.M. Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. **American Journal of Physiology**, v. 261, n. (4), p. H1078 – H1085, 1991.

SAÉNZ DE TEJADA, I.; GARVEY, D.S.; SCHROEDER, J.D.; SHELEKHIN, T.; LETTS, L.G.; FERNÁNDEZ, A.; CUEVAS, B.; GABANCHO, S.; MARÍNEZ, V.; ANGULO, J.; TROCHA, M.; MAREK, P.; CUEVAS, P.; TAM, S.W. Design and evaluation of nitrosylade α -AR antagonists as potential agents for the treatment of impotence. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v. 290, p. 121 – 128, 1999.

SAÉNZ DE TEJADA, I.; ANGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; MONCADA, I.; ALLONA, A. The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. **International Journal of Impotence Research**, v. 13, p. 282 – 290, 2001.

SAHPAZ, S.; BORIES, C.; LOISEAU, P.M.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVE, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, n. 6, p. 538 – 540, 1994.

SAITO, M.; BRODERICK, G.; WEIN, A.J.; LEVIN, R.M. Effect of alteration in the extracellular potassium and calcium on field-stimulated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. **General Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 375 – 378, 1996.

SAKAI, S. Chemical studies of indole alkaloids. **Yakugaku Zasshi**, v. 115, n. 5, p. 351 - 369, 1995.

SALYER, D. The dangers of using and abusing Viagra. **Survival News**, v. 15, n. 6, p. 23 – 24, 2004.

SAM, E. Pharmacokinetics, biodistribution and mode of action of apomorphine. **Pharmaceutical Sciences**: Leuven University Press, p. 182, 1997.

SANTOS, J.C.S.; SILVA, R.M.C.; ESTEVES, T.B.C.; ALMEIDA, C.F.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C.; MELO, A.M.M.; AMÂNCIO, F.F.; SCHWARTZ, M.O.E.; LIMA, C.S.A. Atividade moluscicida e cercaricida de plantas do semi-árido pernambucano. **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, p.124, 2004.

SANTOS, S.R.; TANUS RANGEL, E.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma subcanum* Mart. **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, p.141, 2004a.

SANTOS, S.R.; TANUS RANGEL, E.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da atividade antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma subcanum* Mart. **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, p.141, 2004b.

SATO, Y.; CHRIST, G.J.; HORITA, H.; ADACHI, H.; SUZUKI, N.; TSUKAMOTO, T. The effects of alterations in nitric oxide levels in the paraventricular nucleus on copulatory behavior and reflexive erections in male rats. **The Journal of Urology**, v. 162, n. 6, p. 2182 – 2185, 1999.

SCHIAVI, R.C.; WHITE, D.; MANDELI, J.; LEVINE, A.C. Effect of testosterone administration n sexual behavior and mood in men with erectile dysfunction. **Archives of Sexual Behavior**, v. 26, p. 231 - 241, 1997.

SCHMUTZ, J.; HUNZIKER, F.; HIRT, R. Ulein, das hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mgf. **Helvetica Chmica Acta**, v. 40, n. 5, p. 1189 – 1200, 1957.

SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinolaxin-1-one as a heme site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl ciclase. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p. 1 - 5, 1996.

SHARABI, F.M.; DAABEES, T.T.; EL-METWALLY, M.A.; SENBEL, A.M. Effect of sildenafil on the isolated rat aortic rings. **Fundaments of Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 449 – 456, 2005.

SIBLEY, D.R. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 313 – 341, 1999.

SIMONSEN, U.; PIETRO, D.; HERNANDEZ, M.; SÁENZ DE TEJADA, I.; GARCIA-SACRISTAN, A. Prejunctional alpha₂-adrenoceptors inhibit nitrgergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. **The Journal of Urology**, v. 157, p. 2356 – 2360, 1997.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, n. (5), p. 557 – 559, 1998.

SMITH, E.R.; LEE, R.L.; SCHNUR, S.L.; DAVIDSON, J.M. Alpha₂ adrenoceptor antagonists and male sexual behavior: I. Mating behavior. **Physiology and Behavior**, v. 41, p. 7 – 14, 1978a.

SMITH, E.R.; LEE, R.L.; SCHNUR, S.L.; DAVIDSON, J.M. Alpha₂ adrenoceptor antagonists and male sexual behavior: II. Erectile and ejaculatory reflexes. **Physiology and Behavior**, v. 41, p. 15 – 19, 1978b.

SOARES, K.C.N.; MASUDA, E.T.; RATTMANN, Y.D.; SOUZA, M.; VELA, W.M.; RIECK, L.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Efeitos da uleína sobre a contratilidade do músculo liso: envolvimento dos canais de cálcio. **XXXVI Congresso de Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2004.

SOBBOTA, J. **Atlas de Anatomia Humana**, v. 2. 20^a Ed., Guanabara Koogan, 1995.

SODERLING, S.H.; BEAVO, J.A. Regulation of camp and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 174 – 179, 2000.

SOKOLOFF, P.; SCHWARTZ, J.C. Novel dopamine receptors half a decade later. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 8, p. 270 - 275, 1995.

SPEKTOR, M.; RODRIGUEZ, R.; ROSENBAUM, R.S.; WANG, H.Z.; MELMAN, A.; CHRIST, G.J. Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: further evidence of the physiological relevance of the Maxi-K channel subtype to the regulation of human corporeal smooth muscle tone in vitro. **The Journal of Urology**, v. 167, n. 6, p. 2628 – 2635, 2002.

SPERLING, H.; LÜMEN, G.; LUBOLDT, H.J.; RUBBEN, H. Secondary erectile dysfunction. Is oral medication in the diagnostic phase indicated? **Urologe A**, v. 38, p. 56 - 59, 1999.

SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGGE, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M. As extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile α -adrenoceptors. **The Journal of Urology**, v. 168, p. 160 – 163, 2002.

STECHER, G.; HUCK, C.W.; STÖGG, L.; BONN, G.K. Phytoanalysis: a challenge in phytomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 1 - 14, 2003.

STEERS, W.D.; MCCONNELL, J.; BENSON, G.S. Some pharmacological effects of yohimbine on human and rabbit penis. **The Journal of Urology**, v. 84, p. 199 – 802, 1984.

STEERS, W.D. Neural control of penile erection. **Seminars in Urology**, v. 8, n. 2, p. 66 –79, 1990.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367 – 370, 1985.

STIEF, C.G.; WETTERAUER, U.; SCHAEBSDAU, F.H.; JONAS, U. Calcitonin-gene-related peptide: a possible role in human penile erection and its therapeutic application in impotent patients. **The Journal of Urology**, v. 146, n. 4, p. 1010 – 1014, 1991.

STIEF, C.G. Central mechanisms of erectile dysfunction: what a clinician may want to know. **International Journal of Impotence Research**, v. 15, n. 2, p. S3 - S6, 2003.

STIEF, C.G.; ÜCKERT, S.; JONAS, U. Strategies in the oral pharmacotherapy of male erectile dysfunction viewed from bench and bedside (Part I). **The International Journal of Men's Health and Gender**, v. 2, n. 1, p. 87 – 94, 2005.

STJÄRNE, L. Basic mechanisms and local modulation of nerve impulse-induced secretion of neurotransmitters from individual sympathetic nerve varicosities. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 112, p. 1 - 137, 1989.

STJÄRNE, L.; ASTRAND, P.; BAO, J.X.; GONON, F.; MSGHINA, M.; STJÄRNE, E. Spatiotemporal pattern of quantal release of ATP and noradrenaline from sympathetic nerves: consequences for neuromuscular transmission. **Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research**, v. 29, p. 461 – 496, 1994.

STJÄRNE, L. Novel dual “small” vesicle model of ATP- and noradrenaline-mediated sympathetic neuromuscular transmission. **Autonomic Neuroscience Basic and Clinical**, v. 87, p. 16 – 36, 2001.

TAKAHASHI, Y.; ABOSEIF, S.R.; BENARD, F.; STIEF, C.G.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Effect of intracavernous simultaneous injection of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide on canine penile erection. **The Journal of Urology**, v. 148, p. 446 – 448, 1992.

TAM, S.W.; WORCEL, M.; WYLLIE, M. Yohimbine: a clinical review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91, p. 215 – 243, 2001.

TATEMOTO, K.; MUTT, V. Isolation and characterization of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. **Nature**, v. 285, p. 417 – 418, 1981.

TEIXEIRA, C.E.; FARO, R.; MORENO, R.A.; NETTO JR, N.R.; 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.

THADANI, U.; MAZZU, A. Exercise-induced ischemia was not adversely affected by vardenafil during exercise stress test in men with coronary artery disease. **European Urology**, v. 1, n. 1, p. 151, 2002.

THERHAG, A.G. Erfahrungsbericht über Afrodor 2000. **Urologe B**, v. 31, p. 24 - 25, 1991.

THOMAS, J.A. Pharmacological aspects of erectile dysfunction. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 101 – 112, 2002.

TODA, N.; UCHIYAMA, M.; OKAMURA, T. Prejunctional modulation of nitroxidergic nerve function in canine cerebral arteries. **Brain Research**, v. 700, n. 1-2, p. 213 – 218, 1995.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 233 - 266, 2005.

TRAISH, A.M.; CARSON, M.P.; KIM, N.; GOLDSTEIN, I.; SAÉNZ DE TEJADA, I. Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. **The Journal of Urology**, v. 144, p. 1036 - 1040, 1990.

TRAISH, A.M.; NETSUWAN, N.; DALEY, J.; PADMAN-NATHAN, P.; GOLDSTEIN, I.; SAÉNZ DE TEJADA, I. A heterogenous population of alpha-1-Ars mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephine. **The Journal of Urology**, v. 153, p. 222 – 227, 1994.

TRAISH, A.M.; MORELAND, R.B.; HUANG, Y.H.; GOLDSTEIN, I. Expression of functional alpha-2-AR subtypes in human corpus cavernosum and in human corpus cavernosum smooth muscle cells. **Receptor and Signal Transduction**, v. 7, p. 55 – 67, 1997.

TRAISH, A.; GUPTA, S.; GALLANT, C.; HUANG, Y.H.; GOLDSTEIN, I. Phentolamine mesylate relaxes penile corpus cavernosum tissue by adrenergic and non-adrenergic mechanisms. **International Journal of Impotence Research**, v. 10, n. 4, p. 215 – 223, 1998.

TRAISH, A.M.; KIM, N.N.; GOLDSTEIN, I.; MORELAND, R.B. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization and physiological function. **Journal of Andrology**, v. 20, p. 671 – 682, 1999.

VAN MEER, P.; RABER, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. **Biochemistry Journal**, v. 389, n.3, p. 593 – 610, 2005.

VEMULAPALLI, S.; KUROWSKI, S. Phentolamine mesylate relaxes rabbit corpus cavernosum by a nonadrenergic noncholinergic mechanism. **Fundamentals of Clinical Pharmacology**, v. 15, p. 1 - 7, 2001.

VENTURA, S. Autoinhibition, sympathetic cotransmission and biphasic contractile responses to trains of nerve stimulation in the rodent vas deferens. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, p. 965 - 973, 1998.

VIRAG, R.; OTTESEN, B.; LEVY, C.; WAGNER, G. Vasoactive intestinal polypeptide release during penile erection in man. **The Lancet**, v. 2, n. (8308), p. 1166, 1982.

WAGNER, H.; NÖRR, H.; WINTERHOFF, H. Plant Adaptogens. **Phytotherapy**, v. 1, p. 63 – 76, 1994.

WAINBERG, J. Contributions to the clinical validation of the traditional use of *Ptychopetalum* species. **1st International Congress on Ethnopharmacology**. Strasbourg, France, June 6 – 9, 1990.

WANG, H.Z.; LEE, S.W.; CHRIST, G.J. Comparative studies of the maxi-K (K_{Ca}) channel in freshly isolated myocytes in human and rat corpora. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, p. 9 – 18, 2000.

WERNER, M.E.; ZVARA, P.; MEREDITH, A.L.; ALDRICH, R.W.; NELSON, M.T. Erectile dysfunction in mice lacking the large conductance calcium-activated potassium (BK) channel. **Journal of Physiology**, *In press*, 2005.

WIKLUND, N.P.; LEONE, A.M.; GUSTAFSSON, L.E.; MONCADA, S. Release of nitric oxide evoked by nerve stimulation in guinea-pig intestine. **Neuroscience**, v. 53, n. 3, p. 607 - 611, 1993.

YAJIMA, M.; CONO, S.; BABA, K.; KOMURA, H.; HARAGUCHI, C.; IWAMOTO, T.; OSADA, T. The coexistence of neuropeptide Y and norepinephrine in rabbit corpus cavernosum pēnis: an in vitro study. **International Journal of Impotence Research**, v. 4, n. 1, p. 9 – 12, 1992.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411 - 415, 1988.

YIANGOU, Y.; CHRISTOFIDES, N.D.; GU, J.; BLANK, M.A.; POLAK, J.M.; BLOOM, S.R. Peptide histidine methionine (PHM) and the human male genitalia. **Neuropeptides**, v. 6, n. 2, p. 133 - 142, 1985.

YOUNG, J.; AUERBACH, S.; PROST, H. Vardenafil, a new selective PDE5 inhibitor, significantly improved all IIEF domains and showed favorable safety profile in patients with erectile dysfunction over 12 weeks. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 5, p. 224, 2001.

ZAHER, T.F. Papaverine plus PGE₁ versus PGE₁ alone for intracorporeal injection therapy. **International Urology and Nephrology**, v. 30, p. 193 – 196, 1998.

ZHU, J.S.; HALPERN, G.M.; JONES, K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 4, n. 3, p. 289 - 303, 1998a.

ZHU, J.S.; HALPERN, G.M.; JONES, K. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: part II. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 4, n. 4, p. 429 – 457, 1998b.

ZORNIOTTI, A.W. Experience with buccal phentolamine mesylate for impotence. **International Journal of Impotence Research**, v. 6, n. 1, p. 37 – 41, 1994.

9 Anexos

ANEXO A - Efeito de SF₃₋₅ no teste do campo aberto em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Cruzamentos	Rearing	Grooming
Controle	-	35,62 ± 3,09	20,25 ± 2,98	3,62 ± 0,90
SF ₃₋₅	12,5	58,00 ± 3,56**	26,00 ± 1,60	4,37 ± 0,95
	25	54,75 ± 4,53*	19,25 ± 3,92	4,50 ± 0,86
	50	51,37 ± 4,77*	13,62 ± 2,19	3,75 ± 1,68

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de cruzamentos, *rearing* e *grooming* durante 4 minutos. **p* < 0,05 e ***p* < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO B - Efeito de SF₃₋₅ no teste da placa exploratória em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Explorações / 5 min
Controle	-	31,62 ± 3,12
SF₃₋₅	25	27,50 ± 3,39
	50	16,75 ± 2,40**

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de explorações durante um período 5 min. ***p* < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO C - Efeito de SF₃₋₅ nos braços abertos (A) e fechados (B) no teste do do labirinto em cruz elevado em camundongos.

A

Grupo	Dose (mg/kg)	Braço aberto	
		Entradas	Tempo (s)
Controle	-	7,00 ± 1,23	125,25 ± 17,38
SF ₃₋₅	12,5	6,37 ± 0,65	91,12 ± 15,58
	25	3,87 ± 1,72	50,37 ± 26,90*
	50	0,62 ± 0,41**	8,00 ± 5,26***

B

Grupo	Dose (mg/kg)	Braço fechado	
		Entradas	Tempo (s)
Controle	-	7,87 ± 0,78	131,75 ± 15,90
SF ₃₋₅	12,5	8,50 ± 1,33	167,50 ± 18,98
	25	6,12 ± 1,43	228,62 ± 25,24**
	50	2,75 ± 1,48*	274,75 ± 12,12***

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de entradas e tempo permanência nos braços abertos (A) e fechados (B) do aparelho durante um período de 5 min. **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO D - Efeito de SF₃₋₅ no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de sono (min)
Controle	-	65,62 ± 3,96
SF₃₋₅	25	47,75 ± 7,49
	50	40,00 ± 3,16*
	100	62,50 ± 8,62

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25, 50 e 100 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de sono (min). **p* < 0,05 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO E - Efeito de SF₃₋₅ no teste da natação forçada em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de imobilização (s)
Controle	-	154,25 ± 12,76
SF₃₋₅	25	153,50 ± 12,07
	50	92,85 ± 10,27**

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%) ou SF₃₋₅ (25 e 50 mg/kg/i.p.) 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de imobilização durante um período de 6 min. ***p* < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO F - Características do efeito pró-erétil de SF₃₋₅, Ioimbina, Apomorfina e Vardenafil em camundongos.

Grupo	Dose	Latência (1ª ereção)	Nº ereções	% animais com ereção
Controle	-	-	0,00 ± 0,00	0
SF₃₋₅	12,5	179,25 ± 108,45	0,62 ± 0,26	50*
	25	556,62 ± 168,11	1,25 ± 0,36**	75***
	50	596,62 ± 242,42	1,00 ± 0,37*	62,5**
Ioimbina	2	698,62 ± 198,23	1,12 ± 0,29*	75***
Apomorfina	1,1	536,13 ± 249,15	0,75 ± 0,36*	50*
Vardenafil	0,3	414,50 ± 187,20	1,00 ± 0,26*	75***

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), Ioimbina 2 mg/kg/i.p., Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c. ou Vardenafil 0,3 mg/kg/i.p. 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do tempo de latência para a primeira ereção e do número de ereções ou porcentagem de animais com ereção durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO G - Efeito de SF₃₋₅, Ioimbina, Apomorfina e Vardenafil nos parâmetros comportamentais de ereção em camundongos.

Grupo	Dose	Erection-like	Grooming genital
Controle	-	2,50 ± 0,56	7,75 ± 1,64
SF₃₋₅	12,5	1,37 ± 0,46	10,12 ± 4,11
	25	5,00 ± 1,08*	14,25 ± 2,84*
	50	3,25 ± 1,26	8,37 ± 1,32
Ioimbina	2	4,00 ± 1,64	7,50 ± 1,63
Apomorfina	1,1	1,25 ± 0,25	6,63 ± 1,89
Vardenafil	0,3	1,37 ± 0,91	12,00 ± 1,53

Os animais foram tratados com veículo (Controle - DMSO 3%), SF₃₋₅ (12,5, 25 e 50 mg/kg/i.p.), Ioimbina 2 mg/kg/i.p., Apomorfina 1,1 µg/kg/s.c. ou Vardenafil 0,3 mg/kg/i.p. 30 min antes do início do experimento. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 8) do número de *erection-like* e de *grooming* genital durante um período de observação de 30 min. **p* < 0,05 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO H - Efeito de SF₃₋₅ no canal deferente de camundongo estimulado eletricamente (0,1 Hz).

Dose (µg/mL)	R_{máx} (%)	
	Controle	SF₃₋₅
1	100,00 ± 0,00	80,50 ± 0,50
2	100,00 ± 0,00	61,00 ± 11,0
4	99,80 ± 0,20	58,50 ± 13,50
8	99,40 ± 0,35	50,00 ± 14,00*
16	97,77 ± 0,30	48,00 ± 12,00*
32	97,77 ± 0,25	48,00 ± 12,00*
64	95,70 ± 0,50	0,00 ± 0,00**

Os tecidos foram estimulados eletricamente (ECE 0,1 Hz) em seguida receberam SF₃₋₅ 1 - 64 µg/mL ou DMSO (Controle - adicionado de forma isovolumétrica) Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. **p* < 0,05 e ***p* < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO I - Efeito de SF₃₋₅ na contração induzida por Noradrenalina e ATP em canal deferente de camundongo.

Grupo	Contração (%)	
	Controle	SF₃₋₅
Noradrenalina	99,41 ± 7,13	0,50 ± 0,50***
ATP	115,82 ± 9,20	75,83 ± 11,91

Os tecidos foram incubados com SF₃₋₅ 64 µg/mL ou DMSO (Controle – adicionado de forma isovolumétrica) e em seguida estimulados com Noradrenalina 10 µM (NORA) ou ATP 30µM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. ****p* < 0,01 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO J -Efeito de SF₃₋₅ no relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (ECE) no corpo cavernoso de coelhos.

Grupo ($\mu\text{g/mL}$)	R_{máx} (%)			
	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz
Controle	29,67 \pm 1,40	37,56 \pm 8,11	37,99 \pm 9,60	38,79 \pm 9,15
SF ₃₋₅ 1	33,43 \pm 1,93	35,68 \pm 0,68	36,93 \pm 0,56	39,20 \pm 1,70
3	33,33 \pm 5,55	41,11 \pm 3,88	36,41 \pm 2,77	36,11 \pm 2,77
10	40,41 \pm 6,77	41,67 \pm 8,33	44,79 \pm 11,6	48,12 \pm 8,12
30	53,12 \pm 0,73*	55,50 \pm 1,65	55,50 \pm 1,65	61,73 \pm 0,17
100	59,62 \pm 9,62*	59,62 \pm 9,62	59,62 \pm 9,62	63,46 \pm 13,47

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com Fenilefrina 10 μM . * $p < 0,05$ vs Controle. ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO L - Efeito de SF₃₋₅ na contração induzida Fenilefrina 10 μM (Fen) no corpo cavernoso de coelhos.

Dose (μg/mL)	R _{máx} (% Fen)		R _{máx} (% K ⁺)
	Controle	SF ₃₋₅	SF ₃₋₅
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	83,42 ± 9,60
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	86,38 ± 2,09
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	79,23 ± 2,93
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	59,52 ± 5,44
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	30,42 ± 5,44
300	60,75 ± 5,91	5,69 ± 7,64**	0,00 ± 0,00

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 μg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 μM) ou com K⁺ (60 mM). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. ***p* < 0,05, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO M - Efeito do L-NAME no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 μM.

Dose (μg/mL)	Controle	R _{máx} (%)	
		SF ₃₋₅	
		L-NAME 100 μM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	97,07 ± 1,50
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	89,55 ± 2,56
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	72,64 ± 2,36
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	38,36 ± 11,64
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	13,33 ± 7,26**
300	60,75 ± 5,91	5,69 ± 7,64**	0,00 ± 0,00***

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 μg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 μM). A pré-incubação com L-NAME 100 μM não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO N - Efeito do ODQ no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 μM.

Dose (μg/mL)	Controle	R _{máx} (%)	
		SF ₃₋₅	ODQ 10 μM
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	96,35 ± 2,48
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	92,33 ± 2,72
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	71,26 ± 7,07
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	43,60 ± 9,83
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	13,69 ± 8,57**
300	60,75 ± 5,91	5,69 ± 7,64**	2,26 ± 5,25**

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 μg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 μM). A pré-incubação com ODQ 10 μM não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. **p < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO O - Efeito da TTX no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	Controle	R _{máx} (%)	
		SF ₃₋₅	
		TTX 1 µM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	91,11 ± 4,44
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	76,66 ± 14,14
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	51,67 ± 21,67
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	23,33 ± 10,00
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	6,66 ± 0,00**

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 µg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 µM). A pré-incubação com TTX 1 µM não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4).***p* < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO P - Efeito da Glibenclamida (Glib) no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	R _{máx} (%)		
	Controle	SF ₃₋₅	
		Glib 100 µM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	86,41 ± 6,84
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	81,35 ± 6,55
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	71,98 ± 6,11
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	45,48 ± 10,65
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	30,16 ± 11,70*
300	60,75 ± 5,91	5,69 ± 7,64**	0,00 ± 0,00***

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 µg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 µM). A pré-incubação com Glibenclamida 100 µM não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001. ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO Q - Efeito da Apamina + Caribdotoxina no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	Controle	R _{máx} (%)	
		SF ₃₋₅	
		Apa + Car 0,1 µM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	81,54 ± 7,83
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	74,68 ± 8,67
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	52,58 ± 8,49
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	29,78 ± 9,45
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	8,33 ± 8,33**
300	60,75 ± 5,91	5,69 ± 7,64**	3,57 ± 7,14**

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 300 µg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 µM). A pré-incubação com Apamina 0,1 µM (Apa) + Caribdotoxina 0,1 µM (Car) não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). ***p* < 0,01, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO R - Efeito da Atropina no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	R _{máx} (%)		
	Controle	SF ₃₋₅	
		Atropina 10 µM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	73,09 ± 1,91
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	57,20 ± 7,20
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	35,96 ± 4,71
30	72,76 ± 5,01	25,20 ± 11,54	16,95 ± 16,95
100	69,76 ± 5,24	14,24 ± 6,39**	0,00 ± 0,00***

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 100 µg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 µM). A pré-incubação com Atropina 10 µM não alterou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO S - Efeito do Ácido Niflúmico no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	Controle	R _{máx} (%)	
		SF ₃₋₅	
		Ác. Nifl 100 µM	
1	95,61 ± 1,16	84,29 ± 4,55	34,09 ± 11,37*** ^a
3	83,88 ± 2,73	73,83 ± 5,02	7,57 ± 7,57*** ^b
10	78,76 ± 4,57	55,67 ± 7,31	0,00 ± 0,00*** ^b

A pré-incubação com Ácido Niflúmico (Ác. Nifl) 100 µM potenciou a resposta de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. ****p* < 0,01 vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica) e ^a*p* < 0,01 e ^b*p* < 0,001 vs SF₃₋₅, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO T - Efeito de SF₃₋₅ na contração do corpo cavernoso de coelhos induzida por K⁺.

Dose (µg/mL)	C_{máx} (%)	
	Controle	SF₃₋₅
30	100,00 ± 0,00	96,01 ± 0,35
100	100,00 ± 0,00	68,48 ± 18,48
300	100,00 ± 0,00	30,73 ± 17,10*

A pré-incubação do tecido com SF₃₋₅ inibe a contração induzida por K⁺ 60 mM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem de contração máxima (C_{máx}) obtida. **p* < 0,05 vs Controle, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

ANEXO U - Efeito da Nifedipina e EGTA no relaxamento do corpo cavernoso de coelhos induzido por SF₃₋₅ em resposta à contração induzida por PGF_{2α} 10⁻³ M.

Dose (μg/mL)	R _{máx} (%)	
	Controle	SF ₃₋₅
1	100,00 ± 0,00	90,80 ± 4,75
3	100,00 ± 0,00	91,11 ± 3,69
10	100,00 ± 0,00	81,86 ± 1,86
30	100,00 ± 0,00	74,03 ± 7,36*
100	100,00 ± 0,00	69,48 ± 7,26*
300	100,00 ± 0,00	52,45 ± 8,05***

A pré-incubação dos tecidos com Nifedipina 10 μM e EGTA 100 μM reduziu a resposta máxima (R_{máx}) de SF₃₋₅. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima obtida..**p* < 0,05 e ****p* < 0,01 vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica), ANOVA seguida de Student-Newman-Keul.

ANEXO V - Efeito relaxante de SF₃₋₅ em tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídos com Fenilefrina 10 µM.

Dose (µg/mL)	R_{máx} (%)	
	Controle	SF₃₋₅
1	95,28 ± 0,27	91,23 ± 16,29
3	86,33 ± 0,33	87,98 ± 19,52
10	82,21 ± 0,10	82,89 ± 24,60
30	75,28 ± 0,27	68,58 ± 24,83
100	66,33 ± 0,43	0,00 ± 0,00*

A adição cumulativa de SF₃₋₅ (1 – 100 µg/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com Fenilefrina (10 µM). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4) da porcentagem da resposta máxima (R_{máx}) obtida. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). **p* < 0,05, ANOVA seguida de Student-Newman-Keul vs Controle (DMSO adicionado de forma isovolumétrica).

