

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Doutorado em Saúde Pública

Karina Lidianne Alcântara Saraiva

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR  
DE FOSFODIESTERASE-5 (SILDENAFIL)  
SOBRE CÉLULAS DE LEYDIG E  
ESPERMATOZOIDES DE CAMUNDONGOS**

RECIFE  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5  
(SILDENAFIL) SOBRE CÉLULAS DE LEYDIG E ESPERMATOZÓIDES DE  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em  
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientadora:**

Dr<sup>a</sup> Christina Alves Peixoto

**RECIFE**

**2010**

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

S243c Saraiva, Karina Lidianne Alcântara.  
Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 (Sildenafil) sobre células de Leydig e espermatozoides de camundongos / Karina Lidianne Alcântara Saraiva. – Recife: K. L. A. Saraiva, 2010.  
133 f. : il., tabs., mapas, grafos.,

Tese (Doutorado em Saúde Pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadora: Christina Alves Peixoto.

1. Células intersticiais do testículo – ultra-estrutura. 2. Testosterona – biossíntese. 3. Inibidores de Fosfodiesterase. 4. Espermatozoides – ultra-estrutura.. I. Peixoto, Christina Alves. II. Título.

---

CDU 632.934

**KARINA LIDIANNE ALCÂNTARA SARAIVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-5  
(SILDENAFIL) SOBRE CÉLULAS DE LEYDIG E ESPERMATOZÓIDES DE  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em  
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 10/03/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup> Haiana Charifker Schindler  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

---

Dr<sup>a</sup> Nilma Cintra Leal  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

---

Dr. Helio Chiarini-Garcia  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

---

Dr<sup>a</sup> Maria Inês Wanderley  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dr<sup>a</sup> Christina Alves Peixoto  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais uma vitória.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (IAM) e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela infra-estrutura e disponibilidade de recursos.

À Dr<sup>a</sup> Christina Alves Peixoto, pela orientação e amizade.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, Dr<sup>a</sup> Maria Inês Wanderley e Dr. Daniel Pedro Udrisar, pela importante contribuição científica no desenvolvimento deste estudo.

A todos do Laboratório de Ultra-estrutura do IAM e do Laboratório de Microscopia do CETENE, pela companhia e momentos descontraídos.

Aos meus queridos amigos, pelo apoio.

A minha família, pelo amor.

SARAIVA, K. L. A. **Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 (sildenafil) sobre células de Leydig e espermatozóides de camundongos.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

## RESUMO

O inibidor de fosfodiesterase-5 (PDE5), Sildenafil, é uma nova abordagem de tratamento oral para a hipertensão pulmonar. O esquema terapêutico envolve a administração de doses elevadas diariamente e, até o momento, se desconhece a ação desta droga sobre células germinativas. Uma vez que as células de Leydig e células peritubulares apresentam a PDE5, este estudo foi conduzido para investigar os efeitos do tratamento crônico com Sildenafil sobre as células de Leydig e espermatozóides de camundongos. Após o ensaio experimental, células de Leydig e espermatozóides foram analisados por procedimentos morfológicos, imunocitoquímicos e moleculares, e a testosterona no soro foi avaliada por radioimunoensaio. Inúmeras alterações foram observadas após o tratamento. As células de Leydig apresentaram modificações ultra-estruturais, tais como REL vesicular, grandes vacúolos distribuídos no citoplasma, gotículas de lipídio claras, mitocôndrias dilatadas e círculos concêntricos de REL com vesículas na periferia, que são características típicas de células secretoras de esteróides ativadas. Os espermatozóides apresentaram mitocôndrias vacuolizadas. Um aumento na expressão da StAR, P450<sub>sc</sub>, testosterona, GCs, PKA e PKGI foi detectado nas células de Leydig. As sintases de óxido nítrico não foram detectadas nas células de Leydig pela técnica de western blot. Nos espermatozóides, a imunocitoquímica revelou uma diminuição na expressão da GCs e PKA, mas nenhuma alteração na marcação foi observada para a PKG. Nenhuma mudança significativa foi observada nos parâmetros de motilidade, viabilidade, integridade de acrossoma e DNA de espermatozóides. Adicionalmente, os níveis de testosterona no soro tornaram-se aumentados após quatro semanas de tratamento. Os resultados do presente estudo são consistentes com a hipótese de que a acumulação de GMPc, pela inibição da PDE5, e a ativação de suas vias dependentes estariam envolvidas na estimulação da biossíntese de androgênio e mudanças espermáticas.

**Palavras-chave:** Células intersticiais do testículo – ultra-estrutura, Espermatozóides – ultra-estrutura, Inibidores de Fosfodiesterase, Testosterona – biossíntese.

SARAIVA, K.L.A. **Evaluation of the phosphodiesterase-5 inhibitor effects on mouse Leydig cells and spermatozoa.** Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

## ABSTRACT

The phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor, Sildenafil, is a novel, orally treatment approach for pulmonary hypertension. The therapeutic scheme comprises the daily administration of elevated doses and, until now, its action is unknown. Since Leydig and peritubular cells present PDE5, this study was conducted to investigate the effects of the chronic treatment with Sildenafil (25mg/kg) on male *Swiss Webster* mice Leydig cells and spermatozoa. After long experimental design, Leydig cells and spermatozoa were analyzed by morphological, immunocytochemical and molecular procedures, and serum testosterone was assayed by radioimmunoassay. Numerous alterations were observed after the treatment. Leydig cells presented ultrastructural modifications, such as a vesicular SER, large vacuoles scattered through the cytoplasm, bright lipid droplets, enlarged mitochondria with discontinuous cristae and whorled membranes with vesicles at the periphery, which are typical characteristics of an activated steroid-secreting cell. Spermatozoa presented vacuolated mitochondria. An augmented expression of StAR protein, P450<sub>scc</sub>, testosterone, GCs, PKA and PKGI was detected in isolated Leydig cells. Nitric oxide synthase was not detected by western blot technique. In spermatozoa, the immunocytochemistry revealed a diminished expression of the GCs and PKA, but no labeling alteration was observed for PKG. No significant changes in motility, viability, integrity of acrosome and DNA were observed in spermatozoa. In addition, testosterone levels increased after treatment for four weeks. The results obtained in the present study are consistent with the hypothesis that the accumulation of cGMP, by PDE5 inhibition, and activation of its dependent pathways could be involved in the androgen biosynthesis stimulation and spermatogenic changes.

**Palavras-chave:** Interstitial cells from testicle – ultrastructure, Spermatozoa – ultrastructure, Phosphodiesterase Inhibitor, Testosterone – biosynthesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Ereção peniana pelo mecanismo do NO-GMPc.	20
<b>Figura 2.</b>	Síntese e receptores de GMPc.	24
<b>Figura 3.</b>	Topologia do receptor de peptídeo natriurético e seus ligantes.	27
<b>Figura 4.</b>	Tráfego de colesterol para a mitocôndria durante a esteroidogênese.	29
<b>Figura 5.</b>	Modelo ilustrando as múltiplas vias de sinalização na regulação da expressão da proteína StAR e esteroidogênese.	32
<b>Figura 6.</b>	Desenho esquemático da jornada da célula espermática durante a espermatogênese e o trânsito através dos tratos masculino e feminino.	34
<b>Figura 7.</b>	Regulação e ativação de VOCCs durante a capacitação e indução da reação de acrossoma pela zona pelúcida em espermatozóides de mamíferos.	37
<b>Figura 8.</b>	Representação esquemática do efluxo de colesterol da membrana plasmática do espermatozóide.	38
<b>Figura 9.</b>	Representação esquemática do mecanismo de ativação dos canais iônicos de espermatozóides.	39
<b>Figura 10.</b>	Representação esquemática da via de sinalização da reação de acrossoma induzida pela P4 em espermatozóides de garanhão.	40
<b>Figura 11.</b>	Modelo de sinalização do Ca <sup>2+</sup> em espermatozóide humano.	41
<b>Figura 12.</b>	Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero.	43
<b>Figura 13.</b>	Interações proteína-proteína na membrana mitocondrial externa.	46
<b>Figura 14.</b>	Vias de tradução de sinal hormonal na síntese de testosterona em células de Leydig.	48
<b>Figura 15.</b>	Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.	60
<b>Figura 16.</b>	Secções transversais ultrafinas de células de Leydig isoladas.	61
<b>Figura 17.</b>	Imunocitoquímica para StAR, P450 <sub>scc</sub> e testosterona.	62

<b>Figura 18.</b>	Microscopia óptica de células de Leydig.	68
<b>Figura 19.</b>	Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.	69
<b>Figura 20.</b>	Secções transversais ultrafinas de espermatozóides.	73
<b>Figura 21.</b>	Imunocitoquímica para StAR, P450scc, guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.	73
<b>Figura 22.</b>	Imunocitoquímica para guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.	76
<b>Figura 23.</b>	Western blot das sintases de óxido nítrico em células de Leydig.	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em células de Leydig controles e tratadas com Sildenafil 25mg/kg por um mês.	63
<b>Tabela 2</b>	Efeito do tratamento com Sildenafil durante um mês sobre os níveis de testosterona no soro (ng/mL).	64
<b>Tabela 3</b>	Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em células de Leydig controles e tratadas com Sildenafil 25mg/kg por dois meses.	75
<b>Tabela 4</b>	Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em espermatozóides controles e tratados com Sildenafil 25mg/kg.	78
<b>Tabela 5</b>	Efeito do tratamento com Sildenafil durante dois meses sobre os níveis de testosterona no soro (ng/mL).	79
<b>Tabela 6</b>	Efeito do tratamento com Sildenafil sobre motilidade e vigor de espermatozóides.	80
<b>Tabela 7</b>	Efeito do tratamento com Sildenafil sobre a integridade do acrossoma de espermatozóides.	81
<b>Tabela 8</b>	Efeito do tratamento com Sildenafil sobre a integridade do DNA de espermatozóides.	82

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
A <sub>al</sub>	Espermatogônias A <sub>alinhada</sub> (proliferativas)
ABP	Proteína de ligação de androgênios
AC	Adenilato ciclase
A <sub>is</sub>	Espermatogônias A <sub>isolada</sub> (células-tronco)
ALCs	Células de Leydig adultas
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ANT	Transportador do nucleotídeo adenina
A <sub>pr</sub>	Espermatogônias A <sub>pariada</sub> (proliferativas)
ARTIS <sub>t</sub>	Acyl-CoA tioesterase relacionada com o AA envolvida na esteroidogênese
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Enzima que catalisa a hidrólise do ATP
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BK <sub>Ca</sub>	Canais de K <sup>+</sup> ativados por Ca <sup>2+</sup>
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BSA	Soro albumina bovina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração de cálcio intracelular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl <sup>-</sup>	Cloro
CNG	canais de íons ligados a nucleotídeos
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DBI	Inibidor de ligação de diazepam
Di	Diplóteno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.P.	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol

EGF	Fator de crescimento epidermal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPOX	Epooxigenase
ERK	Proteína quinase regulada por sinal externo
FDA	Food and Drug Administration
FITC-PNA	Isotiocianato de fluoresceína associado ao iodeto de propídeo
FLCs	Células de Leydig fetais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Guanilato ciclase
GC-A	Guanilato ciclase de membrana ligada a receptores tipo A
GC-B	Guanilato ciclase de membrana ligada a receptores tipo B
GCm	Guanilato ciclase de membrana
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GnRH / LHRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GTP	Guanosina trifosfato
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HBSS	Meio Hank's
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HCl	Ácido clorídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSL	Lipase sensível a hormônio
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IGF-I	Fator-1 de crescimento semelhante à insulina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trifosfato
K <sup>+</sup>	Potássio
L	Leptóteno
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LPOX	Lipooxigenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno

MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MLN-64	Segundo domínio da proteína StAR relacionado com o transporte de lipídio
MYX	Mixotiazol
MO	Microscopia óptica
NCX	Trocadores de Na <sup>+</sup> - Ca <sup>2+</sup>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
NPC1	Proteína 1 da doença Niemann-Pick tipo C
NPC2	Proteína 2 da doença Niemann-Pick tipo C
NPR-A	Receptor de peptídeo natriurético tipo A
NPR-B	Receptor de peptídeo natriurético tipo B
NPR-C	Receptor de peptídeo natriurético tipo C
P	Paquíteno
P <sub>4</sub>	Progesterona
P450 <sub>scc</sub>	Enzima P450 de clivagem da cadeia lateral do colesterol
PAP7	Proteína associada à subunidade regulatória I $\alpha$ da PKA / TSPO
PBS	Tampão fosfato salina
PBR	Receptor de benzodiazepina periférico
PDE5	Fosfodiesterase do tipo 5
PDEs	Fosfodiesterases
PK1	Proteína dependente de quinase 1
pH <sub>i</sub>	pH interno
PI3-K	Fosfatidilinositol quinase-3
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PI	Preleptóteno
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
PMCA	ATPase de Ca <sup>2+</sup> de membrana
Proteína G <sub>i</sub>	Proteína G inibitória

Proteína Gq	Proteína G que ativa o sistema de fosfolipase
Proteína Gs	Proteína G estimulatória
R	Receptor
Rap/Ras/Raf	Proteínas quinases
RIA	Radioimunoensaio
REL	Retículo endoplasmático liso
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNE	Envelope nuclear redundante
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RyR	Receptor rianodina
SER	Retículo endoplasmático liso
SERCAs	ATPases do retículo endoplasmático
SIP	Fator proteínáceo isolado do fluido folicular humano
SR-BI	Receptor scavenger classe B tipo I
StAR	Proteína esteroidogênica regulatória aguda
TGF- $\beta$	Fator $\beta$ de crescimento tumoral
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSPO	Proteína translocadora
VDAC	Canais de ânion dependentes de voltagem
VOCCs	Canais de $\text{Ca}^{2+}$ dependentes de voltagem
Z	Zigóteno
ZP <sub>3</sub>	Proteína 3 da zona pelúcida
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ - hidroxisteróide desidrogenase

## SUMÁRIO

<b>1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA</b>	15
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b>	17
<b>2.1 Inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (Sildenafil)</b>	17
<b>2.2 O Sildenafil na hipertensão pulmonar</b>	20
<b>2.3 Sinalização celular</b>	22
2.3.1 Aspectos gerais	22
2.3.2 Mediadores intracelulares em células de Leydig	28
2.3.3 Mediadores intracelulares em espermatozóides	34
<b>2.4 Testículos</b>	42
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	49
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	50
<b>5 OBJETIVOS</b>	51
<b>5.1 Objetivo geral</b>	51
<b>5.2 Objetivos específicos</b>	51
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b>	52
<b>6.1 Solução de Sildenafil</b>	52
<b>6.2 Efeito do tratamento com Sildenafil sobre células <i>in vivo</i></b>	52
<b>6.3 Isolamento de células de Leydig</b>	53
<b>6.4 Microscopia óptica (MO)</b>	53
<b>6.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b>	54
<b>6.6 Imunocitoquímica das proteínas esteroidogênicas (StAR e P450<sub>scc</sub>), testosterona, anti-guanilato <math>\beta</math>1 solúvel, subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc e proteína quinase dependente de GMPc</b>	55
<b>6.7 Dosagem de testosterona</b>	55
<b>6.8 Parâmetros espermáticos</b>	56
<b>6.9 Imunoblot das sintases de NO (eNOS, iNOS e nNOS)</b>	56
<b>6.10 Análise estatística</b>	57
<b>7 RESULTADOS</b>	58
<b>7.1 Ensaio experimental de um mês</b>	58
7.1.1 Análise de células de Leydig por microscopia óptica	58

7.1.2 Ultra-estrutura de células de Leydig	58
7.1.3 StAR, P450 <sub>sc</sub> e Testosterona nas células de Leydig	59
7.1.4 Concentração de testosterona no soro	59
<b>7.2 Ensaio experimental de dois meses</b>	<b>65</b>
7.2.1 Análise de células de Leydig por microscopia óptica	65
7.2.2 Ultra-estrutura de células de Leydig e espermatozóides	65
7.2.3 Imunocitoquímica para StAR, P450 <sub>sc</sub> , testosterona, anti-guanilato $\beta$ 1 solúvel, subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc e proteína quinase tipo I dependente de GMPc	66
7.2.4 Concentração de testosterona no soro	66
7.2.5 Avaliação dos parâmetros espermáticos	66
7.2.6 Imunoblot das enzimas eNOs, iNOS e nNOS	67
<b>8 DISCUSSÃO</b>	<b>86</b>
<b>9 CONCLUSÕES</b>	<b>96</b>
<b>10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	<b>97</b>
<b>11 FONTE DE FINANCIAMENTO</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A - Artigo publicado</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE B - Publicações, participação em cursos, congressos e apresentação de trabalhos</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais</b>	<b>121</b>

## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As PDEs compreendem 11 famílias distintas de enzimas (PDE1-PDE11) que inibem a atividade dos segundos mensageiros nas células por hidrolisarem a ligação fosfodiéster do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Estes são importantes reguladores intracelulares de diversos processos, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos e fototransdução retinal. Os inibidores de PDEs podem elevar os níveis intracelulares do AMPc e GMPc, de acordo com a especificidade do substrato da PDE em particular que é bloqueada. Estes inibidores são referidos como agentes competitivos por assemelharem-se às estruturas moleculares dos nucleotídeos cíclicos, que são os substratos naturais das PDEs. O Sildenafil é um inibidor potente e seletivo da PDE5, responsável pela modulação da atividade do GMPc, regulando, desta forma, sua degradação. Esta droga estimula a via do óxido nítrico (NO)-GMPc e, por conseguinte, promove efeitos de relaxamento e vasodilatação (CORBIN et al., 2002; DU PLESSIS; JONGH; FRANKEN, 2004).

O Sildenafil foi, primeiramente, sintetizado para tratar hipertensão e angina. Posteriormente, tornou-se a primeira linha de tratamento da disfunção erétil. E, atualmente, esta droga vem revolucionando o tratamento da hipertensão pulmonar, que é uma doença vascular agressiva e com baixa expectativa de vida. A estimativa da incidência de casos esporádicos de hipertensão arterial pulmonar idiopática é de aproximadamente 1 ou 2 casos por milhão de pessoas. A incidência dos casos de hipertensão pulmonar associados a doença do tecido conectivo é aproximadamente 10 vezes maior. Estudos retrospectivos no centro reumatológico da Universidade de Johns Hopkins mostram que aproximadamente 10% a 30% dos pacientes com esclerodermia apresentam hipertensão pulmonar severa, fator decisivo de mortalidade neste grupo de pacientes (ou até 50% em casos diagnosticados por ecocardiografia). Os casos de esquistossomose são de interesse particular, pois indicam a associação de produtos do ovo de *Schistosoma mansoni* com a indução de alterações na artéria pulmonar características de hipertensão pulmonar severa. Como vários dos pacientes portadores de hipertensão pulmonar associada com esquistossomose também sofrem de hepatopatia esquistossomótica com hipertensão portal, o processo pulmonar é provavelmente afetado pelas alterações hepáticas e formação de *shunts* entre a circulação portal e a circulação pulmonar (TUDER, 2006). O mecanismo de ação do Sildenafil atenua os sinais e sintomas da hipertensão pulmonar por aumentar o suprimento sanguíneo aos pulmões. A

pressão sistólica, a hipertrofia ventricular e a muscularização das artérias pulmonares são diminuídas após o esquema terapêutico com Sildenafil (ZHAO et al., 2001, 2003). A redução da hipertensão pulmonar em modelos animais, seguida da inibição da PDE5 pelo Sildenafil, foi atribuída a uma maior expressão da via NO-GMPc, atenuada patofisiologicamente (KIRSCH et al., 2008).

O citrato de Sildenafil tem sido utilizado mundialmente para tratar a hipertensão arterial pulmonar em crianças e adultos, e embora seja considerado uma droga promissora, o seu uso para o tratamento desta doença ainda não está liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Importantes implicações do esquema terapêutico da hipertensão pulmonar com doses diárias e elevadas de Sildenafil devem ser enfatizadas. Recentemente, a PDE5 foi detectada, através das técnicas de imunocitoquímica e western blot, em células do músculo liso vascular, bem como em células de Leydig e células peritubulares dos testículos de ratos (SCIPIONI et al., 2005). Nesta gônada, a via do GMPc está envolvida em inúmeras funções, tais como motilidade dos espermatozoides, desenvolvimento de células germinativas, relaxamento de células mióides, produção de testosterona pelas células de Leydig e dilatação dos vasos sanguíneos testiculares (MIDDENDORFF et al., 2000). Portanto, possíveis alterações na fisiologia testicular e reprodução poderão ser observadas em decorrência da inibição da PDE5 pelo Sildenafil.

O presente trabalho descreveu, pela primeira vez, os efeitos do esquema terapêutico com Sildenafil utilizado para tratar a hipertensão pulmonar sobre células de Leydig e espermatozoides de camundongos, visando contribuir para um melhor entendimento sobre sua ação na reprodução.

## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Inibidor de fosfodiesterase-5 (Sildenafil)

As PDEs de mamíferos constituem uma grande família de enzimas que estão classificadas de acordo com a ordem de descoberta, sequência de aminoácidos e características catalíticas e regulatórias. Estas enzimas hidrolisam os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, às suas formas inativas 5' monofosfatos (CHUNG et al., 2006; UCKERT et al., 2006).

O Sildenafil, designado quimicamente como 1-[4-etoxido-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-5-il)fenilsulfonil]-4-metilpiperazina citrato, é um inibidor potente e seletivo da PDE5, presente em células musculares lisas dos corpos cavernosos do pênis, células musculares lisas de vasos periféricos arteriais e venosos, bem como na circulação coronária e pulmonar, e nas plaquetas. Este fármaco foi resultado de um programa que iniciou em 1985 na Sede de Investigação Europeia Pfizer em Sandwich, UK, com finalidade de desenvolver um inibidor de PDE5 para estimular a via NO-GMPc para o tratamento de angina pectoris em pacientes com doença arterial coronária. Esta droga foi patenteada em 1996, e aprovada para o uso terapêutico na disfunção erétil em 1998 (BALLARD et al., 1996; NAYLOR et al., 1996; SCHWARZ et al., 2007).

A PDE5 hidrolisa especificamente o GMPc, contribuindo para a modulação intracelular deste nucleotídeo. Esta enzima é um homodímero, e cada monômero é uma proteína quimérica composta por um domínio regulatório (R) e um catalítico (C) que transforma o GMPc em 5'-GMPc. O domínio R contém vários subdomínios funcionais, incluindo sítios de fosforilação, sítios alostéricos de ligação de GMPc e contatos de dimerização. A ligação do GMPc ao sítio alostérico da PDE5 ativa a fosforilação da enzima pela proteína quinase dependente de GMPc (PKG), resultando em uma maior afinidade do GMPc ao domínio C e consequente aumento da atividade catalítica. Este evento está envolvido na regulação por *feedback* negativo dos níveis celulares de GMPc. O Sildenafil é um inibidor competitivo da catálise pela PDE5, e representa um análogo não hidrolisável pelo sítio catalítico da enzima. Sua administração promove um efeito de *feedback* positivo, representado pela inibição da degradação do GMPc através da interação do Sildenafil com o

domínio C, e aumento simultâneo dos níveis intracelulares deste nucleotídeo cíclico (BLOUNT et al., 2007; 2004; CORBIN et al., 2003).

O Sildenafil é um potente inibidor da PDE5 (IC<sub>50</sub> de 3.9 nM) com alta seletividade (>1000 vezes) para esta isoenzima humana em comparação à PDE2, PDE3 e PDE4, e moderada seletividade (>80 vezes) sobre a PDE1. Esta droga é 10 vezes mais potente para PDE5 do que para a PDE6, encontrada nos fotorreceptores da retina humana (GUPTA; KOVAR; MEIBOHM, 2005). Estudos sobre farmacocinética indicam que doses orais únicas (25-100mg) de Sildenafil administradas em jejum a voluntários sadios do sexo masculino são rapidamente absorvidas, com concentrações plasmáticas máximas alcançadas 0,5-2 horas após sua administração e meia vida de eliminação (t<sub>1/2</sub>) de 3-5 horas. Após a administração oral ou intravenosa, a droga é excretada na forma de metabólitos, predominantemente nas fezes (73-88%) e, em menor quantidade, na urina (6-15%). As reações adversas observadas em estudos clínicos com esta droga foram, em geral, de natureza leve a moderada e transitória, relacionadas ao aumento da dose. Em tratamentos com doses flexíveis, ou seja, de acordo com a necessidade de uso da medicação, os sintomas mais comumente relatados foram: cefaléia, rubor, tontura, dispepsia, congestão nasal e alterações visuais (LABORATÓRIO PFIZER, 1998).

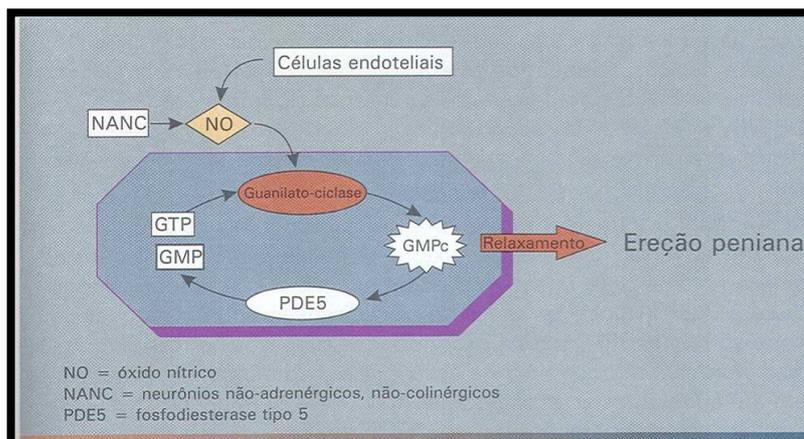
Embora a taxa de eficácia global dos inibidores de PDE5 varie de 60-70%, em populações consideradas de difícil tratamento ela diminui. Pacientes com dano neurológico severo, diabetes mellitus, ou doença vascular severa podem ser resistentes aos inibidores. A diminuição da expressão ou atividade das sintases neuronal e endotelial de NO, a falha na liberação ou a destruição de NO impede a formação suficiente de GMPc e elimina a eficácia do inibidor de PDE5. Um paciente será considerado um verdadeiro não-responder ao medicamento somente após quatro tentativas sexuais com a administração da maior dose tolerada, estando em conformidade com o guia do fabricante em respeito ao tempo relativo das refeições, ingestão de álcool, uso concomitante de outras medicações e estimulação sexual adequada (HATZIMOURATIDIS; HATZICHRISTOU, 2007).

A imprensa popular e jornais científicos publicaram artigos sobre eventos cardiovasculares adversos, tal como infarto do miocárdio, após administração de Sildenafil. Investigações posteriores sobre os potenciais efeitos do Sildenafil não demonstraram risco cardiovascular atribuído à ação farmacológica de inibidores de PDE5. Muitos pacientes que sofrem de disfunção erétil são propensos a um aumento na taxa de eventos cardiovasculares adversos. Após debates extensivos, muitas pesquisas focaram no campo da cardioproteção. Existem evidências de redução na intensidade de infartos em isquemia miocárdial e

reperfusão, e outros efeitos benéficos também foram demonstrados em modelos experimentais de insuficiência cardíaca congestiva e hipertrofia de ventrículo esquerdo. Um estado funcional do GMPc, através da ativação de proteínas quinases, foi sugerido em cardiomiócitos apresentando diferentes efeitos na modulação  $\beta$ -adrenérgica da contratilidade cardíaca e controle diferencial da hidrólise de GMPc por inibidores de PDE5 (REFFELMANN; KLONER, 2009).

A introdução dos inibidores de fosfodiesterase Sildenafil (Viagra), Vardenafil (Levitra) e Tadalafil (Cialis) como drogas ativas e seguras para o tratamento da disfunção erétil não somente tornou-se um sucesso clínico mundial, mas também ofereceu uma base para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para o tratamento da disfunção sexual masculina e feminina. Além disso, as fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos atuam como alvo farmacológico em uma variedade de desordens, tal como hipertensão pulmonar, doença de Raynaud, doença de Peyronie, síndrome prostática benigna, disfunção endotelial, distúrbios na ejaculação masculina (ejaculação precoce) e disfunção sexual feminina (BECKER; UCKERT; STIEF, 2008).

O Sildenafil tem sido amplamente utilizado no tratamento da disfunção erétil, descrita como a incapacidade do homem em atingir e manter a ereção do pênis. A classificação geral da disfunção erétil inclui a disfunção erétil psicogênica (depressão, estresse psicológico, problemas de relacionamento, ansiedade), disfunção erétil orgânica (diabetes, hipertensão, lesões da medula espinhal, algumas medicações, etc.), e a junção das duas (GUPTA; KOVAR; MEIBOHM, 2005). A ereção normal ocorre em resposta à estimulação sexual, que promove a liberação de óxido nítrico a partir de terminações nervosas não-adrenérgicas e não-colinérgicas e do endotélio dos corpos cavernosos do pênis. O NO ativa as GCs, levando à formação de GMPc, que causa aumento do fluxo sanguíneo na túnica albugínea e relaxamento do músculo liso através da redução da concentração de cálcio intracelular (Figura 1). Com os espaços lacunares do tecido preenchidos de sangue, a pressão intracavernosa aumenta tornando o pênis ereto. A administração aguda e crônica de um inibidor de PDE5 pode melhorar a função endotelial e vascular de pacientes com ou sem fatores de risco cardiovasculares, por aumentar os níveis de GMPc gerado pela ativação do NO endotelial, que modula o tônus vascular e facilita a vasodilatação. Estes efeitos vasculares podem ser responsáveis pelo retorno de ereções espontâneas em pacientes tratados com inibidores de PDE5. A dose oral recomendada de Sildenafil é de 50mg em uma dose única, administrada aproximadamente uma hora antes da atividade sexual, e com frequência de uma vez ao dia (LANGTRY; MARKHAM, 1999; MONTORSI et al., 2006; PFIZER, 1998).



**Figura 1.** Ereção peniana pelo mecanismo do NO-GMPc.

**Fonte:** Laboratórios Pfizer (1998).

## 2.2 O Sildenafil na Hipertensão Pulmonar

A Hipertensão Pulmonar é caracterizada por uma elevação progressiva da pressão arterial pulmonar, que eventualmente progride para falência do ventrículo direito levando à morte. É uma doença rara e agressiva que acomete crianças e adultos com péssimo prognóstico, e os pacientes apresentam severa limitação de exercícios e pequena expectativa de vida (ABRAMS; SCHULZE-NEICK; MAGEE, 2006).

A Organização Mundial de Saúde classifica a hipertensão pulmonar em cinco grupos baseados em seus mecanismos: (1) hipertensão arterial pulmonar (HAP) idiopática; (2) HAP de família; (3) HAP associada com doença de colágeno vascular, hipertensão portal, infecção por HIV, drogas, toxinas, e outros (doenças de armazenamento de glicogênio, doença de Gaucher, telangiectasia hemorrágica hereditária, hemoglobinopatias, desordens mieloproliferativas, esplenectomia); (4) HAP associada com significativo envolvimento venoso ou capilar, que inclui doença pulmonar veno-oclusiva e hemangiomatose capilar pulmonar; e (5) hipertensão pulmonar persistente de recém-nascido (LIU et al., 2006).

Embora a patogênese da HAP seja heterogênea, as principais mudanças patológicas na vasculatura pulmonar são similares – vasoconstrição, proliferação celular do músculo liso vascular (remodelamento da parede do vaso pulmonar) e trombose in situ (SAHARA et al., 2006). A vasoconstrição tem uma função importante na patogenia da doença, que é caracterizada por hipertrofia patológica da camada média das arteríolas pulmonares,

diminuição da produção endotelial dos vasodilatadores, tais como prostaciclina e NO, e aumento da produção do vasoconstritor endotelina, resultando no aumento da resistência vascular pulmonar (RUNO; LOYD, 2003). Os sintomas usualmente aparecem quando a hipertensão é grave e, na ausência de tratamento para diminuir a pressão pulmonar, a expectativa de vida é de 68, 48 e 34% em 1, 3 e 5 anos, respectivamente. A doença não tem cura e o paciente necessita de tratamento por toda a vida (FARBER; LOSCALZO, 2004).

Nos últimos dez anos, três classes de drogas foram aprovadas para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar. Estão incluídos os prostanóides, antagonistas do receptor de endotelina e os inibidores de fosfodiesterase – 5. Essas terapias não somente diminuem a pressão arterial pulmonar, mas, também, oferece aos pacientes um melhor desempenho no teste padrão de caminhada de seis minutos. O Sildenafil oral promove uma melhoria dos sintomas e da hemodinâmica vascular pulmonar de pacientes (HUMPL et al., 2005; RICH, 2006). A terapia convencional inclui oxigênio suplementar, diuréticos, anticoagulantes orais e bloqueadores de canais de cálcio (SAHARA et al., 2006).

A vasodilatação pulmonar com inibidores de PDE5 tem sido demonstrada em animais com hipertensão pulmonar experimental, e em humanos com hipertensão arterial pulmonar primária e secundária (GHOFRANI et al., 2002; MICHELAKIS et al., 2002, 2003). O Sildenafil inibe a PDE5, enzima específica para GMPc, encontrada em abundância no tecido pulmonar, impedindo a degradação do monofosfato de guanosina cíclico, que é um mensageiro intracelular do NO, com conseqüente vasodilatação pulmonar. Em resposta ao tratamento foi observado uma queda da pressão arterial pulmonar média e um aumento no rendimento cardíaco de pacientes com hipertensão arterial pulmonar crônica (GHOFRANI et al., 2004; MIKHAIL et al., 2004; SASTRY et al., 2004). A nível celular, a vasodilatação envolve alterações na sinalização de cálcio, em parte por abrir os canais  $BK_{ca}$  em humanos com hipertensão arterial pulmonar (MICHELAKIS et al., 2003).

Alguns estudos clínicos de hipertensão pulmonar têm utilizado o Sildenafil como terapia adicional em crianças e adultos (AMARAL, 2005; GANIERE et al., 2006; KARATZA et al., 2004; LOBATO et al., 2006; OLIVEIRA; HUMPL et al., 2005; PRESTON et al., 2005; SCHULZE-NEICK et al., 2003; STOCKER et al., 2003). O Sildenafil oral (2mg/kg, quatro vezes ao dia) foi administrado a uma menina de quatro anos de idade com dispnéia, cianose, e sinais de baixo rendimento cardíaco. Após três meses de tratamento contínuo houve uma melhora na sua capacidade de exercício e a mesma passou a desfrutar de uma boa qualidade de vida. A resposta clínica nesta paciente sugere que o Sildenafil deve

exercer um papel importante no controle da hipertensão pulmonar primária (ABRAMS; SCHULZE-NEICK; MAGEE, 2006).

Pacientes com idade entre 5-30 anos, com severa hipertensão arterial pulmonar, receberam Sildenafil oral em adição a terapia convencional. O tratamento deu início com baixas doses, as quais aumentaram empiricamente, administradas três vezes ao dia. A dose média utilizada em crianças foi de 75-150mg, e no grupo adulto foi de 125-300mg, diariamente. A pressão arterial pulmonar média decresceu de 62mmHg para 47mmHg em quatro pacientes com hipertensão pulmonar primária após uma média de sete meses de tratamento com Sildenafil. Esta droga foi bem tolerada e levou a uma melhora da condição clínica e do desempenho de exercícios físicos (KOTHARI; DUGGAL, 2002).

A hipóxia alveolar promove uma vasoconstrição pulmonar e subsequente remodelamento da parede dos vasos sanguíneos (RABINOVITCH et al., 1979). A hipertensão pulmonar induzida por hipóxia é comum em pessoas que moram em altitude elevada, sendo um sério problema clínico com morbidade e mortalidade significativa. Apesar da contínua administração de oxigênio não existe tratamento satisfatório para esta condição (ZHAO et al., 2001). O NO e peptídeos natriuréticos atenuam a vasoconstrição e o remodelamento vascular através de ações vasorelaxantes e antimitogênicas mediadas por GMPc e ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (SARKER et al., 1997; WALDMAN; MURAD, 1988).

A administração de Sildenafil oral atenuou a hipertensão pulmonar induzida por hipóxia em humanos e camundongos (tratados com 100mg e 25mg/kg/dia, respectivamente) e ofereceu uma nova abordagem para o tratamento desta condição. Camundongos deficientes na síntese de NO (eNOS) demonstraram uma resposta parcial ao Sildenafil, sugerindo que a via eNOS-NO-GMPc contribui para a ação da droga, entretanto outros estimulantes bioquímicos de GMPc, tal como os peptídeos natriuréticos, poderiam atuar na resposta hemodinâmica dos inibidores de PDE5 (ZHAO et al., 2001, 2003).

## **2.3 Sinalização celular**

### **2.3.1 Aspectos gerais**

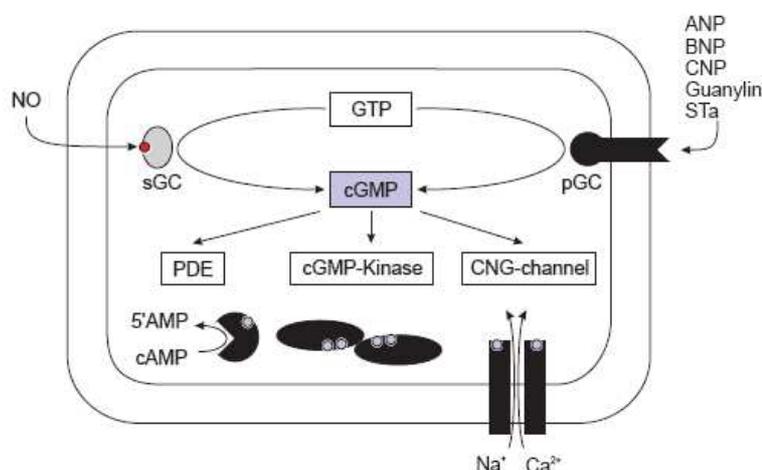
Os mecanismos de comunicação celular dependem, basicamente, de moléculas de sinalização extracelulares, produzidas pelas células, para sinalizar aquelas vizinhas ou as mais distantes. Eles dependem, também, de sistemas protéicos elaborados nas células que lhes permitem responder, de forma específica, a determinados subgrupos desses sinais. Essas proteínas vão desde receptores de superfície celular que se ligam à molécula sinalizadora até uma variedade de proteínas sinalizadoras intracelulares (quinases, fosfatases, proteínas que se ligam a GTP, entre outras) que distribuem o sinal para regiões adequadas da célula. No final de cada rota de sinalização encontram-se as proteínas-alvo que são alteradas quando a rota está ativa, mudando o comportamento da célula (ALBERTS et al., 2004).

Existem quatro classes principais de sistemas de segundos mensageiros: a) o sistema tirosina quinase, b) o sistema inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>)/diacilglicerol (DAG), c) os íons cálcio, e d) os nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc). O sistema mensageiro compreende vários elementos, incluindo o primeiro mensageiro; o receptor para este primeiro mensageiro; um segundo receptor chamado proteína G que interage com o receptor do primeiro mensageiro; uma enzima ativada pela proteína G, a guanilato ou adenilato ciclase (GC e AC); e uma molécula mensageira secundária formada por esta enzima. O sinal intracelular gerado em resposta ao primeiro mensageiro é amplificado dentro da célula. O GMPc é formado a partir da guanosina trifosfato (GTP) via reação catalisada pela GC, que é expressa na forma solúvel (GCs) e particulada, isoforma ligada à membrana (GCm). O NO, um mediador crucial no relaxamento do músculo liso, interage com a GCs no citoplasma para aumentar a conversão de GTP em GMPc. Por outro lado, os peptídeos natriuréticos ativam a GCm, e também estimula a produção de GMPc. Seu acúmulo aciona a cascata de transdução de sinal que ativa proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos, com subsequente fosforilação do sistema actina-miosina, bem como a abertura dos canais de Ca<sup>2+</sup> e ativação de bombas de Ca<sup>2+</sup> presentes na membrana externa do retículo sarcoplasmático. Este evento reduz os níveis deste íon no citosol e promove o relaxamento do músculo liso (DIMITRIADIS et al., 2008; UCKERT et al., 2006).

Os nucleotídeos cíclicos monofosfatados, AMP e GMP, são importantes mediadores intracelulares de várias moléculas de sinalização, e regulam inúmeros processos intracelulares (CHUNG et al., 2006; UCKERT et al., 2006). O AMPc é sintetizado a partir do ATP por uma proteína transmembrana multipasso chamada adenilato ciclase, e é degradado rápida e continuamente por uma ou mais fosfodiesterases de AMPc, que o hidrolisa à sua forma inativa, adenosina 5' monofosfato. Este nucleotídeo cíclico exerce seus efeitos através da interação com uma proteína receptora intracelular, a proteína quinase dependente de AMPc

(PKA), uma haloenzima tetramérica constituída por duas subunidades catalíticas e duas regulatórias. A ativação da PKA ocorre quando quatro moléculas de AMPc se ligam à subunidade regulatória e promovem a dissociação da haloenzima em um dímero regulatório e duas subunidades catalíticas livres e ativas que fosforilam e ativam resíduos de serina e treonina de proteínas específicas, regulando suas atividades (ALBERTS et al., 2004). A via de sinalização AMPc/PKA regula o metabolismo, a atividade gênica, o crescimento e divisão celular, a diferenciação celular, a esteroidogênese, a motilidade de espermatozóides, bem como a condutividade de canais iônicos (HANSSON; SKALHEGG; TASKÉN, 2000).

O GMPc, descoberto em 1963, é reconhecido como um importante segundo mensageiro de sinais extracelulares provenientes do estímulo do NO e de peptídeos natriuréticos. Os efeitos fisiológicos deste nucleotídeo cíclico são determinados pelas atividades de três tipos de receptores intracelulares: proteínas quinases dependentes de GMPc, canais iônicos regulados por GMPc e PDEs reguladas por GMPc (Figura 2). O GMPc também pode ativar vias do AMPc através de sua ligação aos receptores intracelulares de AMPc, tal como a PKA. Desta forma, o GMPc pode alterar a função celular através da ativação ou inativação de proteínas por fosforilação. Por um lado estas proteínas são fosforiladas por uma quinase, que adiciona um ou mais grupos fosfato e, por outro, desfosforiladas por uma fosfatase que remove os grupos fosfato da molécula. Algumas funções fisiológicas mediadas pelo GMPc têm sido descritas como fatores regulatórios clássicos no relaxamento do músculo liso, desgranulação de neutrófilos, inibição da agregação plaquetária, transdução de sinal visual, entre outros (CORBIN; FRANCIS, 1999; LINCOLN; CORNWELL, 1993).



**Figura 2.** Síntese e receptores de GMPc.

**Fonte:** Hofmann; Ammendola; Schlossmann (2000).

A óxido nítrico sintase (NOS) é composta por dois monômeros idênticos (~130-160kDA, cada). A NOS converte L-arginina em NO e L-citrulina na presença de cosubstratos e cofatores. Três isoformas da NOS chamadas NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) são encontradas em células de mamíferos. As funções fisiológicas do NO/NOS são diversas por causa da versatilidade das vias de sinalização mediadas por NO, que variam de acordo com suas diferentes concentrações. A princípio o NO atua como um regulador crucial na inflamação, mas ele também é um importante regulador fisiológico do sistema endócrino. Quando a concentração de NO é maior que 1 $\mu$ M, os efeitos predominantes mediados por NO incluem a desaminação, oxidação ou nitração do DNA via interação do NO com radicais superóxido ou de oxigênio. Assim, os efeitos do NO são prejudiciais em altas concentrações. Contrariamente aos efeitos indiretos do NO em altas concentrações, as ações do NO são diretas, sem interagir com os radicais superóxido ou de oxigênio, quando sua concentração é menor que 1 $\mu$ M. Desta forma, baixas concentrações de NO podem regular diferentes atividades fisiológicas por diferentes vias de sinalização (LEE; CHENG, 2004).

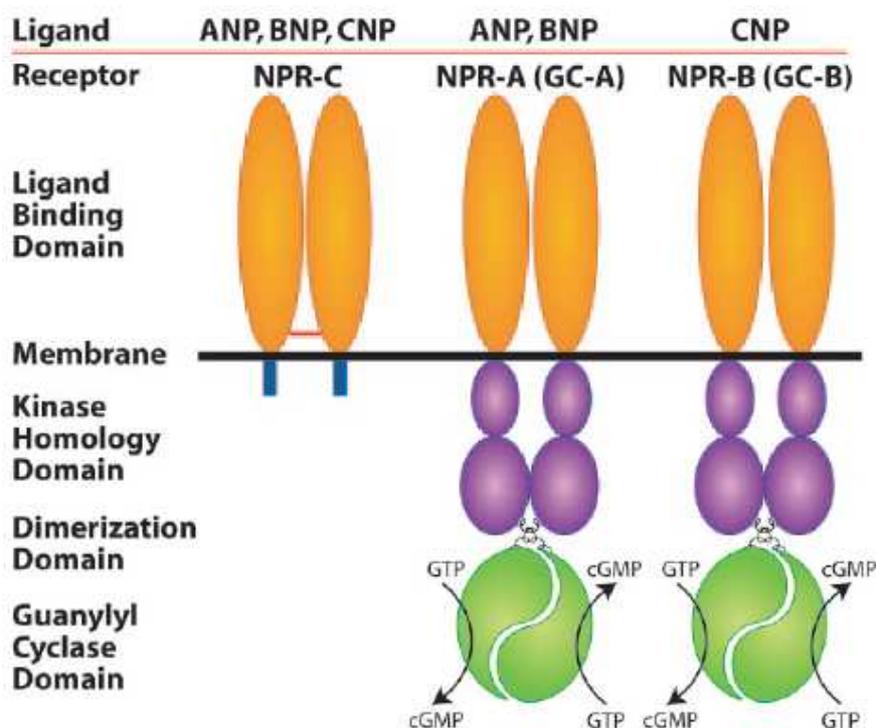
Para as três isoenzimas NOS, a síntese de NO depende da ligação das enzimas com a proteína de ligação do Ca<sup>2+</sup>, a calmodulina. Para eNOS e nNOS, um aumento na concentração do Ca<sup>2+</sup> intracelular é requerido para que este se ligue e ative a calmodulina. Por outro lado, a ação da iNOS é independente do Ca<sup>2+</sup>. Logo, a iNOS se liga à calmodulina com alta afinidade, mesmo em células com baixa concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006).

A molécula efetora parácrina de NO inicia a síntese de GMPc através da ligação do NO ao grupo prostético heme das GCs sensíveis, transduzindo o sinal de ligação para a ativação do domínio catalítico da ciclase. A GCs é um heterodímero consistindo de uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ , e ambas são requeridas para a formação da enzima cataliticamente ativa (WEDEL et al. 1994). A isoforma citosólica  $\alpha 1\beta 1$  e aquela localizada na membrana  $\alpha 2\beta 2$  são as duas enzimas conhecidas por serem ativadas pelo NO. Esta ativação ocorre através da ligação do NO e subsequente ruptura da coordenação da His<sup>105</sup> sobre a protoporfirina IX heme da subunidade  $\beta$  da GCs, aumentando sua atividade catalítica em até 400 vezes. No músculo liso, o heterodímero da GCs  $\alpha 1\beta 1$  é responsável pela síntese de GMPc, enquanto a PDE5 é estabelecida como o principal regulador da hidrólise de GMPc. Os efeitos vasodilatadores do NO são mediados através da ativação da PKG e seus substratos, tais como a fosfatase da cadeia leve da miosina e canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>). O aumento dos níveis intracelulares de GMPc também ativa outros alvos de regulação, tais

como os canais de íons ligados a nucleotídeos (CNG) e as fosfodiesterases (CAWLEY et al., 2007).

A família de peptídeos natriuréticos consiste de três peptídeos estruturalmente relacionados: peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP). Estes peptídeos influenciam uma variedade de processos homeostáticos através da acumulação intracelular de GMPc, formado por duas diferentes GC de membrana ligadas a receptores (GC-A e GC-B). ANP e BNP são hormônios cardíacos que desempenham importantes funções na regulação da homeostase cardiovascular. O CNP está presente em vários tecidos, onde pode atuar localmente como regulador autócrino/parácrino através da GC-B (Figura 3). Além de sua função cardiovascular e endotelial, este peptídeo apresenta um desempenho importante na reprodução e no desenvolvimento fetal. No sistema reprodutivo masculino, ele está envolvido na regulação da função testicular e erétil (WALTHER; STEPAN, 2004). Na fisiologia testicular, o CNP está envolvido na regulação das células de Leydig e de Sertoli, cujos efeitos parácrinos incluem o relaxamento dos túbulos seminíferos para regulação do transporte de espermatozóides, e suprimento sanguíneo testicular. A cascata CNP/GC-B/GMPc promove uma variedade de efeitos biológicos no testículo, tal como modulação da motilidade de espermatozóides, desenvolvimento das células germinativas testiculares e síntese de testosterona (MIDDENDORFF et al, 1997; 2000).

A PKG exerce um efeito central em muitas funções fisiológicas. Quando ativada por níveis elevados de GMPc, ela fosforila inúmeras proteínas intracelulares e proporciona efeitos, tais como relaxamento do músculo liso vascular, distensão das vias aéreas, inibição da proliferação celular, inibição da agregação plaquetária e apoptose. A autofosforilação das PKGs (PKG-I $\alpha$  e PKG-I $\beta$ ) aumenta a afinidade de ligação do GMPc aos seus sítios alostéricos e, desta forma, inibe a hidrólise deste nucleotídeo pelas PDEs. Em adição, foi proposto que este mecanismo de autofosforilação representa uma regulação de feedback-positivo da sinalização do GMPc pela cascata GMPc/PKG (KOTERA et al., 2003).



**Figura 3.** Topologia do receptor de peptídeo natriurético e seus ligantes.

**Fonte:** Potter; Abbey-hosch; Dickey (2006).

**Nota:** Os peptídeos natriuréticos se ligam a três proteínas, NPR-A, NPR-B e NPR-C. NPR-A e NPR-B são guanilato ciclases de membrana, consistindo de um domínio de ligação extracelular, uma única região transmembrânica hidrofóbica, um domínio de homologia à quinase, sítios de dimerização, e domínios de guanilato ciclase carboxi-terminais. NPR-C é, aproximadamente, 30% idêntica à NPR-A e NPR-B no domínio de ligação extracelular, mas contém apenas 37 aminoácidos intracelulares.

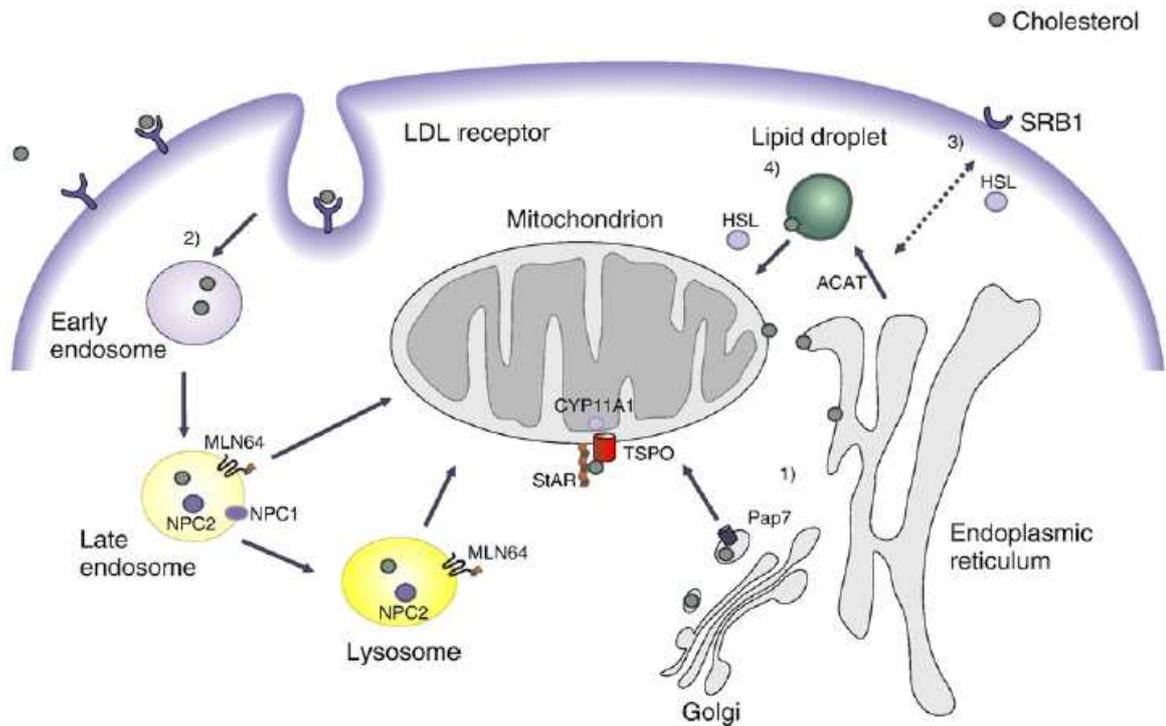
O GMPc é considerado um excelente regulador do tônus do músculo liso vascular. Inúmeros relaxantes musculares, incluindo vasodilatadores contendo óxido de azoto, fatores relaxantes derivados do endotélio e peptídeos natriuréticos estimulam a produção do GMPc no músculo liso vascular. Em adição, os nucleotídeos cíclicos podem influenciar diretamente ou indiretamente (via seus efetores PKA e PKG) a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular (RASHATWAR; CORNWELL; LINCOLN, 1987). Este íon é um importante segundo mensageiro nas células endoteliais envolvido na síntese e liberação de fatores regulatórios, como por exemplo, a ativação da sintase endotelial de NO que participa da síntese de NO. Este, por sua vez, ativa guanilato ciclases solúveis para produção de GMPc, que diretamente ou indiretamente via PKG modula a atividade de canais e bombas de  $Ca^{2+}$  por *feedback*. A liberação de  $Ca^{2+}$  de compartimentos internos é controlada por várias proteínas localizadas na superfície do compartimento, enquanto o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular é regulado por canais e bombas de  $Ca^{2+}$  localizadas na membrana plasmática (KWAN et al., 2009).

Na maioria das células, o mecanismo de contração é iniciado pela formação, mediada por receptor, do inositol 1,4,5-trifosfato. Este induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de compartimentos celulares, seguido pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes e independentes de voltagem. O aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inicia o processo de contração através da ativação da quinase da cadeia leve da miosina dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina, a qual fosforila a cadeia leve da miosina e, conseqüentemente, ativa a ATPase da miosina. A diminuição dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inativa a quinase da cadeia leve da miosina e induz a sua desfosforilação pela miosina fosfatase. Um mecanismo que diminui a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é a fosforilação direta de canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) pela isoforma I da proteína quinase, que estimula a abertura destes canais. A abertura dos  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  hiperpolariza a membrana e fecha outros canais, incluindo os de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (HOFMANN; AMMENDOLA; SCHLOSSMANN, 2000).

### 2.3.2 Mediadores intracelulares em células de Leydig

A produção de esteróides é regulada por hormônios tróficos, especificamente o hormônio adrenocorticotrófico, nas células adrenocorticais, e o hormônio luteinizante nas células de Leydig testicular e células tecais. A presença destes hormônios ativa os receptores ligados à proteína-G, que libera a subunidade estimulatória, resultando na ativação da adenilato ciclase e aumento de AMPc intracelular. Isto leva a um aumento na síntese de lipídio, produção e fosforilação de proteínas. Todos esses processos exercem uma função na esteroidogênese e auxilia o tráfego de colesterol para a mitocôndria. Nas mitocôndrias das células esteroidogênicas o *pool* de colesterol disponível para a esteroidogênese é segregado a partir do colesterol da membrana estrutural e é ligado ao domínio de ligação de colesterol da proteína translocadora (TSPO), anteriormente denominada receptor de benzodiazepina periférico (PBR). Deste sítio, o colesterol é liberado, sob estimulação hormonal, e se move para a matrix mitocondrial interna, onde é clivado pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol ( $\text{P450}_{\text{scc}}$ ), que metaboliza o colesterol em pregnenolona. A translocação inicial do colesterol para a TSPO não é suficiente para sustentar a produção contínua de esteróides, então, colesterol livre adicional deve ser movido, a partir de compartimentos intracelulares, para a mitocôndria. Este colesterol intracelular provém de três fontes: síntese *de novo* de colesterol no retículo endoplasmático, mobilização de colesterol na membrana plasmática

com adicional captura de ésteres de colesterol circulantes pelos receptores encontrados na membrana, e mobilização de colesterol das gotículas de lipídio (Figura 4) (RONE; FAN; PAPADOPOULOS, 2009).



**Figura 4.** Tráfego de colesterol para a mitocôndria durante a esteroidogênese.

**Fonte:** Rone; Fan; Papadopoulos (2009).

**Nota:** Via 1: o colesterol sintetizado no retículo endoplasmático é transferido para o complexo de Golgi, de onde ele pode ser enviado para mitocôndria pela proteína PAP7 (proteína associada à subunidade regulatória I $\alpha$  da PKA /TSPO). Via 2: lipoproteína de baixa densidade (LDL), contendo colesterol, que é ligada ao receptor de LDL e transportada através da via endossomal. O segundo domínio identificado da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) relacionado com o transporte de lipídio (MLN-64) auxilia a transferência do colesterol para a mitocôndria a partir dos endossomos tardios e lisossomos para uso na esteroidogênese. A proteína 1 da doença Niemann-Pick tipo C (NPC1) e a proteína 2 da doença Niemann-Pick tipo C (NPC2) se associam com a MLN-64 para transferir o colesterol para fora do lisossomo. Via 3: o colesterol é transferido da lipoproteína de alta densidade (HDL) para a membrana plasmática pelos receptores *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). A lipase sensível a hormônio (HSL) converte o colesterol esterificado da membrana plasmática em colesterol livre, que pode ser usado na esteroidogênese. Via 4: HSL também interage com o colesterol esterificado presente nas gotículas de lipídio, que converte colesterol esterificado em colesterol livre para uso na esteroidogênese. O colesterol livre das gotículas de lipídio pode interagir com proteínas de ligação de lipídio presentes no citoplasma para ser entregue à mitocôndria.

O controle endócrino da função das células de Leydig é principalmente realizado pela ação do LH, secretado em pulsos de alta atividade biológica pela adenohipófise sob o controle da secreção episódica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH ou LHRH). Além de estimular a via da adenilato ciclase, o receptor de LH também é capaz de ativar a via de

sinalização do fosfato de inositol /  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente através da proteína G ou da proteína ligadora de nucleotídeo. Em adição às gonadotrofinas, a função das células de Leydig é, também, influenciada por fatores de crescimento e neuropeptídeos. Alguns destes agonistas atuam através de receptores mobilizados por  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando que este íon pode contribuir para o controle da função das células de Leydig. A breve sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocasionar respostas celulares rápidas ou modular a ação das gonadotrofinas através da via de sinalização do AMPc (TOMIC et al., 1995).

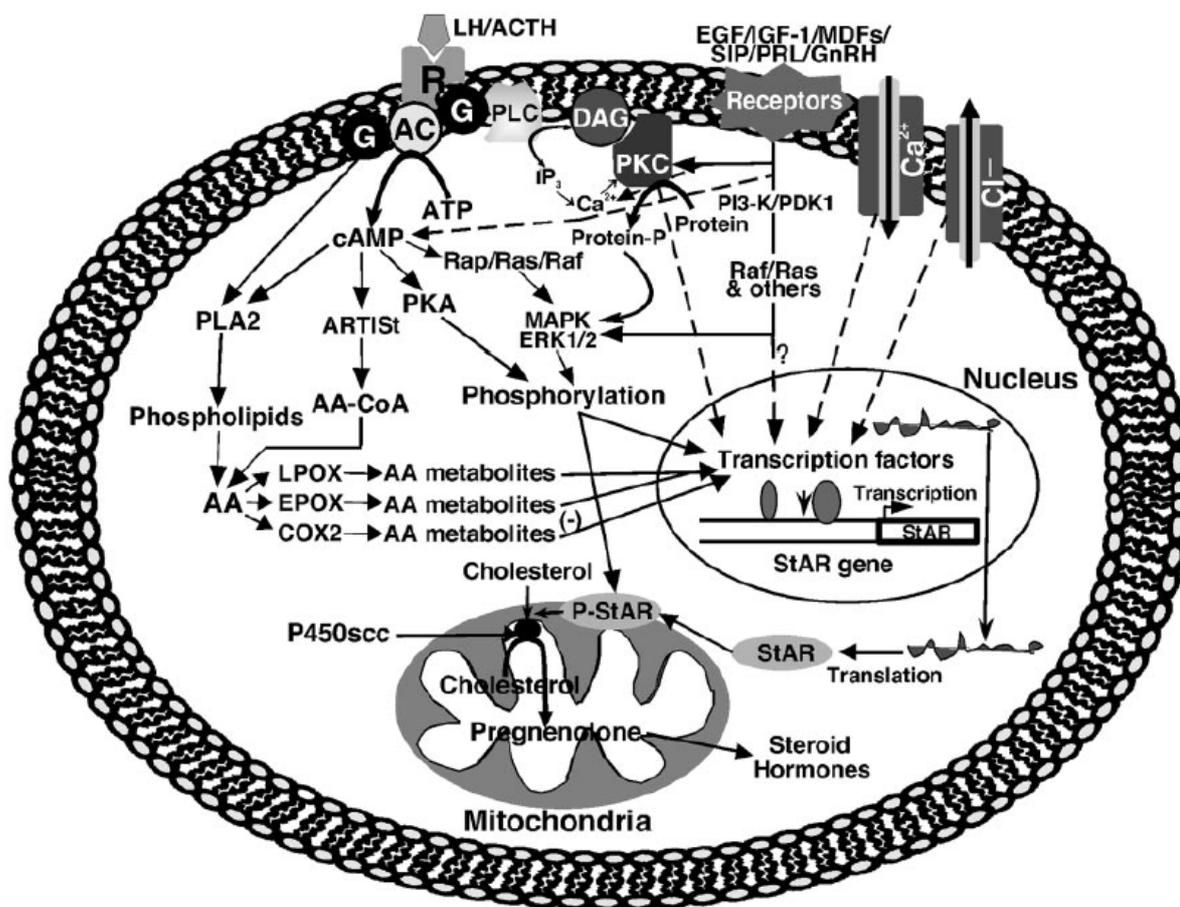
A interação do LH/hCG com seu receptor específico resulta em várias modificações intracelulares, incluindo a ativação da PKA dependente de AMPc. Dois sítios de fosforilação pela PKA foram identificados na proteína esteroidogênica regulatória aguda (StAR) de camundongos, Ser56/57 e Ser194/195. Esta proteína regula o primeiro passo da biossíntese de esteróide, isto é, o transporte do colesterol da membrana externa para a membrana mitocondrial interna. Enquanto a via AMPc/PKA é inquestionável como a principal cascata de sinalização para a expressão da StAR induzida por hormônio e esteroidogênese, a interação dos ligantes extracelulares com seus receptores pode ativar a PLC e desencadear a ativação da via da PKC. Esta é capaz de potencializar a ação da gonadotrofina e/ou estimular a resposta esteroidogênica pelo AMPc (MANNA; JO; STOCCO, 2007).

A regulação da esteroidogênese também pode ser modulada através de vias de transdução de sinal que não envolvem o AMPc. Vários fatores que não requerem o AMPc e/ou síntese de proteínas, potencializam a resposta esteroidogênica às gonadotrofinas ou análogos de AMPc. Estão incluídos os fatores de crescimento, fatores derivados de macrófagos, proteína indutora esteroidogênica, íons  $\text{Cl}^-$  e o sistema mensageiro do  $\text{Ca}^{2+}$ . A resposta hormonal envolve alterações nos níveis intracelulares de AMPc e  $\text{Ca}^{2+}$ . O LH/hCG, análogos de AMPc e GnRH e seus agonistas podem estimular diretamente a esteroidogênese por aumentarem rapidamente os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberado de compartimentos intracelulares ou pela mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. O  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pode afetar o transporte de colesterol para mitocôndria e a atividade de uma ou mais enzimas mitocondriais, principalmente a enzima  $\text{P450}_{\text{scc}}$ , ou enzimas microssomais que formam, em última instância, a testosterona (MEIKLE; LIU; STRINGHAM, 1991; STOCCO, et al. 2005).

Stocco et al. (2005) descreveram as múltiplas vias de sinalização da esteroidogênese. A interação dos hormônios tróficos (LH/ACTH) com receptores de membrana específicos resulta na ativação de proteínas G, a qual ativa a adenilato ciclase de membrana que catalisa a formação do AMPc a partir do ATP. O AMPc, então, ativa a PKA, resultando na fosforilação de fatores de transcrição que regulam a transcrição do gene da StAR. Esta regula a

esteroidogênese por controlar o transporte de colesterol da membrana externa para a membrana mitocondrial interna, o sítio da enzima P450<sub>scc</sub>. A conversão do colesterol em pregnenolona é o primeiro passo enzimático na biossíntese de esteróides. O sistema mensageiro do Ca<sup>2+</sup> e os íons Cl<sup>-</sup> estão efetivamente envolvidos na potencialização da esteroidogênese estimulada por hormônios tróficos e expressão da StAR. A proteína G e o AMPc podem, também, ativar a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que catalisa a liberação de ácido araquidônico (AA) a partir dos fosfolipídios. O AMPc, mais uma vez, ativa a acyl-CoA tioesterase relacionada com o AA (ARTIST), que catalisa a liberação do AA a partir da araquidonil-CoA. O AA liberado dessa fonte é metabolizado por uma das três enzimas, lipooxigenase (LPOX), epooxigenase (EPOX) ou ciclooxigenase (COX). Os metabólitos da LPOX e EPOX desempenham uma importante função na expressão da StAR e esteroidogênese. Por outro lado, os metabólitos da COX2 inibem a expressão do gene da StAR. A via da PKC também está envolvida na regulação da resposta esteroidogênica, uma vez que ela aumenta a transcrição e a tradução da StAR, mas não a sua fosforilação, processo executado pela PKA, para a transferência de colesterol. O fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), os fatores derivados de macrófagos, o fator proteínico isolado do fluido folicular humano (SIF), a prolactina e o GnRH se ligam à receptores de membrana específicos e podem estimular a resposta esteroidogênica por diferentes vias. O AMPc e/ou diferentes fatores são capazes de ativar a cascata de proteínas quinases (Rap/Ras/Raf ou quinases relacionadas) estimulando a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e/ou quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) que atuam na regulação da expressão da StAR e biossíntese de esteróides (Figura 5).

As células de Leydig do testículo humano possuem os principais componentes da via NO/GMPc, tais como a nNOS, a GCs e o GMPc. A produção de NO pela nNOS depende, principalmente, de estímulos de aminoácidos excitatórios, do Ca<sup>2+</sup> e calmodulina. Os aminoácidos induzem o aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e consequente ativação da nNOS. Esta é regulada pelos componentes da via do GMPc por mecanismo de *feedback* e por proteínas quinases de outras vias de transdução de sinal. Nessas células, o GMPc influencia a síntese de testosterona através de sua ligação e ativação da PKA (DAVIDOFF et al., 1997).



**Figura 5.** Modelo ilustrando as múltiplas vias de sinalização na regulação da expressão da proteína StAR e esteroidogênese.

**Fonte:** Stocco et al. (2005).

**Nota:** PDK1, proteína dependente de quinase 1; PI3-K, fosfatidilinositol quinase-3; P-StAR, StAR fosforilada.

Por outro lado, Weissman et al. (2005) demonstraram três aspectos importantes sobre a função das células de Leydig de ratos: 1) ao contrário de outros tecidos esteroidogênicos, as células de Leydig são desprovidas da via L-arginina/NO; 2) sua produção de testosterona é altamente sensível ao NO exógeno; e 3) sob condições patológicas, os macrófagos testiculares ativados são as fontes mais prováveis deste radical livre, a partir da iNOS.

O peptídeo natriurético atrial exerce vários efeitos no organismo, que, aparentemente, não estão relacionados com a regulação da pressão sanguínea e do volume do plasma. Os receptores do ANP são expressos em uma variedade de órgãos e tipos celulares de mamíferos, entre eles a GC-A ou receptor de peptídeo natriurético (NPR)-A está presente no testículo e induz a produção de GMPc via ANP. No testículo, este peptídeo estimula a síntese e liberação de testosterona, através do acúmulo de GMPc, pelas células de Leydig, sendo este o principal

sítio de ação do ANP. Um pré-requisito para a geração de efeitos fisiológicos seguida das interações ANP/GC-A é a presença das proteínas alvo do GMPc, tal como a PKG que representa o principal mediador das atividades celulares do GMPc (MÜLLER et al., 2004).

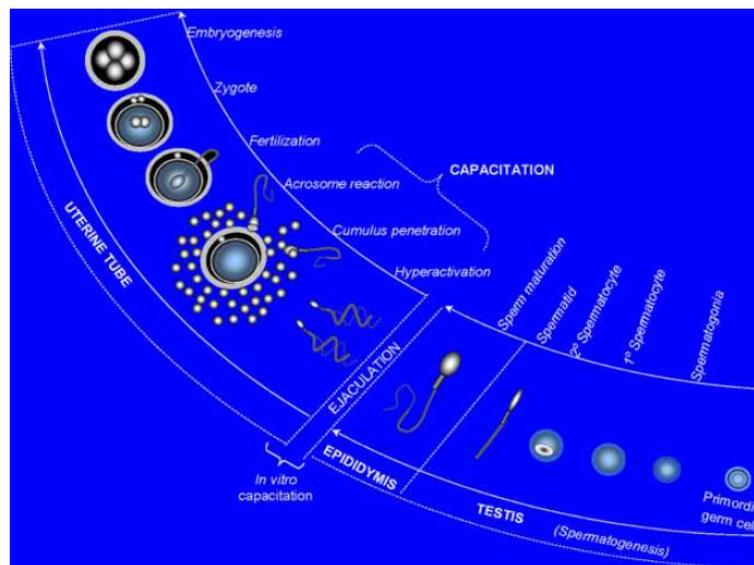
Putney (1986) propôs um modelo sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, sugerindo que o escoamento de  $\text{Ca}^{2+}$  de armazenamentos intracelulares, ativa e emite correntes iônicas para a membrana plasmática para conseguinte abertura dos canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A inibição de bombas de cálcio adenosina-trifosfatase ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) no retículo sarcoplasmático (SERCA-ATPase) induz modificações no potencial de membrana das células de Leydig devido ao escoamento de  $\text{Ca}^{2+}$  de armazenamentos internos e ativação de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , modulando, desta forma, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio externo, e a produção de testosterona (ROSSATO et al., 2001). Janszen et al. (1976) descreveram que o  $\text{Ca}^{2+}$  participa da estimulação, mediada por LH, da biossíntese de testosterona. Seu modo preciso de ação permanece desconhecido, mas existe a hipótese de que ele atue após a ativação da proteína quinase pelo LH, estando envolvido na síntese de proteínas, na produção de certos substratos para síntese de testosterona, ou por afetar propriedades a nível mitocondrial.

Em adição ao LH, é bem estabelecido que o hormônio liberador do LH (LHRH) e seus agonistas estimulam diretamente a esteroidogênese de células de Leydig de ratos. O AMPc está envolvido na ação do LH, mas não na do LHRH. Desta forma, o  $\text{Ca}^{2+}$  é requerido para estimular a esteroidogênese dependente de LH e LHRH. Em baixas concentrações de LH, o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é o principal modulador da esteroidogênese, mais que o AMPc; e agonistas do LHRH aumentam a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e testosterona sem alterar as concentrações de AMPc. Neste caso, o  $\text{Ca}^{2+}$  por si só é suficiente para controlar a esteroidogênese, enquanto o AMPc aumentaria a concentração intracelular deste íon, possivelmente via fosforilação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática pela PKA (SULLIVAN; COOKE, 1986).

O GnRH, exerce um efeito estimulatório sobre a esteroidogênese na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , não apresentando ação significativa sobre a via AMPc/PKA. Isto sugere que este efeito estimulatório é cálcio dependente. Esta evidência está correlacionada com uma classe específica de fosfolipídios, o fosfatidilinositol, que pode regular processos celulares por controlar o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana celular. A interação ligante-receptor estimula a degradação do fosfatidilinositol, que altera a fluidez da membrana e aumenta o influxo do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, via abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , com subsequentes respostas biológicas (LIN, 1984).

### 2.3.3 Mediadores intracelulares em espermatozoides

Para fertilizar o óvulo, o espermatozoide ejaculado deve ser submetido ao processo de capacitação, reconhecer e ligar-se à zona pelúcida e realizar a reação de acrossoma (Figura 6). Durante a fertilização, o espermatozoide com acrossoma reagido funde-se com a oolema, e todo o espermatozoide (com exceção de parte da membrana plasmática, maior parte da membrana acrossomal externa e os componentes acrossomais) é incorporado no ovócito. A zona pelúcida liga-se em ao menos dois receptores diferentes na membrana plasmática da cabeça do espermatozoide. Um deles é o receptor ligado à proteína  $G_i$ , que pode ativar a fosfolipase  $C\beta 1$  e regular a adenilato ciclase para aumentar os níveis de AMPc. Este ativa a PKA para abrir os canais de  $Ca^{2+}$  na membrana acrossomal externa, resultando em um pequeno aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  citosólico. O  $Ca^{2+}$  ativa a fosfolipase  $C\gamma$ , que está ligada ao segundo receptor de tirosina quinase. Os produtos da atividade da fosfolipase C, diacilglicerol e  $IP_3$ , promovem a ativação da proteína quinase C (PKC) e do receptor  $IP_3$ ; a PKC abre os canais de  $Ca^{2+}$  na membrana e o  $IP_3$  ativa os canais de  $Ca^{2+}$  na membrana acrossomal externa, levando a um maior aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico, que resulta na fusão de membrana e completa reação de acrossoma (BARROSO et al., 2009).



**Figura 6.** Desenho esquemático da jornada da célula espermática durante a espermatogênese e o trânsito através dos tratos masculino e feminino.

**Fonte:** Barroso et al. (2009).

O NO é capaz de regular a concentração de AMPc e, conseqüentemente, a capacitação via estimulação da atividade da adenilato ciclase. Esta modulação poderia atuar diretamente através da ação do radical sobre a enzima ou por alterar a função de proteínas regulatórias distintas. Também é possível que o NO tenha outros alvos, tal como a modulação dos níveis de GMPc. Algumas evidências demonstram que baixas concentrações de NO aumentam a capacitação de espermatozóides sem afetar sua motilidade, e o estímulo da produção deste radical aumenta a fosforilação da tirosina das proteínas espermáticas, sendo o componente essencial da cascata de mudanças bioquímicas que origina a capacitação. Quando em altas concentrações, este radical promove efeitos deletérios na cinética de espermatozóides, visto que ele pode interagir com o superóxido ou peróxido de hidrogênio, resultando na formação de peroxinitrito, radical hidroxil, dióxido de azoto, ou oxigênio singlete (molécula extremamente reativa de oxigênio), que causam oxidação dos lipídios de membrana dos espermatozóides e das proteínas tiol. Em adição, o NO pode inibir a respiração celular pela nitrosilação do grupamento heme das enzimas mitocondriais, da enzima metaloprotéica aconitase e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, levando à depleção do trifosfato de adenosina, prejudicando a motilidade dos espermatozóides (BALERCIA et al., 2004).

Múltiplos agonistas fisiológicos participam da exocitose acrossomal, tal como o ANP sintetizado nas células da granulosa e ovócitos de ovários de mamíferos e secretado no fluido folicular. O receptor de peptídeo natriurético atrial (NPR-A) de alta afinidade foi detectado em espermatozóides humanos e de bovinos. Desta forma, o ANP induz a reação de acrossoma através da formação de GMPc. Existe a possibilidade de ligação do ANP a um segundo subtipo de receptor, o NPR-C, promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  e ativação da PKC, também responsáveis pela indução da reação (ROTEM et al., 1998).

Canais CNG, abertos diretamente por AMPc e GMPc, foram identificados em espermatozóides de mamíferos, e são permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$ . Em virtude de sua alta permeabilidade, estes canais são os primeiros candidatos para a mediação da entrada de  $Ca^{2+}$  em espermatozóides. O AMPc promove a fosforilação de proteínas flagelares através da ativação da PKA, regulando, desta forma, a motilidade de espermatozóides. Em vertebrados, os níveis de GMPc nos espermatozóides são muito baixos, e as guanilato ciclases solúvel e de membrana são pouco detectadas. Entretanto, os canais CNG são mais sensíveis ao GMPc do que ao AMPc, destacando a função fisiológica do GMPc como uma importante molécula de sinalização em espermatozóides. Além disso, a localização dos canais CNG no flagelo favorece a regulação da motilidade, em vez da exocitose acrossomal. Entretanto, concentrações elevadas de nucleotídeos cíclicos podem aumentar os níveis de  $Ca^{2+}$

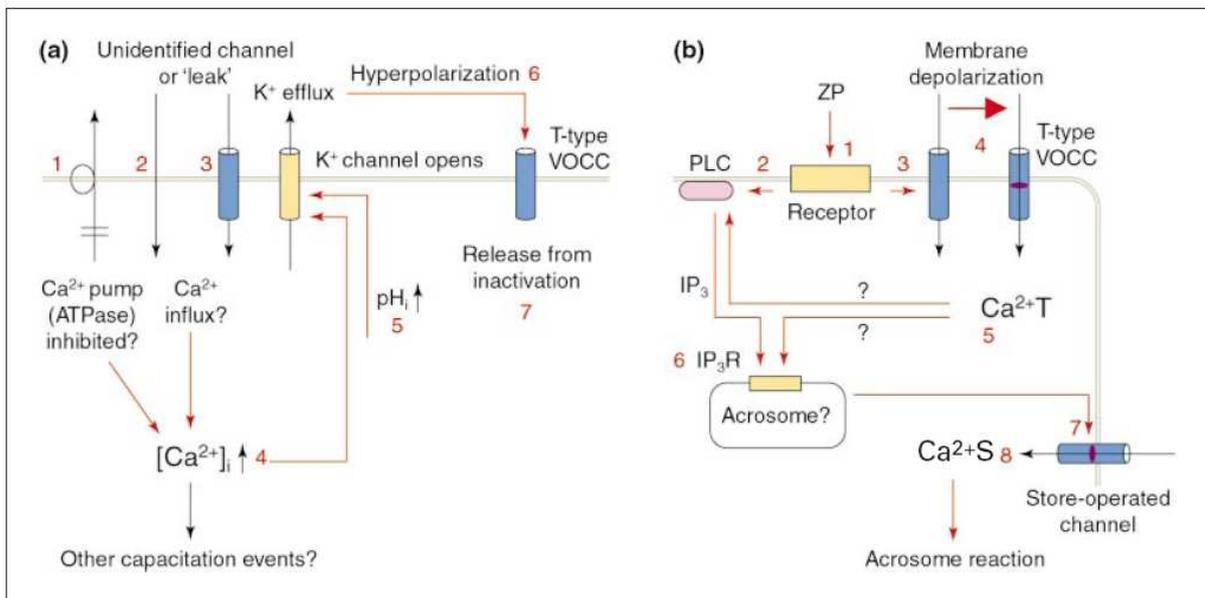
intracelular, que é propagado para a cabeça, e, eventualmente, pode induzir a exocitose acrossomal (WIESNER et al., 1998).

Várias moléculas presentes no plasma seminal tais como os peptídeos promotores de fertilização, calcitonina e adenosina podem ligar-se a receptores específicos na superfície de espermatozoides e afetar a função espermática. Elas regulam a capacitação e inibem a reação espontânea do acrossoma. Evidências indicam que essas moléculas podem atuar como primeiros mensageiros por afetar a produção do segundo mensageiro, o AMPc, através de adenilato ciclases de membrana via mecanismo regulado pela proteína G. Os primeiros mensageiros, inicialmente, estimulam a produção do AMPc e, então, acelera a capacitação. Quando esta se completa, as mesmas moléculas inibem a produção de AMPc, como também a reação acrossomal espontânea. O plasma seminal também contém angiotensina II que acelera a capacitação de espermatozoides não capacitados, mas não inibe a reação acrossomal espontânea em células capacitadas. Esta molécula estimula a síntese de AMPc através de um mecanismo indireto, via aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que estimula a adenilato ciclase de membrana (FRASER et al., 2005).

Os eventos moleculares implicados no processo de capacitação incluem a remoção de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide, o fluxo de íons que altera o potencial de membrana, e a fosforilação de proteínas, via PKA, envolvida na indução da hiperativação e reação de acrossoma. A remoção de esterol diminui o conteúdo de colesterol/fosfolípido, e promove mudanças na fluidez de membrana e redistribuição das proteínas durante a capacitação. Este efluxo de colesterol, possivelmente, desfaz os microdomínios lipídicos ativando eventos de sinalização envolvendo tirosina quinases, proteína G e/ou outras moléculas. Durante o trânsito nos tratos reprodutivo masculino e feminino, os espermatozoides são expostos a variações na concentração de íons e osmolaridade, que alteram o potencial de membrana, influenciando a motilidade, capacitação e reação de acrossoma através da via do AMPc. A capacitação é dependente de  $\text{HCO}_3^-$ , e seu movimento transmembrana no espermatozoide seria responsável pelo aumento do pH intracelular, característico desse evento. Este ânion, juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$ , regula a síntese de AMPc estimulando a enzima adenilato ciclase (VISCONTI et al., 2002).

A reação de acrossoma é um evento secretório, com liberação de enzimas hidrolíticas, desencadeado pela interação do espermatozoide com o ovócito. Embora inúmeros sistemas mensageiros intracelulares estejam implicados e a bioquímica da reação seja complexa, a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e seu consequente influxo desempenham uma importante função. Em vários mamíferos, o aumento continuado de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, dependente do influxo de

$\text{Ca}^{2+}$  extracelular, é induzido diretamente pela zona pelúcida solubilizada. A fase inicial do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido pela zona pelúcida requer a ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VOCCs) (Figura 7) (JAGANNATHAN; PUBLICOVER; BARRATT, 2002).



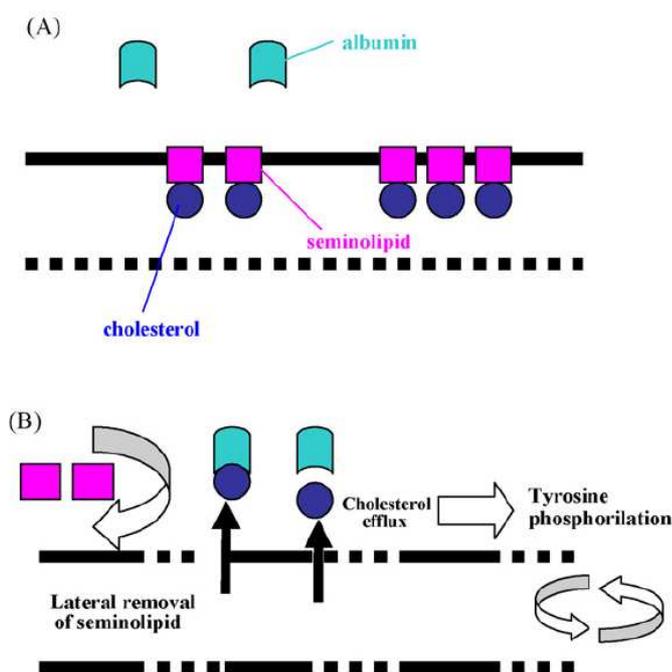
**Figura 7.** Regulação e ativação de VOCCs durante a capacitação e indução da reação de acrossoma pela zona pelúcida em espermatozoides de mamíferos.

**Fonte:** Jagannathan; Publicover; Barratt (2002).

**Nota:** As linhas vermelhas mostram as ações causativas entre os componentes das vias. Os números vermelhos se referem aos componentes específicos citados abaixo. Os cilindros azuis na membrana representam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de cátions transportadores do fluxo de íons para dentro da célula. Os cilindros amarelos representam os canais de  $\text{K}^+$ . Os retângulos amarelos são as moléculas receptoras. A forma rosa representa a fosfolipase C (PLC). (a) Possível regulação dos VOCCs tipo T pelo potencial de membrana. Durante a capacitação: (1) efluxo reduzido de  $\text{Ca}^{2+}$  devido à inibição da bomba ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$ ; (2) aumento da difusão de  $\text{Ca}^{2+}$  através da bicamada devido à instabilidade causada pela remoção de colesterol; e (3) aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  devido à abertura de um canal não identificado, resultando em um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (4). Alcalinização citoplasmática (5) é também conhecida por ocorrer durante a capacitação. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e/ou o pH intracelular podem regular um ou mais tipos de canais de  $\text{K}^+$  na membrana plasmática do espermatozoide, causando hiperpolarização (6) do potencial de membrana. A hiperpolarização libera os VOCCs tipo T da inativação (7), visto que eles se tornam competentes para responder aos estímulos provenientes da zona pelúcida. (b) Provável participação dos VOCCs tipo T e canais de íons permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  na indução da reação de acrossoma pela zona pelúcida. A ligação da zona pelúcida (ZP) ao seu receptor (1) ativa a PLC (2) e um canal de cátion não identificado (3). A abertura do canal de cátion habilita o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando despolarização (4) da membrana plasmática, resultando na inativação dos VOCCs tipo T. O breve influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  gera um aumento transitório (T) de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\text{Ca}^{2+}\text{T}$ ; 5). O inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), gerado pela ativação da PLC, liga-se aos receptores de  $\text{IP}_3$ , provavelmente, no acrossoma (7), permitindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e causando um aumento continuado (S) de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\text{Ca}^{2+}\text{S}$ ; 8), que leva à reação de acrossoma. O  $\text{Ca}^{2+}\text{S}$  nunca é gerado, a não ser que o  $\text{Ca}^{2+}\text{T}$  tenha ocorrido antes, indicando que o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra através dos VOCCs tipo T participa de eventos que levam à abertura dos canais de íons permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ .

Desta forma, a capacitação e a subsequente reação de acrossoma são eventos importantes no processo de fertilização. Elas são essenciais para o espermatozoide adquirir habilidades de ligação e penetração na zona pelúcida e, posteriormente, fundir-se com a

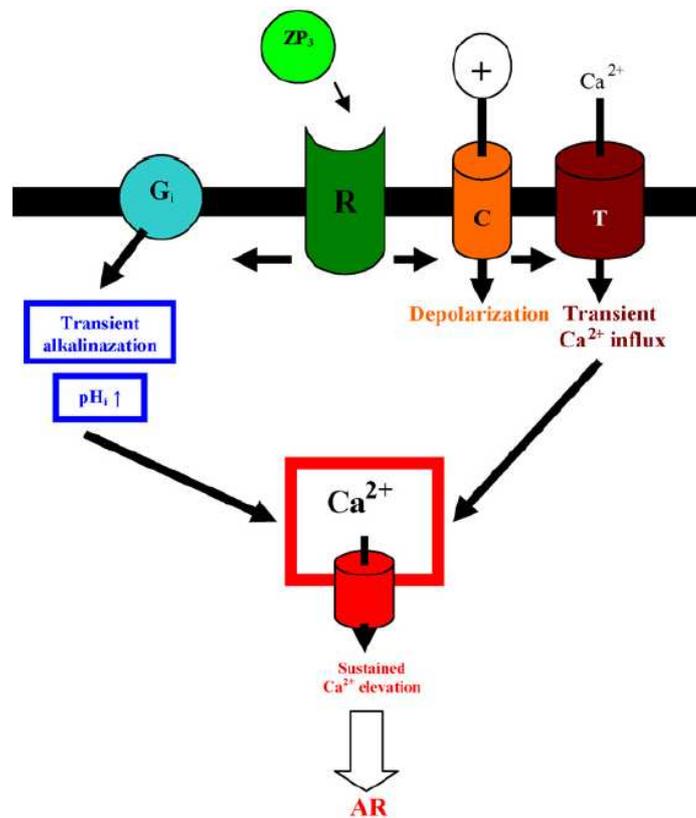
membrana plasmática do ovócito. Algumas substâncias, tais como o colesterol, o  $\text{Ca}^{2+}$  e a progesterona ( $\text{P}_4$ ), estão envolvidas na indução de mudanças nos espermatozóides. O primeiro passo da capacitação é o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, bicarbonato e peróxido de hidrogênio, que coletivamente estimulam a produção de AMPc, pela adenilato ciclase, que ativa a PKA para fosforilar certas proteínas. Esse evento envolve a desestabilização da membrana plasmática, através da distribuição e composição de lipídios, fosfolipídios e outras moléculas, aumentando a fluidez da membrana (Figura 8). O  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante modulador da capacitação e reação de acrossoma, e é, provavelmente, o principal mensageiro na troca de informação entre o espermatozóide e o ovócito (Figura 9). A  $\text{P}_4$  é um indutor fisiológico da reação de acrossoma, visto que ela aumenta a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, induzindo a reação de acrossoma no trato reprodutor feminino (Figura 10) (WITTE; SCHAFFER-SOMI, 2007).



**Figura 8.** Representação esquemática do efluxo de colesterol da membrana plasmática do espermatozóide.

**Fonte:** Witte e Schafer-Simon (2007).

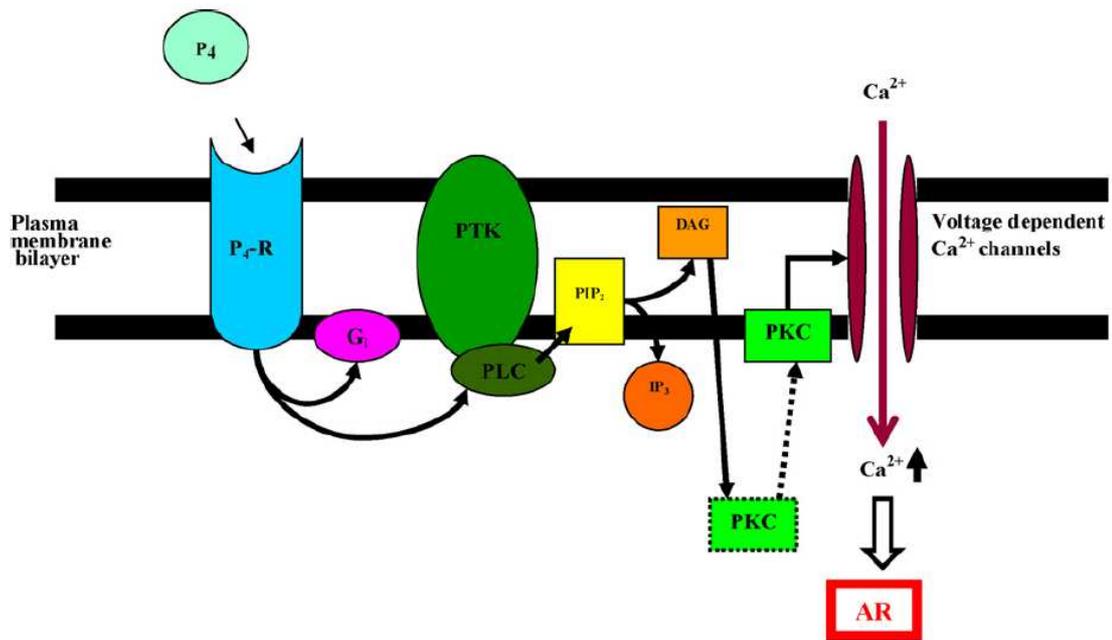
**Nota:** (A) ordenamento de lipídios na membrana plasmática de espermatozóides ejaculados; a distribuição dos fosfolipídios é assimétrica e os níveis de colesterol são relativamente altos. O seminolípido, um glicolípido específico, está concentrado na membrana plasmática apical. (B) Mudanças no ordenamento de lipídios durante a capacitação em um meio com albumina, bicarbonato e cálcio. Como resultado a assimetria dos fosfolipídios de membrana entram em colapso e permite o efluxo, mediado pela albumina, do colesterol bem como a remoção lateral do seminolípido.



**Figura 9.** Representação esquemática do mecanismo de ativação dos canais iônicos de espermatozoides.

**Fonte:** Witte e Schafer-Simon (2007).

**Nota:** ZP<sub>3</sub> = proteína 3 da zona pelúcida; R = receptor; G<sub>i</sub> = proteína G. Uma via consiste da ativação de um canal de cátion (C), que promove a despolarização da membrana plasmática; o resultado da despolarização é a ativação de um canal tipo T ativado por baixa voltagem (T). A outra via de sinalização resulta de uma alcalinização temporária do pH interno (pH<sub>i</sub>). Ambas as vias promovem a elevação continuada de Ca<sup>2+</sup>, necessária para a reação de acrossoma.

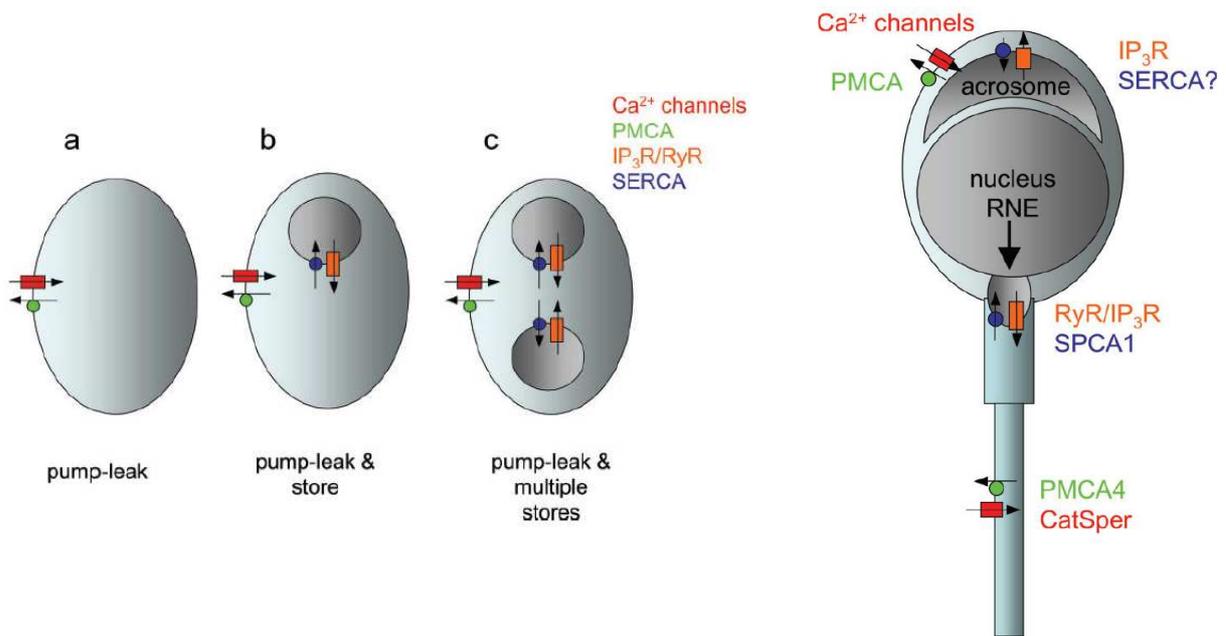


**Figura 10.** Representação esquemática da via de sinalização da reação de acrossoma induzida pela  $P_4$  em espermatozoides de ganhão.

**Fonte:** Witte e Schafer-Simon (2007).

**Nota:** A  $P_4$  atua na membrana plasmática através do receptor não genômico ( $P_4$ -R), que é exposto durante a capacitação. Este ativa a proteína tirosina quinase (PTK) ligada a fosfolipase C (PLC) diretamente ou via proteína G ( $G_i$ ). A ativação da PLC cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em  $IP_3$  e DAG. A função do  $IP_3$  não é clara, mas o DAG estimula a PKC e a transporta para a membrana. A PKC, então, abre os VOCs, promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular. O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular leva à excitose acrossomal.

Em espermatozoides, a homeostasia do  $Ca^{2+}$  é um modelo complexo, que envolve vários tipos de canais permeáveis ao  $Ca^{2+}$  na membrana plasmática e pelo menos dois compartimentos intracelulares (Figura 11). Os canais transmembrana (VOCCs), que servem de mediadores para a despolarização, via entrada de  $Ca^{2+}$ , pelo sinal bicarbonato-AMPC- PKA; juntamente com a nova família de canais de íons (*CatSpers*), exclusivos dos espermatozoides e essenciais para a ativação da mobilidade hiperativada; e a ATPase de  $Ca^{2+}$  de membrana (PMCA4), são expressos na peça principal da cauda do espermatozoide. A atividade do acrossoma ocorre via canal de  $Ca^{2+}$  sensível ao inositol 1,4,5-trifosfato (receptor  $IP_3$  ou  $IP_3R$ ), que se liga ao segundo mensageiro  $IP_3$  e promove o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Um outro compartimento que armazena  $Ca^{2+}$ , o envelope nuclear redundante (RNE) ou grupo de vesículas de membranas originadas do envelope nuclear, existe na região do pescoço do espermatozoide e participa da regulação do batimento flagelar (JIMENEZ-GONZALEZ, et al., 2006).



**Figura 11.** Modelo de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  em espermatozóiado humano.

**Fonte:** Jimenez-Gonzalez, et al. (2006).

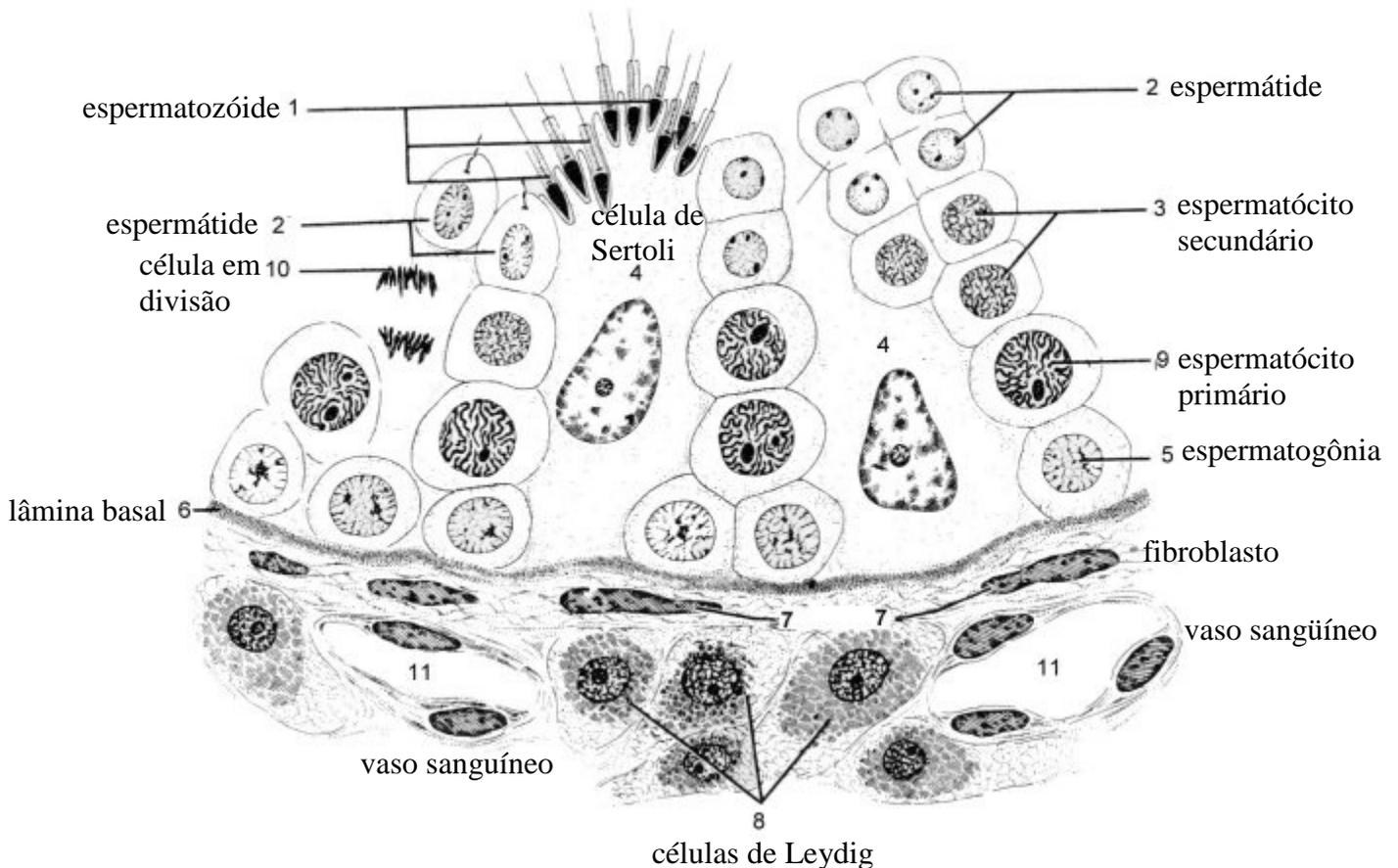
**Nota:** ATPases de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana (PMCA) e os trocadores de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX) são mostrados em verde; canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática são mostrados em vermelho; ATPases do retículo endoplasmático (SERCAs) de compartimentos intracelulares são mostradas em azul; e canais para mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado são mostrados em laranja (RyR – receptor rianodina caracterizado como um canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por  $\text{Ca}^{2+}$ ). (a) simples sistema de bomba de vazamento baseado inteiramente no transporte através da membrana plasmática. A  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é mantida pela PMCA/NCX e a sinalização ocorre através da propagação de canais na membrana plasmática regulada por ligantes, segundos mensageiros e/ou potencial de membrana. Diferentes tipos de canais podem ser encontrados, permitindo a célula gerar diferentes sinais de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de acordo com a natureza do estímulo. (b) Mostra um sistema com compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que potencialmente fornece sinais de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mais complexos, e inclui canais de íons permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  para prover o influxo prolongado deste íon através da membrana plasmática. (c) Sistema incluindo dois ou mais compartimentos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este sistema tem o potencial para mobilização localizada do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado e para a interação entre os compartimentos.

## 2.4 Testículos

Os testículos são revestidos por uma firme cápsula fibrosa, e possuem dois principais compartimentos: o intertubular ou intersticial e o compartimento do túbulo seminífero. O interstício contém vasos sanguíneos, linfáticos e capilares não fenestrados. O tipo celular mais encontrado nesta região é a célula de Leydig, fonte de androgênio, especialmente a testosterona, bem como de uma variedade de outros produtos, tais como peptídeos derivados da propiomelanocortina, encefalinas e dinorfinas, fator liberador de corticotropina, ocitocina, e renina-angiotensina. Sua morfologia é caracterizada por abundante retículo endoplasmático liso e mitocôndrias com cristas tubulares, ambos contendo enzimas associadas com a síntese de esteróides. Os macrófagos são comumente observados no interstício e, em algumas espécies, pode atingir 25% do número de células. Os túbulos seminíferos são cordões contorcidos cujas pontas estão conectadas a um sistema de ductos (rete testis) através dos túbulos retos. O compartimento do túbulo seminífero é delimitado pelo endotélio linfático, células mióides e elementos acelulares, os quais, juntos, formam a membrana limitante do túbulo. As membranas basais são vistas entre as células endoteliais linfáticas, e entre as células mióides e as células dentro do túbulo. As células mióides são contráteis e oferecem força motora para o movimento do fluido e propulsão dos espermatozóides pelo túbulo (GARTNER; HIATT, 1999).

O processo pelo qual a espermatogônia forma espermatozóide é conhecido como espermatogênese, que pode ser dividida em três fases: 1 - proliferativa (espermatogonial), no qual as células são submetidas a sucessivas divisões mitóticas; 2 – meiótica (espermatocitária), cujo material genético é recombinado e segregado; 3 – diferenciação ou espermiogênica (espermátides), onde as espermátides se transformam em células estruturalmente equipadas para fertilizar o ovócito (Figura 12). Existem três tipos de espermatogônias: espermatogônia célula-tronco, espermatogônia proliferativa e espermatogônia de diferenciação. As espermatogônias conhecidas por serem as células-tronco são chamadas de espermatogônias  $A_{\text{isolada}}$  ( $A_{\text{is}}$ ), enquanto outras espermatogônias tipo A são proliferativas ( $A_{\text{pareada}}$  –  $A_{\text{pr}}$  e  $A_{\text{alinhada}}$  –  $A_{\text{al}}$ ) e diferenciadas ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , intermediária – In, e tipo B). Ao final da fase de diferenciação, a espermatogônia mais madura se divide para formar o espermatócito primário jovem. Especificamente, as células do tipo B se dividem para formar espermatócitos preleptóteno (Pl). A prófase da primeira divisão meiótica é de longa duração, em torno de três semanas, e com variações morfológicas (preleptóteno – Pl,

leptóteno – L, zigóteno – Z, paquíteno – P e diplóteno – Di). A metáfase, anáfase e telófase também fazem parte da primeira divisão meiótica ou meiose I, e formam os espermatócitos secundários. A segunda divisão meiótica ou meiose II segue rapidamente para produzir espermátides. Na fase espermiogênica, a espermátide se transforma em espermatozóide sem divisão celular (DESJARDINS; EWING, 1993).



**Figura 12.** Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero.

**Fonte:** Desjardins; Ewing, 1993

Os espermatozóides são as últimas células produzidas pelos testículos durante o processo regulado por hormônio denominado espermatogênese. Após sua liberação dos testículos, eles devem completar sua maturação durante o trânsito através do epidídimo. Na ejaculação, os espermatozóides estão misturados com as secreções da próstata e vesículas seminais e, mesmo que eles iniciem a motilidade, ainda não estão prontos para fertilizar o ovócito. Durante sua passagem através do trato genital feminino, as células espermáticas são submetidas a uma série complexa de transformações que envolve mudanças iônicas,

metabólicas e de membrana que são coletivamente chamadas de capacitação, que permite a ligação do espermatozóide à zona pelúcida que circunda o ovócito. Este processo está correlacionado com o efluxo de colesterol da membrana plasmática do espermatozóide, aumento da fluidez de membrana, modulações na concentração intracelular de íons, hiperpolarização da membrana plasmática e aumento da fosforilação da proteína tirosina. Estes eventos celulares são requeridos para a subsequente indução da hiperativação e reação de acrossoma. Esta, é um evento excitatório, onde enzimas proteolíticas (acrosina e hialuronidase) são liberadas e, desta forma, o espermatozóide pode penetrar na zona pelúcida, atingir e fundir-se com o ovócito (FLAHERTY; LAMIRANDI; GAGNON, 2006; VISCONTI et al., 2002).

As células de Sertoli são células somáticas equipadas para manter a espermatogênese, ou seja, ela controla as diferentes fases de desenvolvimento das células germinativas que estão justapostas. Essas células possuem dois compartimentos permanentes (basal e adluminal) e um transitório (intermediário) dentro do epitélio seminífero. O compartimento basal possui as espermatogônias e espermatócitos até a fase leptóteno da meiose. Essas células têm acesso livre a substâncias que se difundem do sistema linfático e vascular e de vesículas pinocitóticas provenientes das células endoteliais e mióides. Numerosas junções de oclusão entre as células de Sertoli na sua superfície baso-lateral demarcam o compartimento basal do adluminal. O compartimento intermediário é formado durante o trânsito de células no leptóteno do compartimento basal para o adluminal e envolve sucessiva formação e quebra das junções de oclusão. Além destes compartimentos, o complexo juncional entre duas células de Sertoli também cria uma barreira de permeabilidade denominada barreira de células de Sertoli, essencial para criar uma compartimentalização fisiológica dentro do epitélio seminífero, com relação à composição iônica, de aminoácidos, carboidratos e proteínas. Além de segregar o líquido que facilita a passagem dos espermatozoides em maturação ao longo dos túbulos, as células de Sertoli secretam a proteína de ligação de androgênios (ABP), responsável por concentrar a testosterona no compartimento adluminal do túbulo seminífero para a maturação normal dos espermatozoides. As células de Sertoli também secretam inibina, que inibe a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) pela adeno-hipófise; o ativador de plasminogênio, que converte plasminogênio em hormônio proteolítico ativo plasmina; e transferrina, proteína transportadora de ferro (HOSS; PAWLINA, 2008).

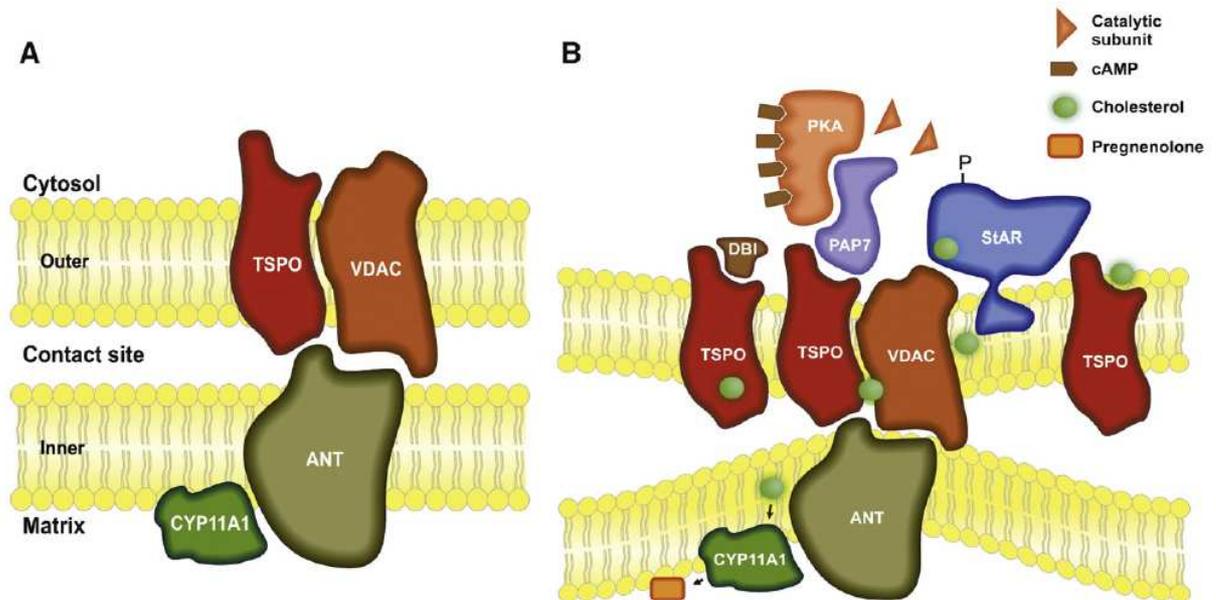
Duas populações de células de Leydig podem ser reconhecidas no testículo de roedores: células de Leydig fetais (FLCs) e células de Leydig adultas (ALCs), que diferem na topografia, estrutura, tempo de vida, capacidade para a síntese de androgênio e mecanismo de

regulação pelas gonadotrofinas. As FLCs, arranjadas em grupos, são encontradas a partir do dia fetal 14.5 até o dia pós-natal 25, identificadas pela presença da enzima 3 $\beta$ -HSD (hidroxiesteróide desidrogenase) e receptores para o hormônio luteinizante. Seus precursores são os fibroblastos mesenquimais e originam-se do lóbulo anterior dos mesonéfrons e, uma pequena proporção, da crista gonadal. As ALCs são subdivididas em três estágios de diferenciação: (1) estágio progenitor – as células originam-se dos fibroblastos mesenquimais (dia pós-natal 13-28) e produzem androsterona como androgênio predominante; (2) estágio imaturo – as ALCs produzem pequenas quantidades de testosterona a partir do dia pós-natal 35, e tem o 5 $\alpha$ -androsteno-3 $\alpha$  e o 3 $\beta$ -diol como principais produtos finais; (3) estágio maduro - as células de Leydig ativamente produzem testosterona como produto final e são completamente funcionais no dia pós-natal 90 (PAYNE; HARDY, 2007).

A glândula pituitária, sob influência da estimulação hipotalâmica, secreta dois hormônios glicoprotéicos que promovem a espermatogênese. Um deles, o FSH estimula diretamente o túbulo seminífero ligando-se às células de Sertoli e, possivelmente, às espermatogônias. O FSH é importante para iniciar a espermatogênese durante o desenvolvimento pubertal. Neste período, o FSH torna-se um pré-requisito para a ação da testosterona. O LH tem um efeito indireto na espermatogênese via estimulação das células de Leydig. Estas células contêm receptores de superfície para LH e responde à estimulação produzindo e liberando testosterona, que se difunde para dentro do túbulo, livre ou ligada a um carreador, tal como a albumina. Receptores para este hormônio também estão presentes nas células de Sertoli (DESJARDINS; EWING, 1993). A secreção episódica de LH suporta a função esteroidogênica da célula de Leydig através de sua interação com os receptores de LH na superfície da célula, e pela subsequente estimulação de eventos dependentes de AMPc. Os sítios específicos do receptor de LH ativam a adenilato ciclase, dentro da membrana plasmática, após a ligação do LH/hCG. A rápida estimulação da adenilato ciclase é responsável pela ação trófica e esteroidogênica do LH na célula de Leydig via ativação da proteína quinase e posterior fosforilação de proteínas regulatórias que controlam enzimas esteroidogênicas envolvidas na biossíntese de androgênio (DUFAU, 1988).

O transporte de colesterol para a mitocôndria é um passo determinante e dependente de hormônio para a síntese de esteróide. Duas proteínas são críticas neste processo: a TSPO e a StAR. Estas interagem para facilitar o transporte de colesterol e fazem parte do amplo complexo mitocondrial multimérico de proteínas, tais como canais de ânions dependentes de voltagem (VDAC), proteína PAP7 associada à proteína translocadora, que também funciona como uma proteína ancoradora de quinase A que se liga e traz para o complexo a subunidade

regulatória I $\alpha$  da PKA (Figura 13). A TSPO e a StAR transferem o colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, onde reside a enzima P450<sub>sc</sub>. Esta enzima converte o colesterol em pregnenolona, que é transferida para o retículo endoplasmático, onde ocorre a síntese de testosterona através de uma série de reações enzimáticas (HAIDER, 2004; PAPADOPOULOS; LIU; CULTY, 2007).



**Figura 13.** Interações proteína-proteína na membrana mitocondrial externa.

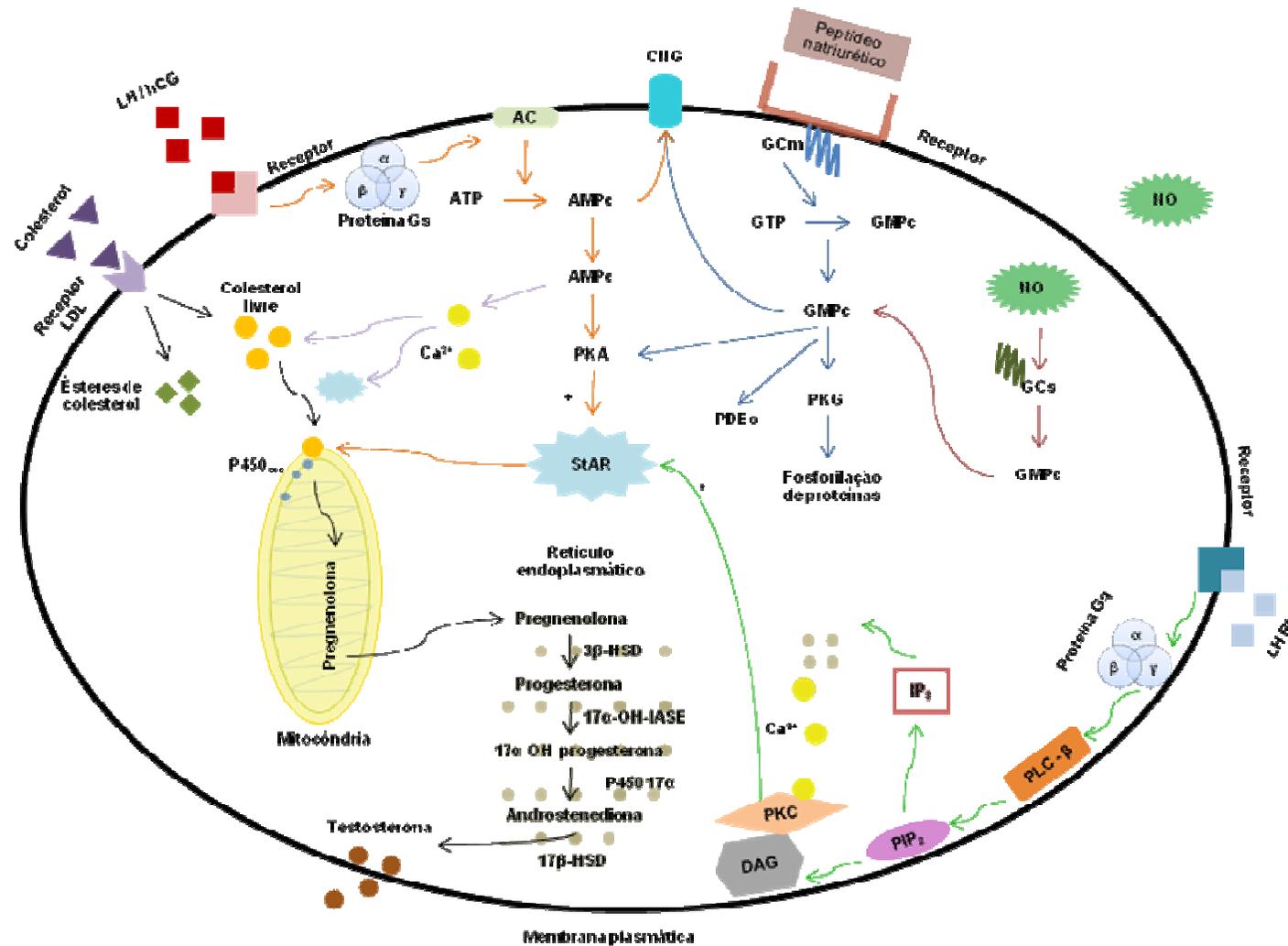
**Fonte:** Rone; Fan; Papadopoulos (2009).

**Nota:** (A) Interações das proteínas TSPO, VDAC e o transportador do nucleotídeo adenina (ANT) no estado celular basal. (B) Complexo formado após estimulação hormonal aguda. A TSPO, PAP7 e VDAC recrutam a PKA-R1 $\alpha$ . O acúmulo de AMPc ativa a PKA-I $\alpha$ , liberando as subunidades catalíticas e fosforilando a StAR presente na membrana mitocondrial externa. A StAR interage com a TSPO e a VDAC e é introduzida na membrana mitocondrial interna. O colesterol é transportado para a membrana mitocondrial interna com a assistência deste complexo de proteínas e do ligante endógeno, o inibidor de ligação de diazepam (DBI); lá o colesterol interage com a enzima P450<sub>sc</sub> e é convertido em pregnenolona.

Recentemente, a expressão de PDE5 foi detectada em células de Leydig e células peritubulares, identificadas como mióides, no testículo de ratos púberes e adultos. Foi demonstrado que as células de Leydig contêm GMPc e sua proteína ligante (proteína Kinase tipo D), a guanilato ciclase B, o receptor de peptídeo natriurético tipo C, e por estas células expressarem os principais componentes da via do NO (óxido nítrico sintase e GCs). As diferentes vias de sinalização, estimuladas pelo LH, LHRH, peptídeos natriuréticos e NO, para produção de hormônios esteróides pelas células de Leydig podem ser observadas na

Figura 14. Nas células de Sertoli a expressão de PDE5 não foi detectada, mas diferentes PDEs contribuem para o metabolismo de GMPc (SCIPIONI et al., 2005). De fato, a hidrólise de GMPc nestas células é estimulada por membros da família PDE1 dependentes de cálcio-calmodulina (CONTI et al., 1982, 1995; ROSSI et al., 1985; ZHAO et al., 1997).

Processos mediados por GMPc no testículo de mamíferos não somente influenciam a vasodilatação, mas também, a síntese de testosterona pelas células de Leydig, e a motilidade de espermatozóides, através do relaxamento das células mióides da lâmina própria. Nestas células, além da regulação da contratilidade, que representa um fator importante na fertilidade masculina, a modulação do GMPc deve afetar a secreção de substâncias, tais como, componentes da matrix extracelular (fibronectina, colágenos tipo I e IV, proteoglicanas) e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , IGF-I, ativina-A) (SCIPIONI et al., 2005).



**Figura 14.** Vias de tradução de sinal hormonal na síntese de testosterona em células de Leydig.

**Fonte:** modificado de Figueiroa (2008).

**Nota:** O LH estimula a função esteroidogênica através de eventos dependentes de AMPc (setas laranjas); o LHRH estimula outro sistema de segundo mensageiro envolvido na hidrólise de lipídios de inositol pela PLC-β (setas verdes); o Ca<sup>2+</sup> citosólico potencializa o transporte de colesterol para a mitocôndria e a atividade de uma ou mais enzimas (setas lilases); e os peptídeos natriuréticos (setas azuis) e o NO (setas vermelhas) atuam através das vias da guanilato ciclase.

### 3 JUSTIFICATIVA

No ano de 2005 a Pfizer submeteu uma proposta ao *Food and Drug Administration* (FDA) visando o uso do Sildenafil como terapia oral para hipertensão pulmonar, e foi aprovada para esta indicação. Recentes estudos demonstram que o Sildenafil atenua os sintomas da hipertensão pulmonar por aumentar o suprimento de sangue aos pulmões. Sua administração promove o relaxamento da parede arterial e diminuição da resistência arterial pulmonar. Devido à presença de PDE5 na parede das artérias, músculo liso e pulmões, este fármaco atua nestas áreas e induz vasodilatação, via acumulação de GMPc pela inibição da enzima (UTHAYATHAS et al., 2007).

Apesar de possuir uma eficácia terapêutica potencial em diferentes desordens, o tratamento com Sildenafil também provoca algumas reações adversas classificadas como transitórias, de natureza leve e moderada, relacionadas ao aumento da dose. Entre os efeitos mais comuns estão incluídos : cefaléia, rubor, tontura, dispepsia, congestão nasal e alterações visuais (PFIZER, 1998). Pela falta de esclarecimentos e de conhecimentos específicos sobre o uso contínuo de altas concentrações desta droga no indivíduo jovem com hipertensão pulmonar, fazem-se necessários estudos morfo-fisiológicos de diferentes tipos celulares.

Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, desempenham importantes funções nas células somáticas do testículo, e regulam diretamente o microambiente onde as células germinativas se diferenciam, além de controlar hormonalmente a função testicular. A expressão da PDE5 nas células de Leydig e peritubulares do testículo participa da modulação das vias de transdução de sinal do GMPc e, desta forma, regula a função reprodutiva masculina (SCIPIONI et al., 2005).

Este estudo se propõe a analisar possíveis alterações na esteroidogênese e parâmetros espermáticos de camundongos machos e púberes em consequência do uso continuado de altas concentrações de Sildenafil através de análises morfológicas de células de Leydig e espermatozóides, hormonais e moleculares para possíveis analogias com casos clínicos e alertar problemas futuros no âmbito da saúde pública.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Quais os efeitos do tratamento crônico com Sildenafil sobre a esteroidogênese e parâmetros espermáticos de camundongos?

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Analisar a ação do Sildenafil sobre a esteroidogênese e parâmetros espermáticos de camundongos *Swiss Webster* machos e púberes.

### 5.2 Objetivos Específicos

Caracterizar o efeito do tratamento do Sildenafil na concentração de 25mg/kg sobre a esteroidogênese através de análises morfológicas, hormonais e moleculares:

- a) Analisar a ultra-estrutura das células de Leydig após tratamento com Sildenafil;
- b) Avaliar possíveis alterações na produção de testosterona após o tratamento;
- c) Realizar análises imunocitoquímicas e moleculares das principais proteínas envolvidas na via esteroidogênica (StAR, P450<sub>scc</sub>, PKA, PKG, GCs).

Avaliar os parâmetros espermáticos após o tratamento com Sildenafil:

- a) Avaliar os parâmetros de motilidade, vigor e integridade de acrossoma e DNA dos espermatozoides;
- b) Realizar análises ultra-estruturais e imunocitoquímicas para GCs, PKA e PKG;

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Solução de Sildenafil

A solução foi composta por água destilada e Sildenafil (Viagra, Pfizer) na concentração de 25mg/kg/dia, administrada durante de um e dois meses (durações dos ensaios experimentais), através de garrafas de água monitoradas diariamente. A concentração da droga na água foi ajustada para manutenção da dose (ZHAO et al., 2003).

### 6.2 Efeito do tratamento com Sildenafil sobre células *in vivo*

Sessenta camundongos *Swiss Webster* machos e púberes foram tratados diariamente com Sildenafil 25mg/kg (trinta animais para cada ensaio experimental). O grupo controle, também composto por sessenta animais, recebeu apenas água destilada. Após o esquema terapêutico os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 115mg/kg e cloridrato de xilazina 10mg/kg e, em seguida, o sangue foi coletado via punção cardíaca e armazenado à -20°C para posterior análise hormonal. Seguido o sacrifício do animal, espermatozóides foram coletados do epidídimo para avaliação espermática e processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET), e fragmentos testiculares foram retirados e processados para microscopia óptica e MET. As carcaças dos animais foram autoclavadas e descartadas em lixo biológico destinado à incineração. A responsabilidade deste procedimento foi do Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde foram realizados os experimentos. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ e encontra-se protocolado sob o número L-0035/2008 (Anexo A).

### 6.3 Isolamento de células de Leydig

O isolamento e a purificação de células de Leydig foram modificados de Hedger e Eddy (1986) e Wanderley e Negro-Vilar (1996). Os testículos dos animais foram desencapsulados sem afetar os túbulos seminíferos, sob condições assépticas, e digeridos em solução enzimática com 0.5mg/mL de colagenase, 0.2mg/mL de inibidor de tripsina e 5µg/mL de leupeptina em meio Hank's contendo 0.1% de BSA (HBSS/BSA), pH 7.4, em banho maria (20min, 90Hz, 34°C). Posteriormente, os testículos foram resuspendidos em 50mL (volume final) de HBSS/BSA e submetidos à sedimentação. O sobrenadante contendo as células de Leydig foi aspirado usando pipetas plásticas, filtrado em membrana de nylon 70µm e lavado em 50mL de HBSS/BSA. A suspensão celular foi centrifugada a 150 x g, 15 min, 20°C. O pellet obtido foi resuspendido em 5mL de HBSS/BSA, representando uma suspensão de células intersticiais puras. Gradientes Percoll de densidades descontínuas (20%, 35%, 43%, 68% e 90%) foram usados para obtenção de células de Leydig purificadas. A suspensão de células de Leydig foi aplicada nos gradientes e estes foram centrifugados a 800 x g por 30 min a 20°C. As células nas interfaces 35-43% e 43-68% foram aspiradas cuidadosamente usando uma seringa e transferidas para tubos de centrífuga contendo M199 e 0.1% de BSA. Os tubos foram centrifugados a 150 x g por 20 min e o sobrenadante foi, posteriormente, descartado. Para remover o excesso de Percoll, o pellet de células foi lavado duas vezes com M199 contendo 0.1% de BSA, e finalmente resuspendido na mesma solução. Este procedimento obteve 70% de células de Leydig como determinado por microscopia eletrônica (HEDGER; EDDY, 1986). A viabilidade das células (90-95%) foi quantificada usando azul de Tripán.

Para os ensaios de imunocitoquímica, as células de Leydig isoladas foram estimuladas com 1mIU/mL de hCG a 34°C por 30 min para amplificar o sinal para detecção de proteínas. Estas células foram imediatamente fixadas para análise por microscopia eletrônica.

### 6.4 Microscopia Óptica (MO)

Os fragmentos dos testículos foram lavados duas vezes em PBS pH 7.2 e fixados por 8 horas em Bouin (Ácido Pícrico saturado 1%, Formol a 40% e Ácido acético glacial),

desidratados em série crescentes de etanol, diafanizados em Xilol, incluídos e emblocados em parafina purificada (VETEC). A seguir, as amostras foram cortadas em Micrótopo (Leica RM2125RT) e coradas com Hematoxilina e Eosina (WENG et al., 2005). A área de 100 células de Leydig foi determinada usando o programa axiovision da Zeiss.

### **6.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Os fragmentos dos testículos e células de Leydig isoladas foram lavados duas vezes em PBS pH 7.2 e fixados overnight em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2. Os espermatozóides (ver item 6.8) foram fixados overnight em solução contendo glutaraldeído 2,5% e 2mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 2mM CaCl<sub>2</sub> e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2. Novamente lavadas em tampão cacodilato e contrastadas em bloco com acetato de uranila a 2,5%. A seguir, elas foram desidratadas em série crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPIN-PON (Sigma Company, St Louis, MO). A polimerização foi feita a 60°C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel de 300-mesh e contrastados com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo (SARAIVA et al., 2006). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D.

Para o estudo de imunocitoquímica, as células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG e espermatozóides foram fixados overnight em solução contendo 0,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0.1M. Após a fixação as amostras foram lavadas três vezes no mesmo tampão, incubadas com 50mM de cloreto de amônio por 40 min, desidratadas em etanol e embebidas em resina LR-White. A polimerização foi feita a 37°C por três dias (PEIXOTO et al., 1999).

## **6.6 Imunocitoquímica das proteínas esteroidogênicas (StAR e P450<sub>scc</sub>) e testosterona, anti-guanilato ciclase solúvel, subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc e proteína quinase tipo I dependente de GMPc**

A investigação através da técnica de imunocitoquímica foi realizada para localizar as proteínas citadas acima utilizando anticorpos policlonais. Os cortes ultrafinos de células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG e de espermatozóides foram incubados com 0,02M de PBS, pH 7.2, contendo 1% de BSA e 0.01% de Tween 20 (PBS-BT), por 30 min à temperatura ambiente. Após o ensaio experimental de um mês, secções ultrafinas de células de Leydig foram incubadas com cada um dos primeiros anticorpos contra P450<sub>scc</sub> (1:200), StAR (1:25) e testosterona (1:25), separadamente, por uma hora. Após o ensaio experimental de dois meses, secções ultrafinas de células de Leydig foram incubadas por duas horas com os primeiros anticorpos contra P450<sub>scc</sub> (1:200), StAR (1:25) e testosterona (1:25), e *overnight* com os anticorpos anti-guanilato ciclase  $\beta$ 1 solúvel (1:200), subunidade catalítica da proteínas quinase dependente de AMPc (1:50) e proteína quinase tipo I dependente de GMPc (1:50), separadamente. As secções de espermatozóides foram incubadas, apenas, com os três últimos anticorpos, separadamente. Os cortes foram lavados em PBS-BT e incubados com o segundo anticorpo, IgG anti-coelho conjugado a ouro coloidal. Finalmente, os cortes foram contrastados com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo (PEIXOTO et al., 1999). A análise quantitativa das partículas de ouro coloidal foi realizada através da contagem total das nanopartículas em 10 fotomicrografias de diferentes células de Leydig e espermatozóides.

## **6.7 Dosagem de testosterona**

Os níveis plasmáticos de testosterona foram obtidos por meio de radioimunoensaio (RIA) como descrito nas instruções do kit Coat-A-Count Total Testosterone (DPC Medlab, USA) no ensaio experimental de um mês e pelo kit para Radioimunoensaio Testosterona DSL-4100 (Diagnostics Systems Laboratories Inc, Texas, USA) no ensaio experimental de dois meses.

## 6.8 Parâmetros espermáticos

Após dois meses de esquema terapêutico, suspensões espermáticas foram preparadas através da coleta de espermatozóides da cauda do epidídimo dos animais, livre de gordura e sangue, em placa de petri contendo solução Tris aquecida (37°C). Os parâmetros de motilidade, vigor, integridade do acrossoma e do DNA foram avaliados.

A motilidade, que é mensurada em %, indica quantos espermatozóides estão se movendo em avaliação realizada em microscópio óptico. O vigor (0-5) indica a velocidade com que as células espermáticas estão se movendo. Consideram-se dentro do padrão de normalidade para sêmen fresco, valores de motilidade espermática mínima de 70% e vigor espermático igual a 3. A integridade do acrossoma foi avaliada pelo método FITC-PNA, onde 200 células foram contadas e analisadas em microscópio de fluorescência de acordo com a presença de acrossoma íntegro (verde-fluorescente) e acrossoma reagido (corado, mas não fluorescente), característico da capacitação espermática. A integridade do DNA foi analisada pelo método Acridine-Orange pela propriedade fluorescente das células (n=200). Aquelas que se apresentaram verde fluorescente eram possuidoras de DNA íntegro, e aquelas com coloração laranja tinham o DNA lesado (ELSHAL et al., 2009; GLENN et al., 2007).

## 6.9 Imunoblot das sintases de NO (eNOS, iNOS e nNOS)

Para análise da expressão das proteínas por Western blot, após dois meses de tratamento, as células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG, foram incubadas e lisadas em amostra tampão (62.5mM de Tris/HCl, pH 6.8, 2% (w/v) de SDS, 10% de glicerol e 50mM de ditiotreitol – DTT) por 1 hora. O extrato de células foi transferido para tubos de microcentrífuga e sonificado por 10-15s para o cisalhamento do DNA e redução da viscosidade da amostra. O conteúdo de proteína foi quantificado e alíquotas (25µg de proteína) das amostras foram submetidas à eletroforese em 10% de gel de poliacrilamida-SDS por 45 minutos a 200 V. Os géis foram embebidos em tampão de transferência (25mM de Tris/HCl, 192mM glicina e 20% [vol/vol] de metanol, pH 8.3) por 10 minutos, colados entre uma folha de papel de nitrocelulose e duas folhas de papel de filtro e montados em um dispositivo de immunoblotting (Bio-Rad), no qual as proteínas são eletrotransferidas para o papel de

nitrocelulose a 70 V (350 mA) em um tampão de transferência. A membrana foi bloqueada por 2 horas, à temperatura ambiente, com 5% de albumina em 20 mM de Tris/HCl, pH 7.5, e 0.154 M de NaCl. O papel de nitrocelulose foi, então, incubado overnight à 4°C com anti-eNOS (1:1000), anti-nNOS (1:1000) e anti-iNOS (1:250). Após três ciclos de lavagem, o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado à membrana por 1.5 hora à temperatura ambiente. A amostra foi lavada e a expressão das proteínas foi revelada e analisada (ABUELHIJA et al., 2008; ALVAREZ et al., 2008; UDRISAR et al., 2005).

### **6.10 Análise estatística**

A significância dos resultados foi analisada pelo Teste t, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Ensaio experimental de um mês

#### 7.1.1 Análise de células de Leydig por microscopia óptica

Nenhuma diferença morfológica foi observada entre células de Leydig do grupo controle e do grupo tratado.

#### 7.1.2 Ultra-estrutura de células de Leydig

No tecido testicular, as células de Leydig controles apresentaram formato poligonal irregular, em alguns casos um núcleo assimétrico localizado excentricamente no corpo da célula com nucléolo aparente, nucleoplasma claro, e grumos de heterocromatina pouco massivos na superfície interna do envelope nuclear. Os filopódios eram projetados e interdigitados com os da célula adjacente. O retículo endoplasmático liso (REL) tubular era abundante, consistindo de túbulos interconectados, ramificados e anastomosados, dispersos no citoplasma. Ocasionalmente, o REL circundava mitocôndrias e gotículas de lipídios. Círculos concêntricos de REL eram frequentemente observados. O retículo endoplasmático rugoso (RER) era escasso, localizado principalmente nas regiões perinuclear e periférica. As mitocôndrias eram numerosas e espalhadas no citoplasma com distribuição irregular. Seu tamanho era variável e apresentavam cristas espessas e tubulares. Vários complexos de Golgi estavam distribuídos no citoplasma, frequentemente encontrados próximo ao pólo da célula, uma vez que o núcleo é localizado excentricamente. Alguns corpos densos, provavelmente lisossomos, foram detectados. Os peroxissomos tinham formato irregular e foram identificados em porções do citoplasma. Várias gotículas de lipídio, de tamanhos variáveis, foram observadas no citoplasma (Figura 15: A, C e E).

As células de Leydig tratadas com Sildenafil apresentaram todas as organelas citadas acima. Algumas diferenças foram observadas, tais como REL vesicular, consistindo de

vesículas separadas de diâmetros variáveis. Ilhas de REL tubular apareciam entre as vesículas. Alguns vacúolos eram encontrados no citoplasma periférico, provavelmente abrindo-se para o espaço extracelular. As mitocôndrias apresentaram-se dilatadas com cristas descontínuas. Várias vesículas foram observadas na periferia dos círculos concêntricos de REL, possivelmente envolvidas na secreção de precursores hormonais (Figura 15: B, D e F). Todas essas alterações são típicas de células ativadas com capacidade esteroidogênica aumentada.

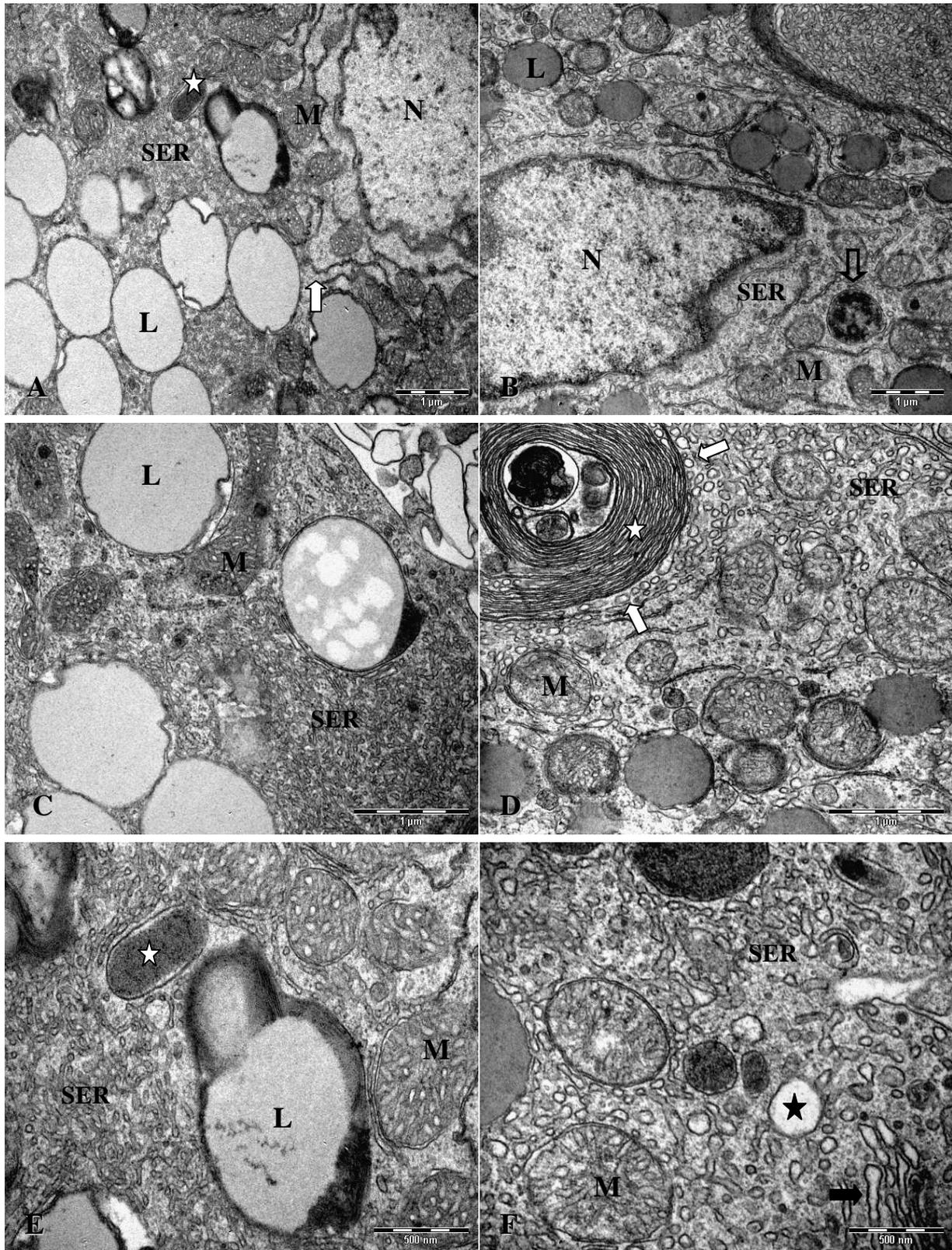
Alterações morfológicas similares foram observadas em células de Leydig isoladas. Entretanto o REL apresentou-se trabecular. Esta mudança poderia estar relacionada com o procedimento de isolamento. A estimulação com hCG não alterou as características ultraestruturais das células isoladas dos grupos tratado e controle (Figura 16).

#### 7.1.3 StAR, P450<sub>scc</sub> e Testosterona nas células de Leydig

A imunocitoquímica revelou que a via esteroidogênica estava significativamente mais ativa nas células de Leydig tratadas com Sildenafil. Marcação evidente para StAR, P450<sub>scc</sub> e testosterona foi detectada no citoplasma de células tratadas, quando comparado às amostras controles. Entretanto, em relação à detecção da P450<sub>scc</sub>, uma forte reação foi observada na mitocôndria (Figura 17 e Tabela 1).

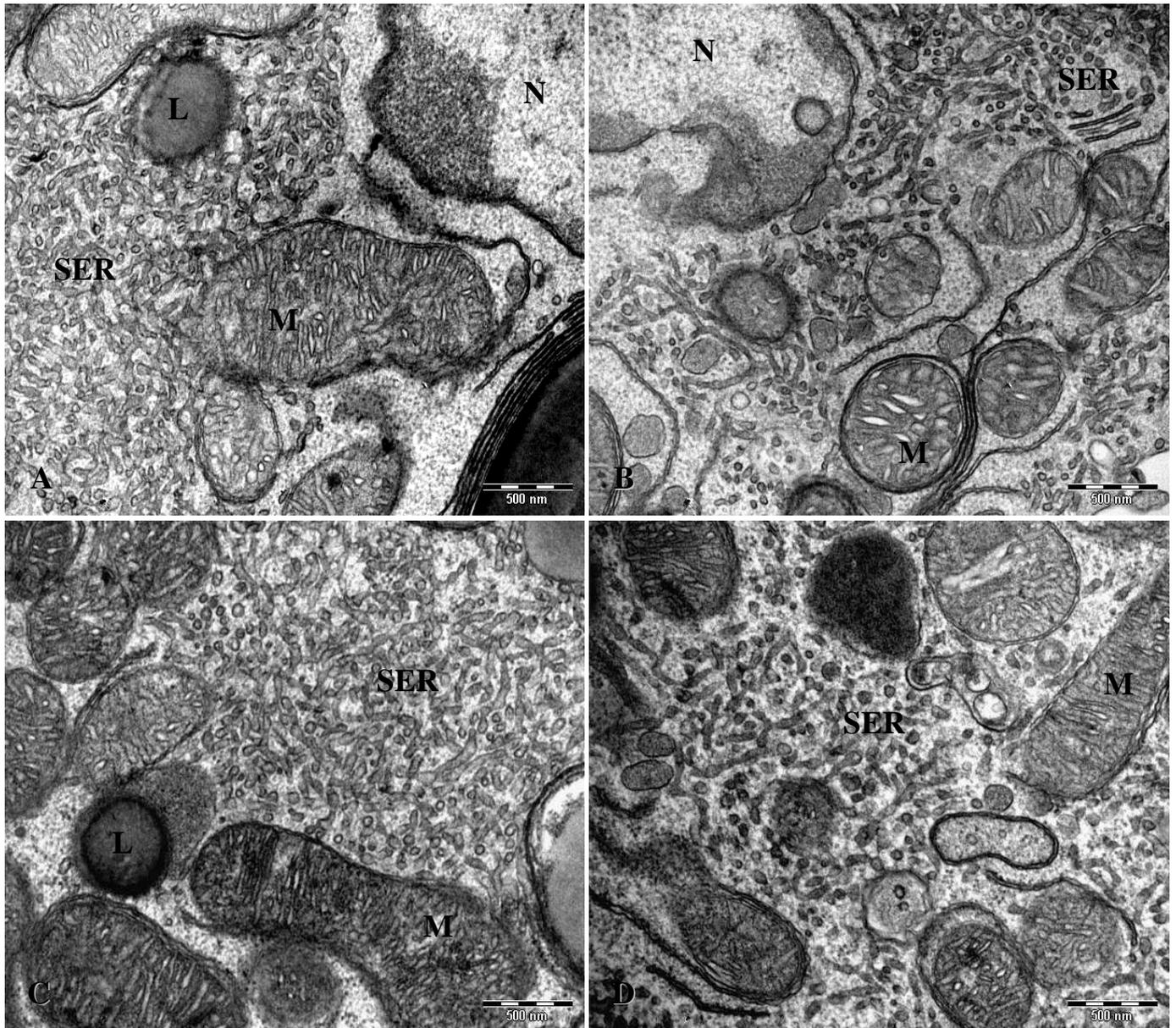
#### 7.1.4 Concentração de testosterona no soro

Os níveis de testosterona no soro foram significativamente maiores nos animais tratados com Sildenafil quando comparado aos controles (Mann-Whitney,  $p < 0.01$ ). Os parâmetros dos dois grupos são mostrados na tabela 2.



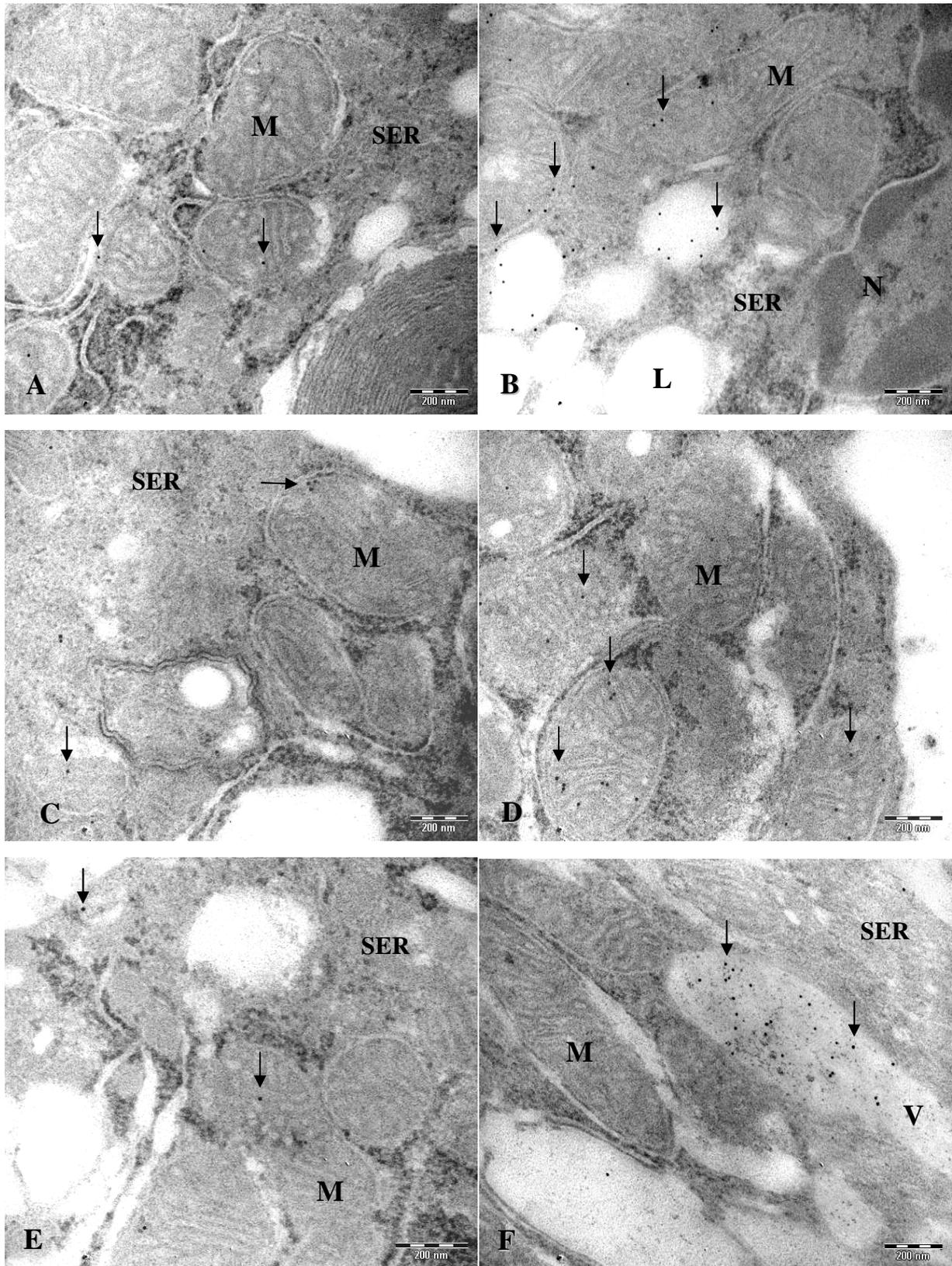
**Figura 15.** Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.

**Nota:** A C e E – células de Leydig não tratadas mostrando núcleo (N), gotículas de lipídio (L) várias mitocôndrias com cristas tubulares (M), retículo endoplasmático liso tubular (SER), retículo endoplasmático rugoso escasso (seta) e peroxissomos (estrela). B, D e F – células de Leydig tratadas com Sildenafil 25mg/kg apresentando núcleo (N), gotículas de lipídio (L), lisossomo (seta aberta), mitocôndria dilatada com cristas desarranjadas (M), retículo endoplasmático liso vesicular (SER), círculos concêntricos de retículo endoplasmático liso (estrela branca) com vesículas circundantes (setas brancas), vacúolos dispersos no citoplasma (estrela preta) e Golgi (seta preta). Barras, 1 μm (A, B, C, D); 500 nm (E, F).



**Figura 16.** Secções transversais ultrafinas de células de Leydig isoladas.

**Nota:** (A) Células de Leydig controles não estimuladas com hCG; (B) células de Leydig tratadas com Sildenafil 25mg/kg sem estímulo com hCG; (C) células de Leydig controles estimuladas com hCG; (D) células de Leydig tratadas e estimuladas com hCG. L, gotículas de lipídio; M, mitocôndrias com cristas tubulares; N, núcleo; SER, retículo endoplasmático liso trabecular. Barras, 500 nm.



**Figura 17** Imunocitoquímica para StAR, P450<sub>sc</sub> e testosterona.

**Nota:** A, C e E – fraca marcação para StAR (A), P450<sub>sc</sub> (C) e Testosterona (E) foi observada em células de Leydig controles (setas); B, D e F – Marcação aumentada para StAR (B), P450<sub>sc</sub> (D) e Testosterona (F) foi detectada nas células de Leydig após o tratamento com Sildenafil (setas). L, gotículas de lipídio; M, mitocôndrias com cristas tubulares; N, núcleo; SER, retículo endoplasmático liso; V, vacúolo. Barras, 200 nm.

**Tabela 1** Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em células de Leydig controles e tratadas com Sildenafil 25mg/kg. por um mês.

NÚMERO DE PARTÍCULAS MARCADAS COM OURO						
	StAR		P450 <sub>scc</sub>		Testosterona	
	Controle	Sildenafil (25mg/Kg)	Controle	Sildenafil (25mg/Kg)	Controle	Sildenafil (25mg/Kg)
Mitocôndria	1±1.333	4.9±4.581	3.1±1.449	9.8±4.341*	0.3±0.675	2.6±2.875
SER	0	3.6±4.971	0.8±1.317	2.8±1.989	0.6±0.699	4.1±2.767
Gotículas de lipídio	0	3±5.621	0	0	0	1.333±1.506
Vacúolos	0.222±0.441	0.3±0.675	0.143±0.378	0.5±0.926	0.143±0.378	3.889±8.373
Contagem total	1.2±1.317	10.6±10.426*	4±2.108	13±4.163*	1±1.054	11±6.092*

**Nota:** Mudanças significativas foram encontradas nas células tratadas (\*Kruskal-Wallis,  $p < 0.01$ ). Média de partículas marcadas com ouro (média ± D.P.); n = 10.

**Tabela 2** Efeito do tratamento com Sildenafil durante um mês sobre os níveis de testosterona no soro (ng/mL).

<b>NÍVEIS DE TESTOSTERONA NO SORO (ng/mL)</b>						
	N	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	Mann-Whitney
Controle	16	0.39	0.13	1.60	0.36	
Sildenafil (25mg/Kg)	17	4.84	0.17	14.00	5.14	Z = 3.26

**Nota:** Diferença significativa entre as amostras controle e tratada (Mann-Whitney,  $p < 0.01$ ).

## 7.2 Ensaio experimental de dois meses

### 7.2.1 Análise de células de Leydig por microscopia óptica

Nenhuma alteração significativa foi observada na histologia das células de Leydig (Figura 18: A e B). Entretanto, as células do grupo tratado com Sildenafil apresentaram uma área maior, quando comparada às controles (Mann-Whitney,  $p = 0,0985$ ; Média  $\pm$  D.P.: controles  $134,81 \mu\text{m}^2 \pm 40,39$ ; tratadas  $140,96 \mu\text{m}^2 \pm 32,42$ ).

### 7.2.2 Ultra-estrutura de células de Leydig e espermatozóides

As características ultra-estruturais das células de Leydig testiculares dos animais controles são similares às descritas no item 7.1.2 (Figura 19: A e B). Após o tratamento com Sildenafil 25mg/kg durante dois meses, as células de Leydig, aparentemente, apresentaram-se hipertrofiadas com abundante REL pouco vesicular, mitocôndrias com cristas tubulares, inúmeros círculos concêntricos de REL, e consumo das reservas lipídicas, possivelmente, relacionado com a produção hormonal (Figura 19: C, D, E e F).

Os espermatozóides do grupo controle apresentaram membrana plasmática com aparência ondulada em todo o comprimento do núcleo, acrossoma e peça intermediária. O balonismo da membrana pode ser atribuído aos artefatos provocados pelo processo de fixação. O acrossoma apresentou-se como uma estrutura densa e de matrix homogênea, ligado por uma unidade de membrana. A membrana acrossomal externa, detectada próxima à membrana plasmática, estava contínua com a membrana acrossomal interna. Separando o acrossoma do núcleo foi observado o espaço subacrossomal (Figura 20: A, C e E). A bainha mitocondrial estava arranjada em um padrão helicoidal em torno do centríolo distal e da porção basal do complexo axonemal. O centríolo distal pode ser descrito como um corpo basal que, no final da cauda, apresenta-se como nove pares centrais de microtúbulos periféricos. O par central de microtúbulos tornou-se aparente na margem distal desta estrutura (dados não mostrados). Os espermatozóides do grupo tratado com Sildenafil apresentaram as mesmas características

descritas acima, mas as mitocôndrias da peça intermediária estavam vacuolizadas (Figura 20: B, D e F).

### 7.2.3 Imunocitoquímica para StAR, P450<sub>scc</sub>, testosterona, anti-guanilato ciclase $\beta$ 1 solúvel, subunidade catalítica da proteína quinase dependente de AMPc e proteína quinase tipo I dependente de GMPc

Nas células de Leydig, a imunocitoquímica revelou aumento significativo de marcação para P450<sub>scc</sub>, guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG nas células tratadas com Sildenafil, entretanto nenhuma diferença significativa de marcação foi observada entre os grupos, tratado e controle, para StAR (Figura 21 e Tabela 3).

Nos espermatozoides foram analisados cabeça e peça intermediária. Para guanilato ciclase solúvel não houve diferença significativa de marcação entre os grupos, tratado e controle, na peça intermediária, mas a marcação estava significativamente diminuída na cabeça das amostras tratadas com Sildenafil. A imunocitoquímica para PKA demonstrou diminuição significativa de marcação nas amostras tratadas. Não houve mudança significativa na marcação para PKG entre as amostras tratadas e controles (Figura 22 e Tabela 4).

### 7.2.4 Concentração de testosterona no soro

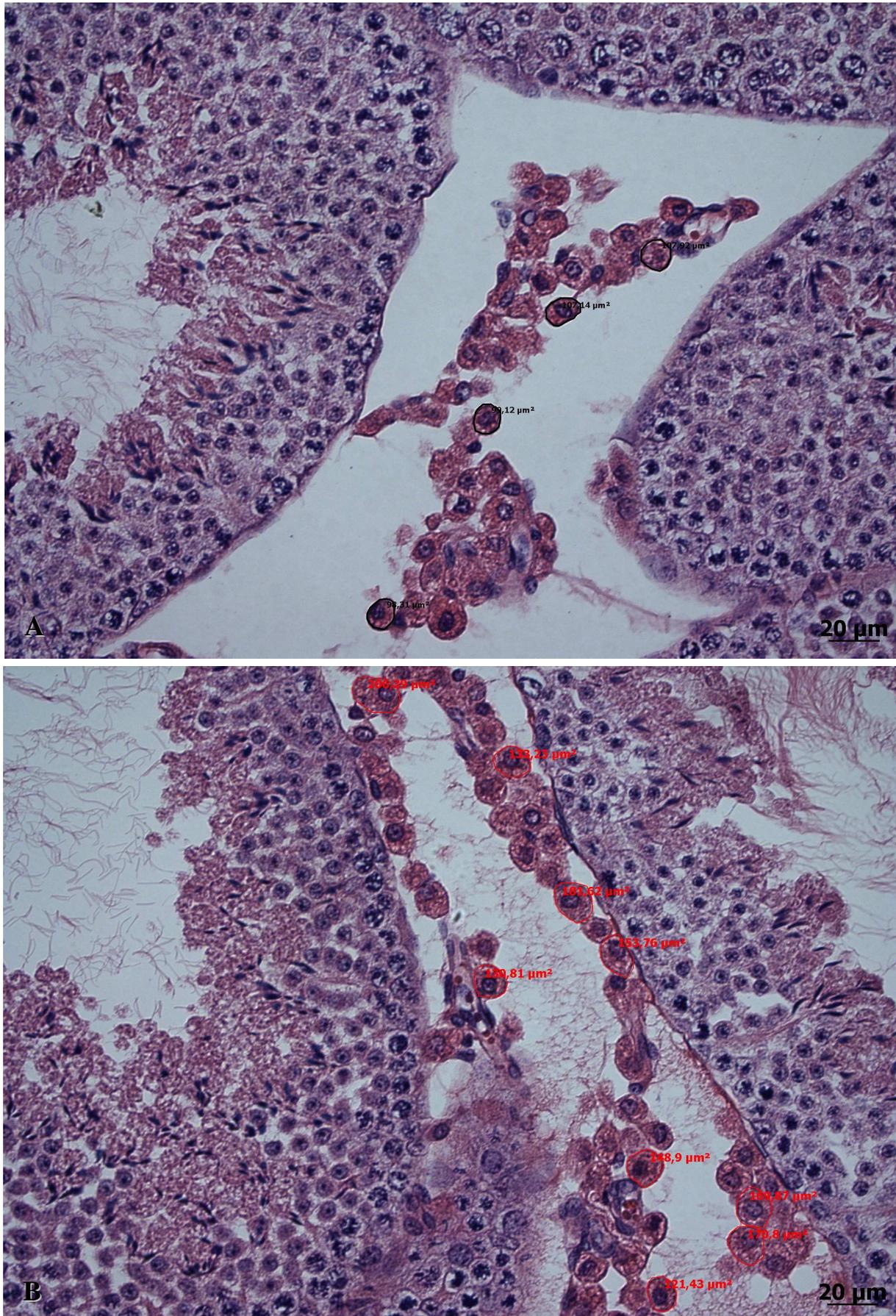
Não houve diferença significativa nos níveis de testosterona no soro entre os grupos (Mann-Whitney,  $p = 0,0864$ ). Os parâmetros dos dois grupos são mostrados na Tabela 5.

### 7.2.5 Avaliação dos parâmetros espermáticos

Não houve mudanças significativas nos parâmetros espermáticos, tais como motilidade, vigor, integridade do acrossoma e DNA, após o tratamento crônico com Sildenafil (Tabela 6, 7 e 8).

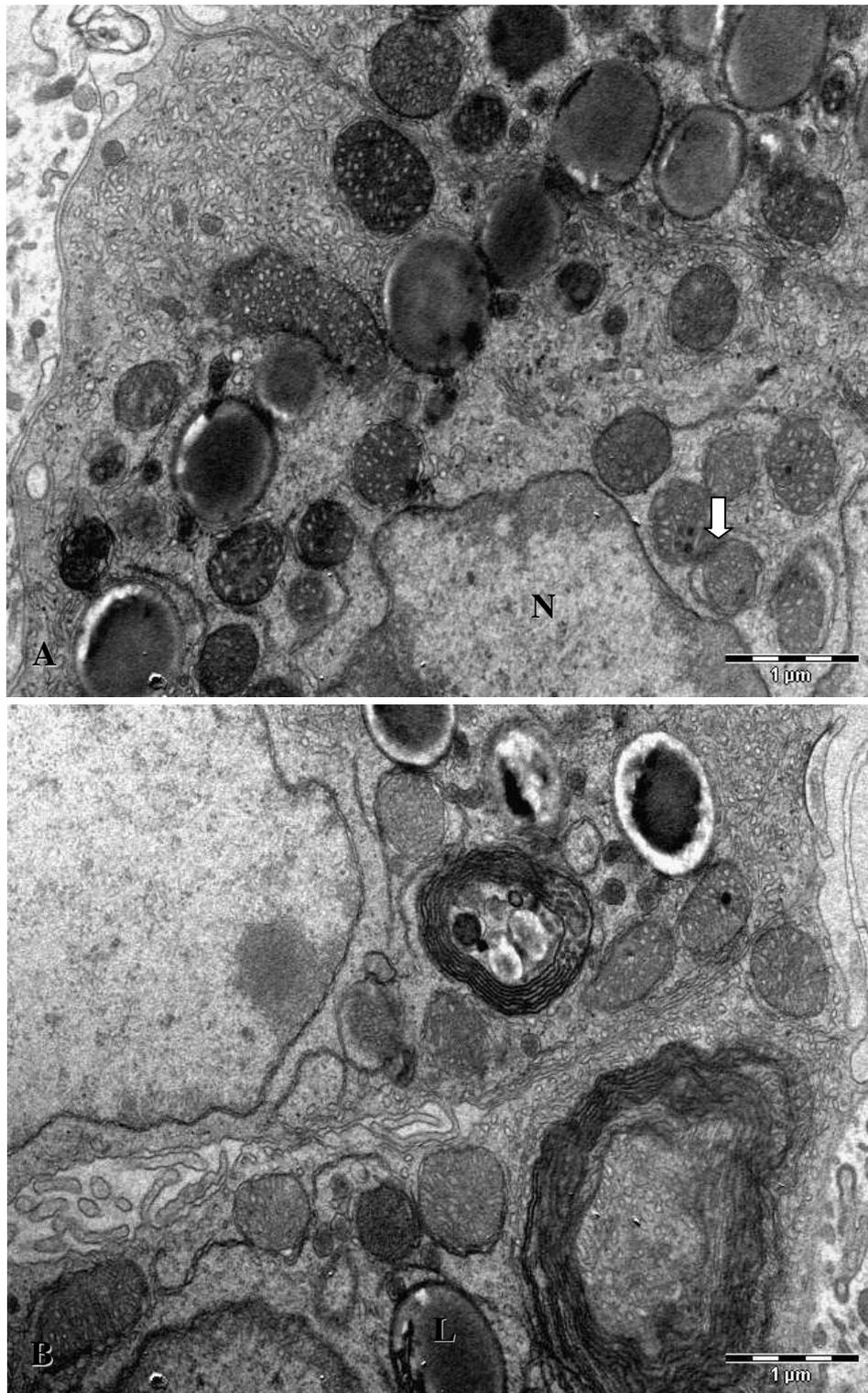
### 7.2.6 Imunoblot das enzimas eNOS, iNOS e nNOS

Como descrito no artigo de Weissman et al. (2005), as células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG não expressaram as três sintases de óxido nítrico, logo não possuem o sistema de produção endógeno deste radical (Figura 23: A, B e C).



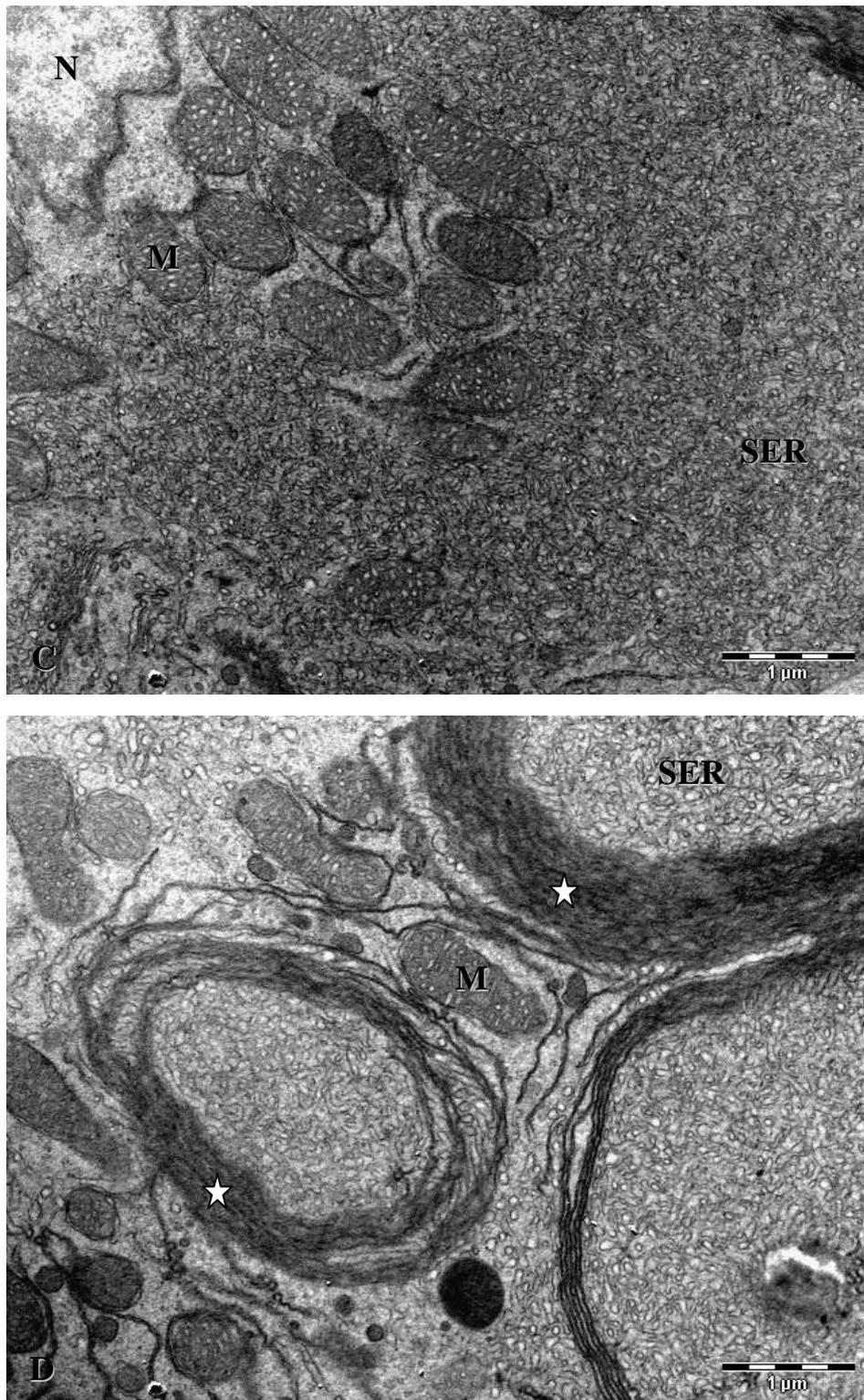
**Figura 18** Microscopia óptica de células de Leydig.

**Nota:** (A) Células de Leydig controles; (B) células de Leydig após o tratamento com Sildenafil. Barras, 20 µm.



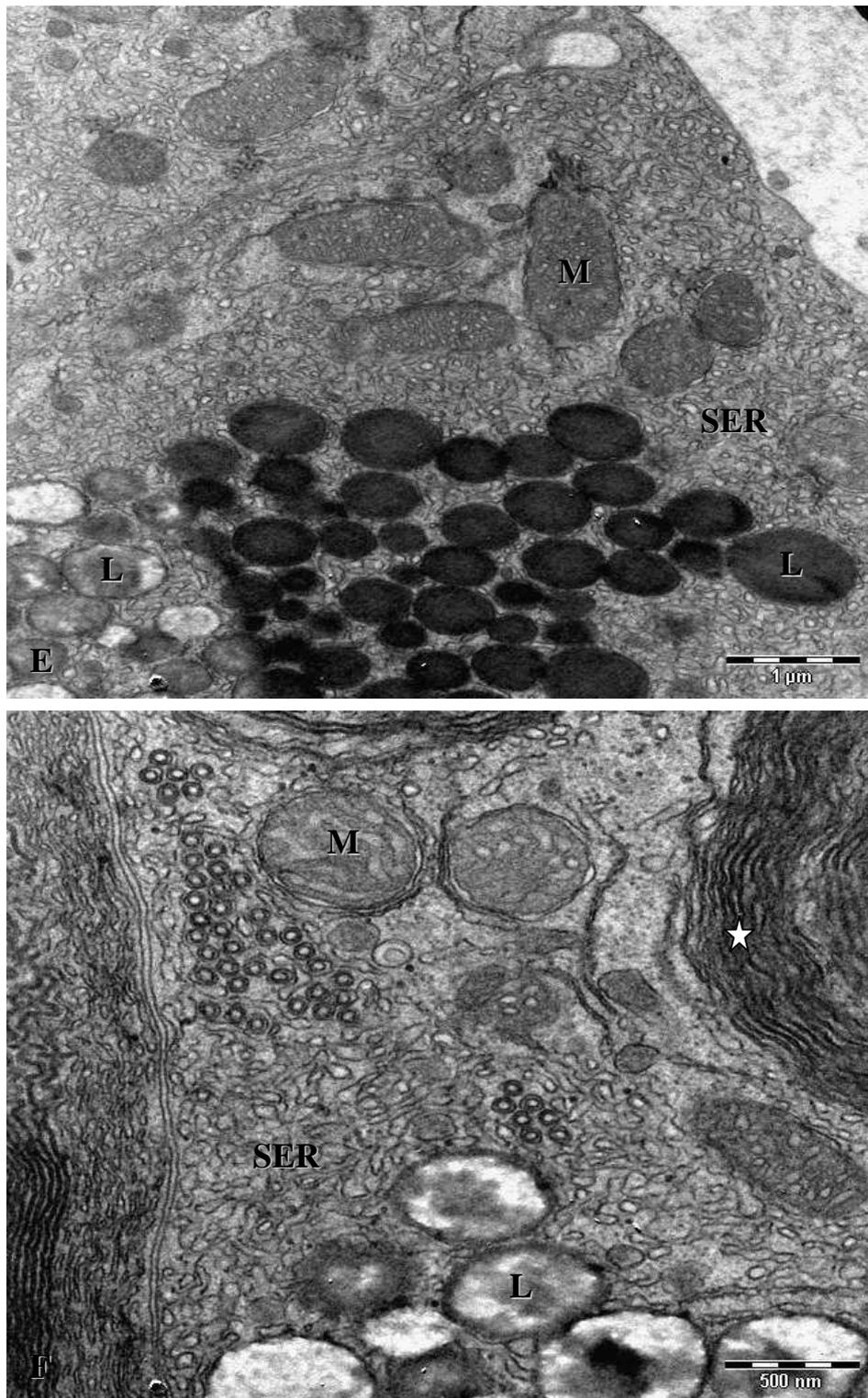
**Figura 19** Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.

**Nota:** A e B – células de Leydig não tratadas mostrando núcleo (N), gotículas de lipídio (L) mitocôndrias com cristas tubulares (M), retículo endoplasmático liso tubular (SER), retículo endoplasmático rugoso escasso (seta branca) e círculos concêntricos de retículo endoplasmático liso (estrela). Barras, 1 µm.



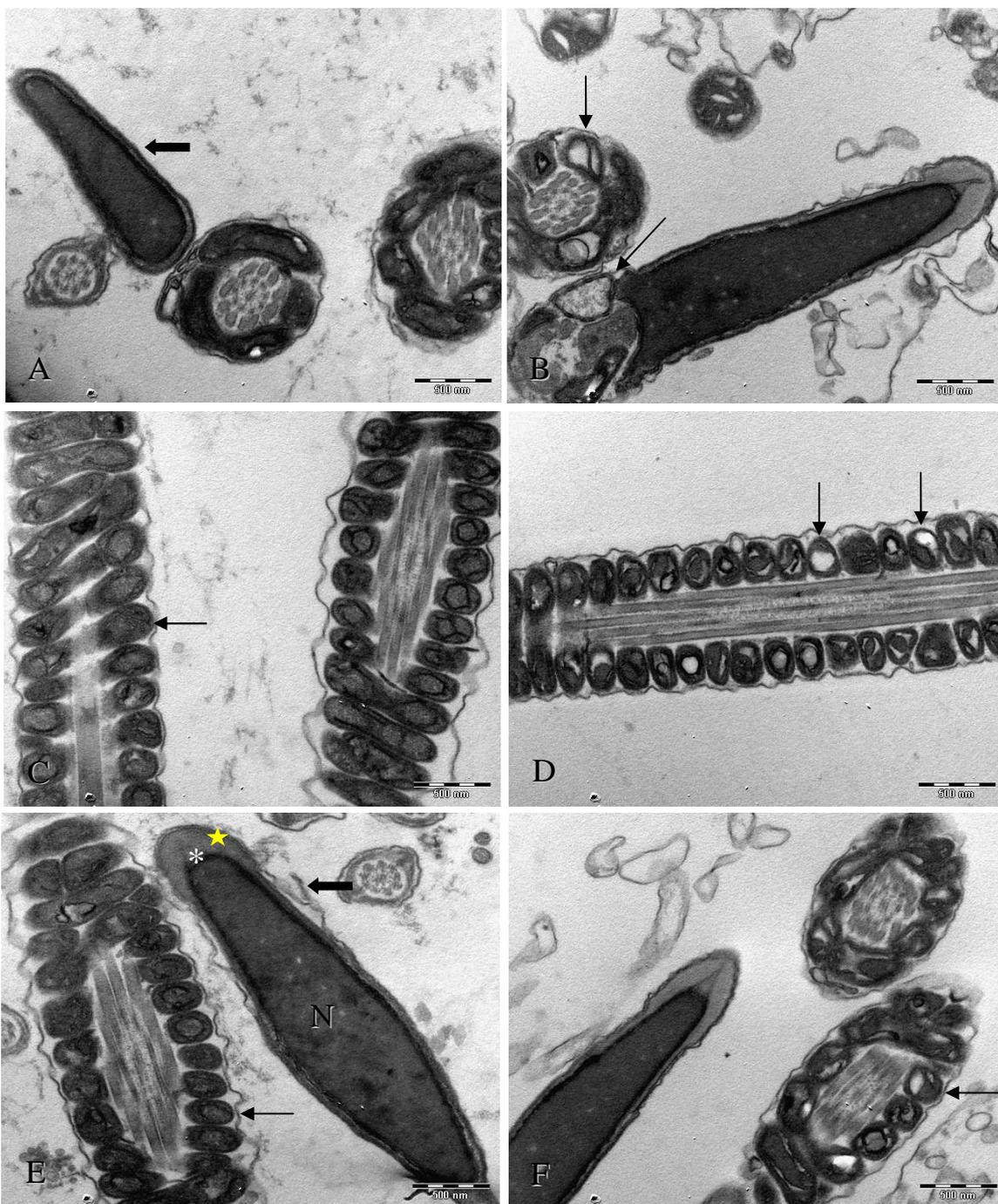
**Figura 19** Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.

**Nota:** C e D – células de Leydig tratadas com Sildenafil 25mg/kg apresentando núcleo (N), gotículas de lipídio (L), mitocôndrias com cristas tubulares (M), abundante retículo endoplasmático liso pouco vesicular (SER), círculos concêntricos de retículo endoplasmático liso (estrela). Barras, 1 µm.



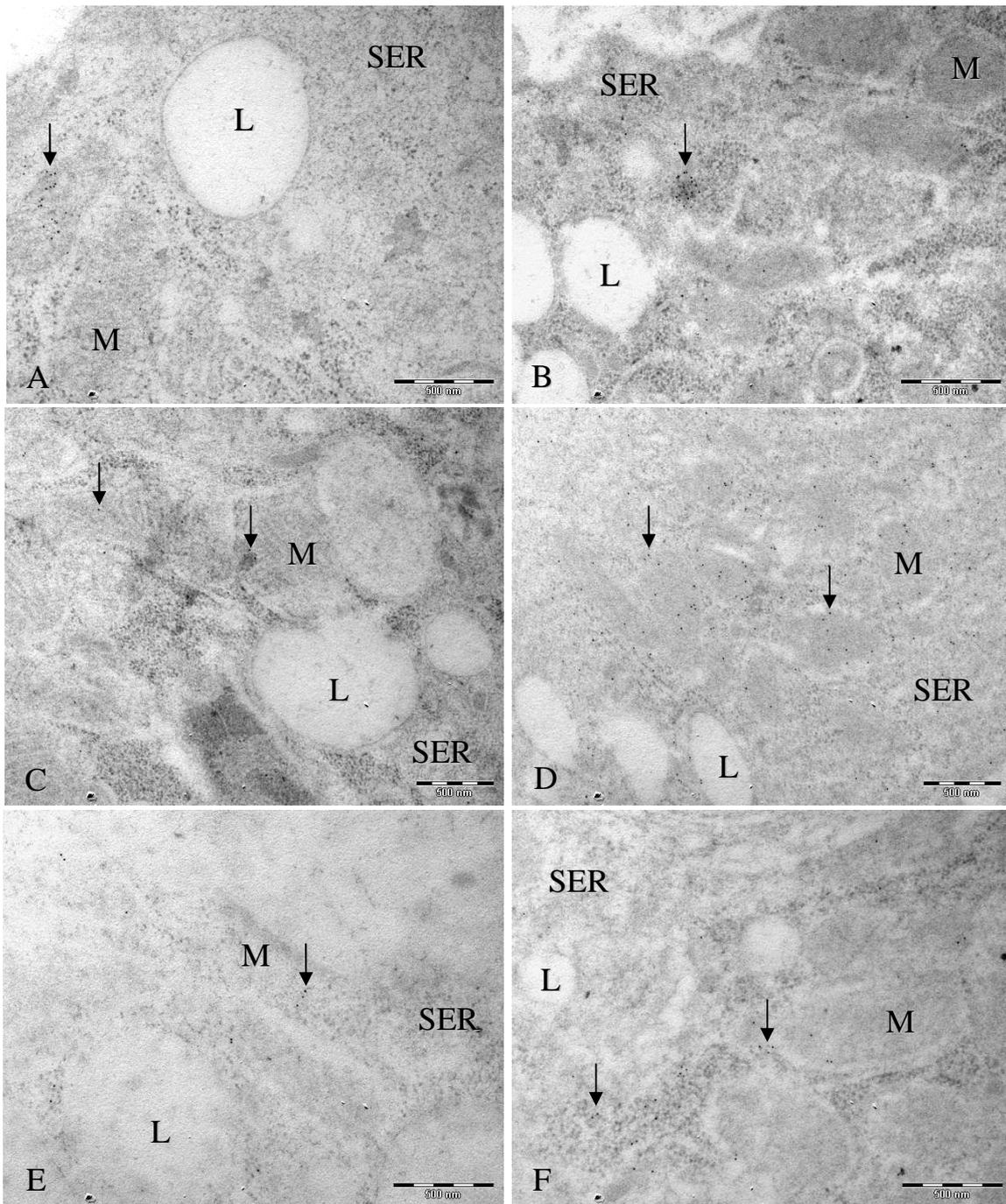
**Figura 19** Secções transversais ultrafinas de células de Leydig dos testículos.

**Nota:** E e F – células de Leydig tratadas com Sildenafil 25mg/kg apresentando núcleo (N), gotículas de lipídio (L), mitocôndrias com cristas tubulares (M), abundante retículo endoplasmático liso pouco vesicular (SER), círculos concêntricos de retículo endoplasmático liso (estrela). Barras, 1 µm (E); 500 nm (F).



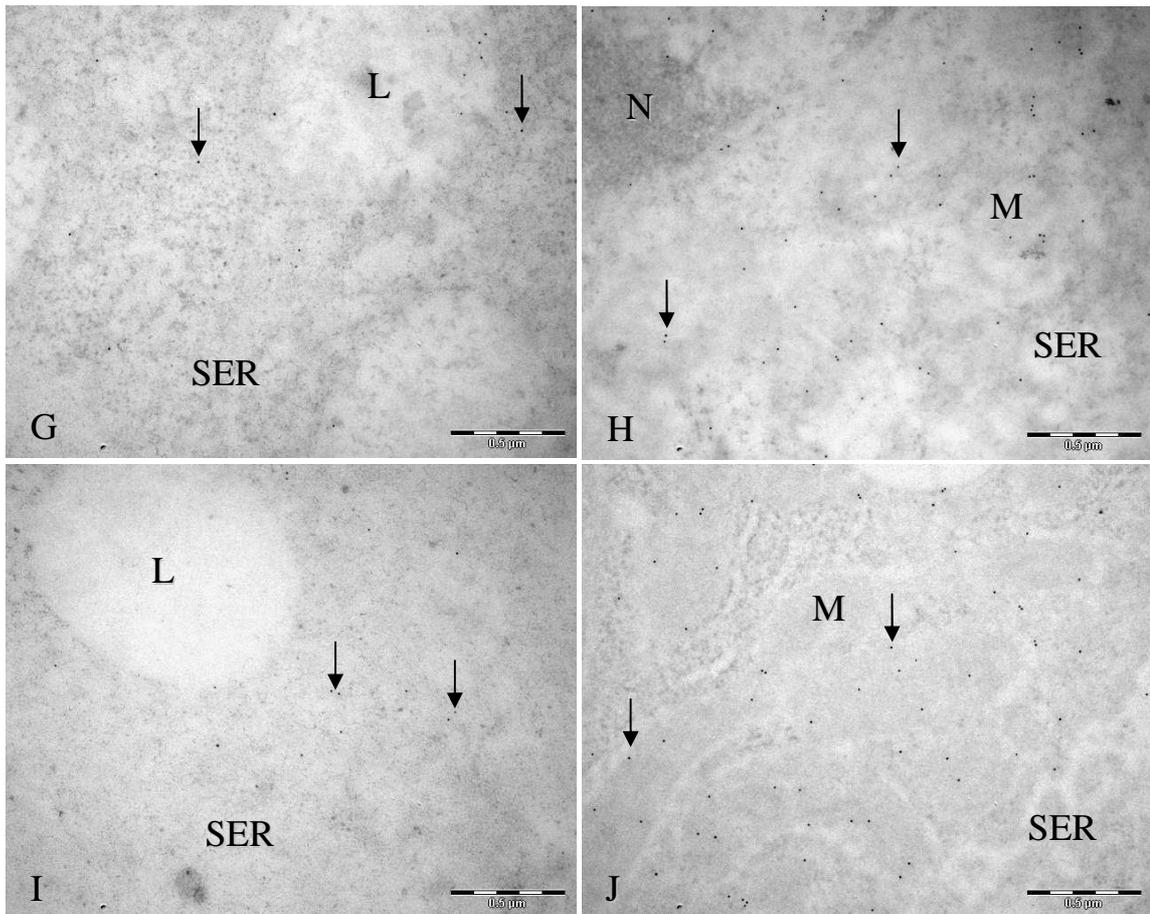
**Figura 20** Secções transversais ultrafinas de espermatozóides.

**Nota:** A, C e E – espermatozóides controles mostrando cabeça, com membrana plasmática (setas espessas), acrossoma (estrela), espaço subacrossomal (asterisco) e núcleo (N); e peça intermediária com mitocôndrias em torno do centríolo e complexo axonemal (setas finas). B, D e F – espermatozóides tratados apresentando mitocôndrias vacuolizadas (setas). Barras, 500 nm.



**Figura 21** Imunocitoquímica para StAR, P450<sub>sc</sub>, guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.

**Nota:** A, C e E são células de Leydig controles. B, D e F são células de Leydig tratadas com Sildenafil. A e B – nenhuma diferença significativa de marcação para StAR (setas); C e D – aumento da marcação para P450<sub>sc</sub> foi detectada nas células tratadas (setas); E e F – aumento da marcação para guanilato ciclase solúvel foi observado nas células tratadas (setas). Barras, 0.5 μm.



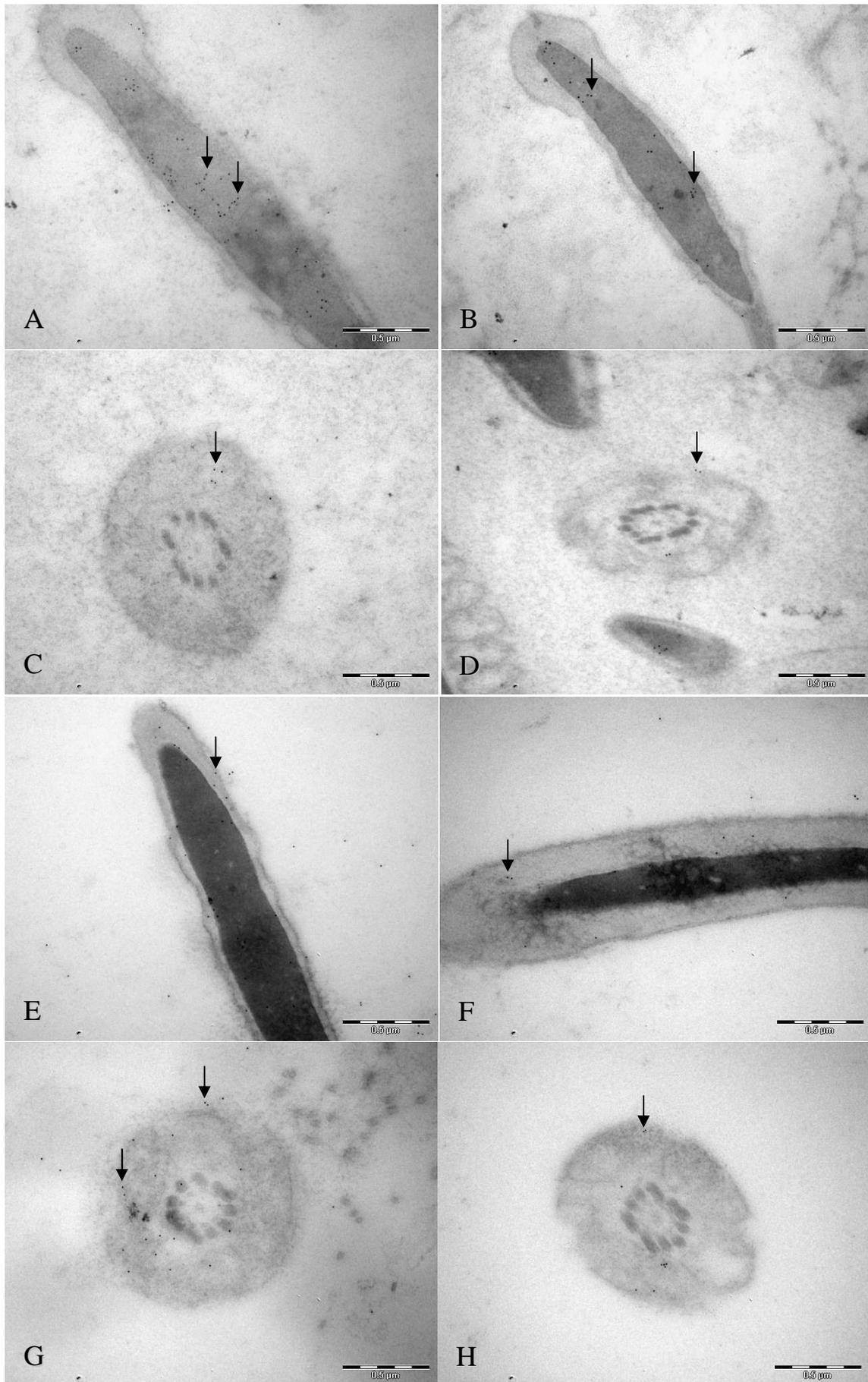
**Figura 21** Imunocitoquímica para StAR, P450<sub>sc</sub>, guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.

**Nota:** Imunocitoquímica para StAR, P450<sub>sc</sub>, guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG. G e I são células de Leydig controles. H e J são células de Leydig tratadas com Sildenafil. G e H – aumento da marcação para PKA foi detectada nas células tratadas (setas); I e J – aumento da marcação para PKG foi detectada nas células tratadas (setas). L, gotículas de lipídio; M, mitocôndrias; N, núcleo; SER, retículo endoplasmático liso. Barras, 0.5 μm.

**Tabela 3** Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em células de Leydig controles e tratadas com Sildenafil 25mg/kg por dois meses.

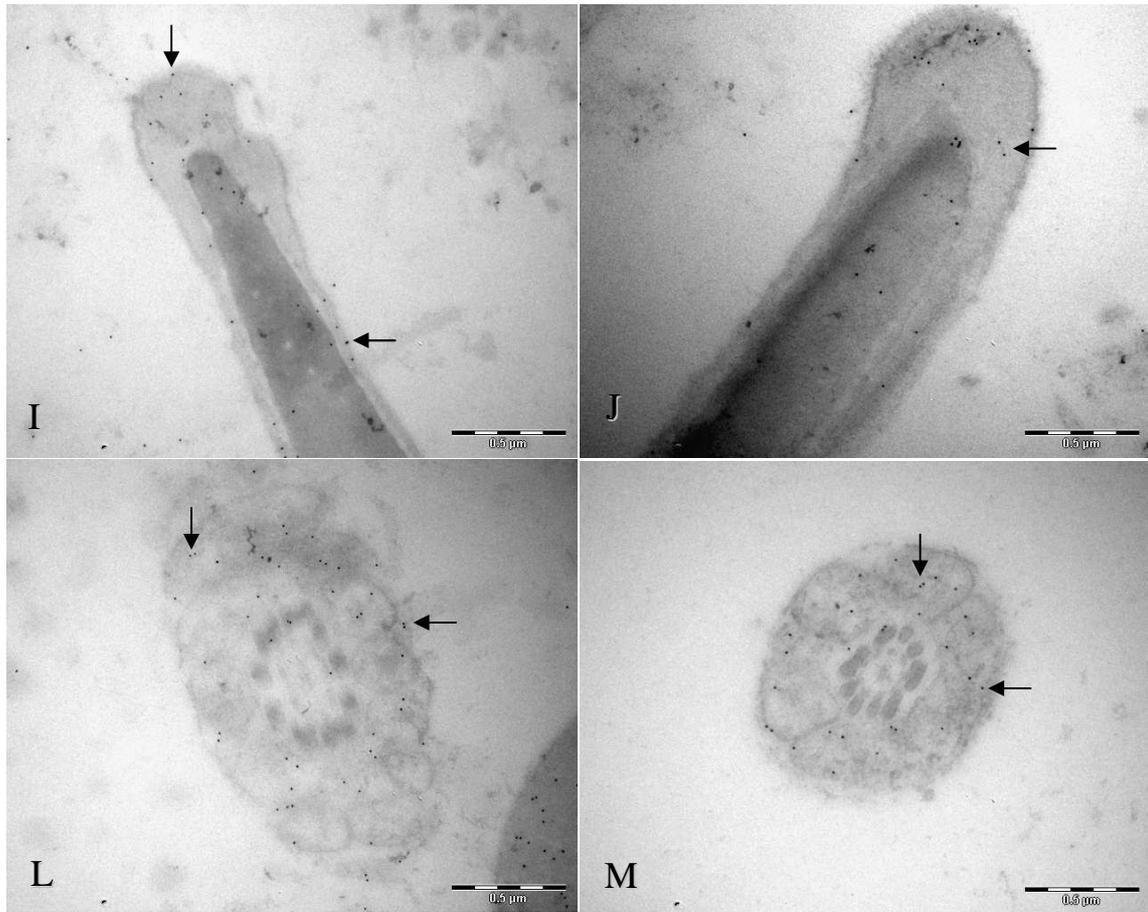
<b>NÚMERO DE PARTÍCULAS MARCADAS COM OURO</b>										
	<b>StAR</b>		<b>P450<sub>sc</sub></b>		<b>GCs</b>		<b>PKA</b>		<b>PKG</b>	
	Controle N=16	Sildenafil (25mg/Kg) N=28	Controle N=17	Sildenafil (25mg/Kg) N=29	Controle N=16	Sildenafil (25mg/Kg) N=19	Controle N=39	Sildenafil (25mg/Kg) N=42	Controle N=36	Sildenafil (25mg/Kg) N=39
<b>Contagem total</b>	16,31±17,11	10,13±5,35	16,05±8,54	36,3±10,30*	4,05±2,46	26,85±8,87*	24,72±10,21	34,27±13,25*	13,05±6,09	44,57±11,21*

**Nota:** Mudanças significativas foram encontradas nas células tratadas para P450<sub>sc</sub> (\*teste t, p<0,0001), GCs (\*Mann-Whitney, p<0,0001), PKA (\*teste t, p = 0,0004) e PKG (Mann-Whitney, p<0,0001). Não houve diferença significativa para a StAR (Mann-Whitney, p = 0,7669). Média de partículas marcadas com ouro (média ± D.P.).



**Figura 22** Imunocitoquímica para guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.

**Nota:** A, C, E e G são espermatozoides controles. B, D, F e H são espermatozoides tratados com Sildenafil. A e B – diminuição significativa de marcação para GCs na cabeça (setas); C e D – nenhuma diferença significativa de marcação para GCs na peça intermediária (setas); E, F, G e H – redução da marcação para PKA foi observada nos espermatozoides tratados (setas). Barras 0.5 µm.



**Figura 22** Imunocitoquímica para guanilato ciclase solúvel, PKA e PKG.

**Nota:** I, J, L e M – nenhuma diferença significativa de marcação para PKG foi detectada (setas). Barras 0.5 μm.

**Tabela 4** Análise quantitativa da distribuição de partículas marcadas com ouro em espermatozóides controles e tratados com Sildenafil 25mg/kg.

<b>NÚMERO DE PARTÍCULAS MARCADAS COM OURO</b>						
	<b>GCs</b>		<b>PKA</b>		<b>PKG</b>	
	Controle N=12 / 14	Sildenafil (25mg/Kg) N=15 / 19	Controle N=11 / 19	Sildenafil (25mg/Kg) N=10 / 33	Controle N=13 / 22	Sildenafil (25mg/Kg) N=9 / 20
<b>Cabeça</b>	58,30±36,23	21,68±14,22*	24,5±10,92	14,9±7,51*	33,57±19,66	26,3±12,43
<b>Peça intermediária</b>	4,6±3,35	3,95±3,11	25,45±11,03	11,44±6,11*	39,43±14,22	44,28±21,93

**Nota:** Mudanças significativas de marcação foram encontradas em espermatozóides tratados para guanilato ciclase solúvel (cabeça - \*Mann-Whitney,  $p = 0,0005$ ) e PKA (peça intermediária - \*Mann-Whitney,  $p < 0,0001$ ; cabeça - (\*teste t,  $p = 0,0241$ ). Nenhuma diferença significativa foi detectada na marcação com PKG. Média de partículas marcadas com ouro (média  $\pm$  D.P.).

**Tabela 5** Efeito do tratamento com Sildenafil durante dois meses sobre os níveis de testosterona no soro (ng/mL).

<b>NÍVEIS DE TESTOSTERONA NO SORO (ng/mL)</b>						
	N	Média	Mínimo	Máximo	D.P.	Mann-Whitney
Controle	10	1.45	0.1	8.75	2.59	
Sildenafil (25mg/Kg)	9	6.69	0.3	27.5	10.11	p = 0,0864

**Nota:** Nenhuma diferença significativa entre as amostras controle e tratada (Mann-Whitney,  $p = 0,0864$ ).

**Tabela 6** Efeito do tratamento com Sildenafil sobre motilidade e vigor de espermatozóides.

ANIMAIS	CONTROLE		SILDENAFIL	
	Motilidade espermática (%)	Vigor	Motilidade espermática (%)	Vigor
N = 10	79	3,9	83	4,4

Motilidade (teste t,  $p = 0,4999$ ); vigor (Mann-Whitney,  $p = 0,5205$ )

**Nota:** Nenhuma diferença significativa entre as amostras controle e tratada (motilidade: teste t,  $p = 0,4999$ ; vigor: Mann-Whitney,  $p = 0,5205$ ).

**Tabela 7** Efeito do tratamento com Sildenafil sobre a integridade do acrossoma de espermatozóides.

<b>% DE ACROSSOMAS ÍNTEGROS</b>		
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sildenafil</b>
N = 10	166,8	160,2

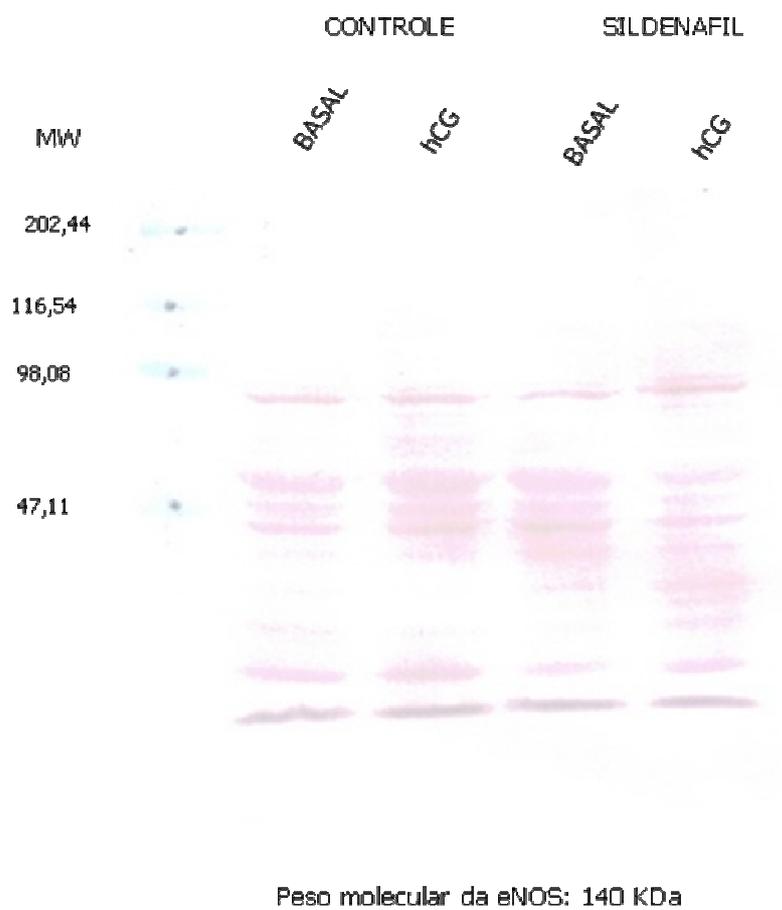
Mann-Whitney,  $p = 0,385$

**Nota:** Nenhuma diferença significativa entre as amostras controle e tratada (Mann-Whitney,  $p = 0,385$ ).

**Tabela 8** Efeito do tratamento com Sildenafil sobre a integridade do DNA de espermatozóides.

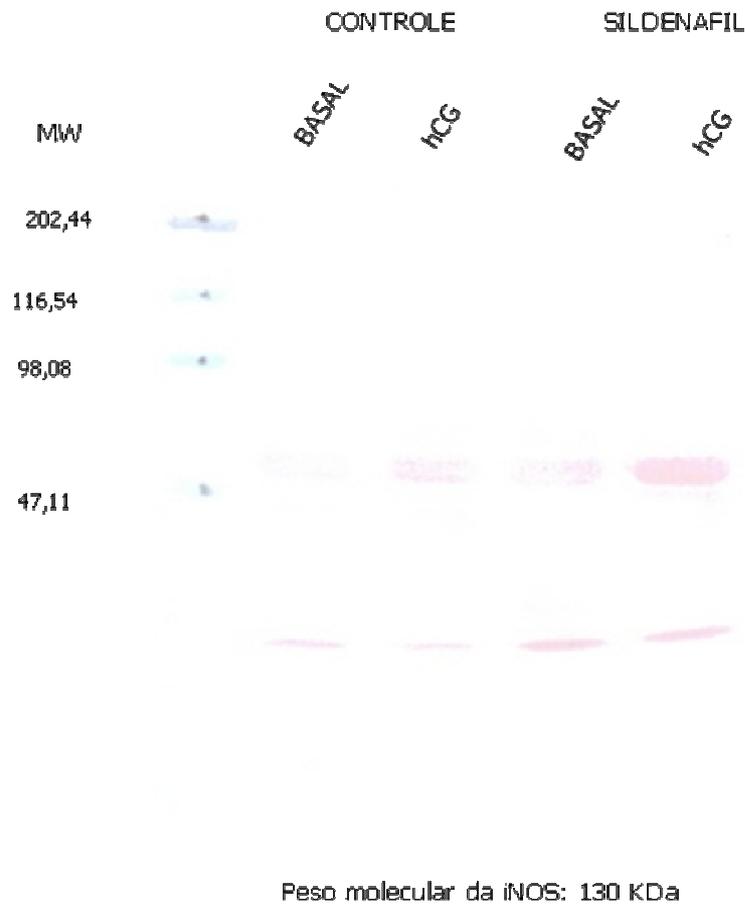
<b>% DE DNA ÍNTEGROS</b>		
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Sildenafil</b>
N = 10	100	99,3

Mann-Whitney,  $p=0,1306$ **Nota:** Nenhuma diferença significativa entre as amostras controle e tratada (Mann-Whitney,  $p = 0,1306$ ).



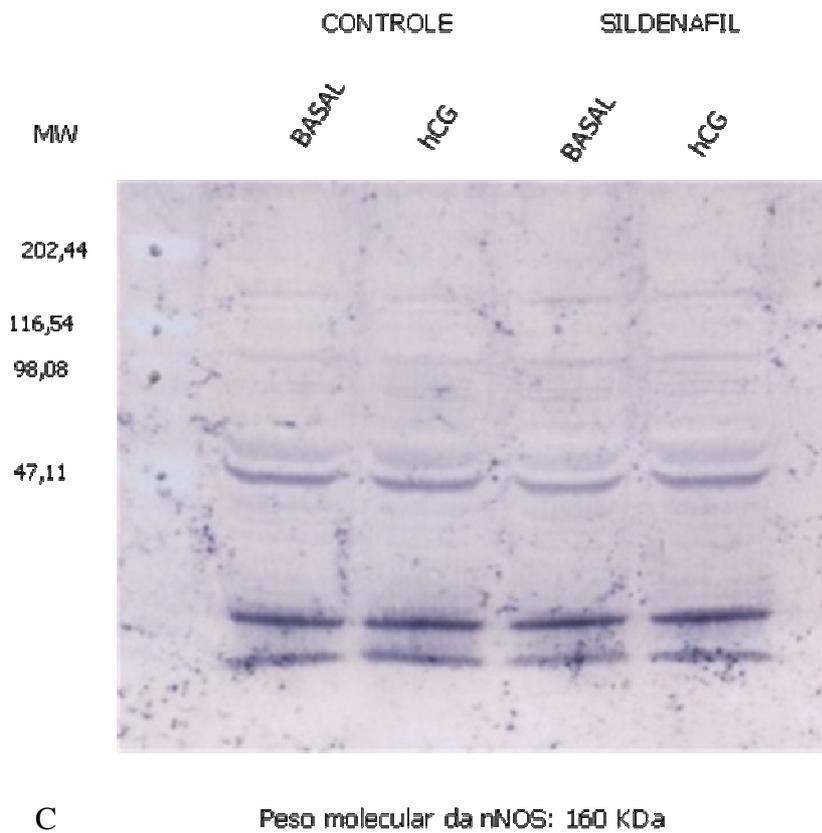
A

**Figura 23** Western blot das sintases de óxido nítrico em células de Leydig.  
**Nota:** Ausência de expressão da eNOS.



B

**Figura 23** Western blot das sintases de óxido nítrico em células de Leydig.  
**Nota:** Ausência de expressão da iNOS.



**Figura 23** Western blot das sintases de óxido nítrico em células de Leydig.  
**Nota:** Ausência de expressão da nNOS.

## 8 DISCUSSÃO

A importância do GMPc na esteroidogênese pode ser demonstrada através do mecanismo de ação do Sildenafil. Particularmente, nos testículos, este nucleotídeo cíclico está envolvido na motilidade de espermatozoides, desenvolvimento das células germinativas testiculares, relaxamento das células da lâmina própria peritubular, produção de testosterona nas células de Leydig e dilatação dos vasos sanguíneos testiculares (MIDDENDORFF et al., 2000).

As células de Leydig, secretoras de esteróides, regulam o desenvolvimento e a atividade do trato reprodutivo masculino e as características sexuais externas, e pode estimular a espermatogênese nos túbulos seminíferos. Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol em um processo enzimático de várias etapas, no qual a StAR transporta o colesterol de armazenamentos celulares para a membrana mitocondrial interna para ser convertido em pregnenolona pela enzima P450<sub>sc</sub>. A pregnenolona é transportada e enzimaticamente convertida em precursores de testosterona no REL antes da síntese de testosterona (CLARK; COCHRUM, 2007; YANG et al., 2007).

Este é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos do tratamento crônico com Sildenafil sobre a esteroidogênese de células de Leydig. Estas células consistem de abundante REL, numerosas mitocôndrias com cristas tubulares e um número variável de gotículas de lipídio, que participam ativamente da biossíntese hormonal.

Após um mês do esquema terapêutico com Sildenafil, as células de Leydig apresentaram REL vesicular, vacúolos espalhados no citoplasma e maior consumo das reservas lipídicas, característicos de uma célula secretora ativa. Segundo Ohata (1979), esses vacúolos são derivados de vesículas de REL contendo testosterona, e que eles poderiam migrar para a superfície celular e abrir-se no espaço extracelular.

A função dos círculos concêntricos de REL continua incerta. Existe a hipótese de que esta organela armazena o colesterol usado na síntese de testosterona (OHATA, 1979). Interessantemente, as células de Leydig tratadas com Sildenafil apresentaram várias vesículas na periferia dos círculos concêntricos de REL, que poderiam estar relacionadas com o transporte dos precursores hormonais.

As células de Leydig isoladas, tanto do grupo controle quanto do tratado, apresentaram características ultra-estruturais similares àquelas células do testículo; entretanto, nas células tratadas o REL mostrou-se com aspecto trabecular. Esta alteração morfológica poderia estar

relacionada com o processo de isolamento, uma vez que o testículo foi digerido em uma solução enzimática, provavelmente afetando a rede de filamentos.

Todas as alterações ultra-estruturais das células de Leydig observadas após um mês de esquema terapêutico poderiam estar relacionadas com o aumento da síntese de testosterona, resultante da inibição da PDE5 e acúmulo de GMPc. Para confirmar esta hipótese, um estudo imunocitoquímico e hormonal foi executado. Os resultados indicaram um aumento de marcação para StAR, P450<sub>scc</sub> e testosterona nas células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG do grupo tratado. Um aumento significativo de testosterona plasmática foi observado no grupo tratado em comparação com o controle.

Interessantemente, após dois meses do esquema terapêutico, as células de Leydig apresentaram sinais de adaptação ao tratamento. Uma exposição prolongada a um estímulo pode reduzir a resposta celular pela alteração da maquinaria de sinalização, fazendo a célula retornar a uma situação desligada (ALBERTS et al., 2004). O REL apresentou-se pouco vesicular e as mitocôndrias com cristas tubulares. Não foi observado diferença significativa de marcação para StAR, uma importante proteína que catalisa o transporte de colesterol para produção de esteróides. Logo, é esperado que o aporte de colesterol para a mitocôndria seja semelhante para os dois grupos, bem como a produção de testosterona, apesar das outras proteínas (P450<sub>scc</sub>, PKA, PKG e GCs) apresentarem imunolocalização aumentada. Além disso, houve uma grande variância nos níveis de testosterona entre os animais do grupo tratado, resultando em dados não significativos, apesar de uma tendência para aumento do nível hormonal.

Os inibidores de PDE5 exercem seus efeitos farmacológicos através da inibição da PDE5, uma enzima responsável pela degradação do GMPc. Níveis elevados deste nucleotídeo cíclico afetam muitas funções intracelulares. O mecanismo de ação destas drogas poderia estar envolvido na ativação da via esteroidogênica e secreção de testosterona, uma vez que a PDE5 foi recentemente identificada nas células de Leydig (SCIPIONI et al., 2005). Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol nas gônadas em resposta aos hormônios pituitários, tal como LH pela via clássica primeiro mensageiro / segundo mensageiro. Para delinear o mecanismo de indução da síntese de testosterona pelo hCG, um estudo foi realizado para investigar mudanças na expressão de 3 $\beta$ -HSD-1, P450<sub>scc</sub> e StAR nas células de Leydig de camundongos, e uma expressão aumentada destas enzimas foi detectada (YANG et al., 2007). No presente trabalho, após o tratamento crônico com Sildenafil durante um mês, células de Leydig isoladas e estimuladas com hCG apresentaram imunolocalização aumentada para StAR, P450<sub>scc</sub> e testosterona. Estes dados indicam que o Sildenafil e o hCG,

possivelmente, atuam sinergicamente para aumentar os níveis de GMPc através de diferentes mecanismos. O hCG aumenta a produção intracelular de GMPc por ativar o sistema da guanilato ciclase (LIN et al., 1979; MUKHOPADHYAY; LEIDEBERGER 1988), e o Sildenafil induz uma acumulação de GMPc por inibir a PDE5, ou por atuar via mecanismo dependente de NO ou ANP (PRESTON et al., 2004).

O GMPc é sintetizado por duas classes de enzimas chamadas guanilato ciclases, e ambas geram GMPc a partir do GTP intracelular. As guanilato ciclases particuladas são receptores de membrana que ligam peptídeos natriuréticos e guanilina. A GCs é um receptor de óxido nítrico, heterodimérico e com grupo prostético heme. Ela consiste de duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , que tornam a enzima ativa. O GMPc atua diretamente com efetores, tal como proteína quinase dependente de GMPc, canais ligados à nucleotídeos cíclicos, e fosfodiesterases reguladas por GMPc (KRUMENACKER; MURAD, 2006; WONG; GARBERS, 1992).

Andric et al. (2007) descreveram que a estimulação de ambas guanilatos ciclases e inibição da PDE5 *in vitro* foram acompanhadas pela elevação de GMPc e produção de androgênio. Entretanto, a inibição da GCs e PKG reduziu significativamente a fosforilação da StAR, levando à redução da esteroidogênese. Desta forma, os autores sugerem que o GMPc participa da esteroidogênese das células de Leydig via fosforilação da StAR pela PKG. O presente trabalho demonstrou, através da técnica de imunocitoquímica, um aumento da expressão das proteínas quinases PKA e PKG nas células de Leydig após o tratamento com Sildenafil, que poderia estar relacionado com a fosforilação de proteínas da via esteroidogênica. Além disso, o aumento de marcação para GCs nestas células, possivelmente, indica uma maior formação de GMPc.

Um estudo investigou os efeitos do 4 $\beta$ -PMA, um potente ativador da PKC, sobre a produção de testosterona e acúmulo de GMPc, induzidos por peptídeo natriurético atrial, em células de Leydig. Este composto inibiu a produção de testosterona e reduziu os níveis de GMPc através do aumento da atividade de fosfodiesterases, estimulada pela PKC. A produção de testosterona e formação de GMPc foi completamente revertida na presença de um inibidor de fosfodiesterases. A causa da produção hormonal diminuída após o tratamento com 4 $\beta$ -PMA estava relacionada com a redução do acúmulo do segundo mensageiro (MUKHOPADHYAY; LEIDEBERGER, 1988).

Similarmente, o presente trabalho mostrou que o tratamento crônico com Sildenafil aumentou a biossíntese de testosterona nas células de Leydig, provavelmente através da acumulação de GMPc pela inibição da PDE5.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com Carosa et al. (2004). Homens que sofrem de disfunção erétil possuem níveis de androgênio significativamente menores que aqueles normais. Esses autores demonstraram os efeitos do tratamento com dois tipos diferentes de inibidores de PDE5, Sildenafil (50mg) e Tadalafil (20mg), sobre a reversibilidade da redução de testosterona. Esta terapia farmacológica aumentou os níveis de testosterona e reduziu os de LH, provavelmente devido à maior frequência de intercuro sexual. Entretanto, os autores não descartaram a possibilidade do efeito direto dos inibidores de PDE5 sobre os testículos, uma vez que este tecido expressa altos níveis de PDE5.

Os mecanismos celulares subjacentes à ação do ANP são decorrentes da ativação da guanilato ciclase de membrana e inibição da adenilato ciclase, levando ao aumento de GMPc intracelular e diminuição de AMPc na bexiga, glândula adrenal e células musculares lisas vasculares. Os testículos possuem alta reatividade de estimulação da guanilato ciclase pelo ANP, e foi observado que este estimula a resposta esteroidogênica de células de Leydig de camundongos em cultura, via receptor GC-A, e aumenta a formação de GMPc em mais de 1500 vezes. A administração crônica de ANP causa hipertrofia de células de Leydig devido ao aumento do volume de todas as organelas envolvidas na síntese de colesterol e testosterona (mitocôndrias, REL e peroxissomos), sugerindo que o ANP é capaz de estimular a esteroidogênese (MOURDJEVA et al., 2001). Estes dados estão de acordo com os resultados do presente estudo, onde foi observado hipertrofia celular e de organelas, logo este peptídeo também poderia estar envolvido nesta ação.

Khurana e Pandey (1993) demonstraram que o fator natriurético atrial, o peptídeo natriurético cerebral e o peptídeo natriurético tipo C, induzem a produção dos precursores intermediários da biossíntese de testosterona em células de Leydig purificadas. Todos esses peptídeos natriuréticos estimulam a via esteroidogênica através do mecanismo de transdução de sinal transmembrana envolvendo a geração e acúmulo de GMPc intracelular. Este efeito estimulatório é iniciado na primeira etapa de conversão do colesterol em pregnenolona.

Os efeitos vasodilatadores pulmonares do Sildenafil na hipertensão pulmonar aguda e crônica induzida por hipóxia em ratos são potencializados pelo ANP, possivelmente por um efeito sinérgico para o aumento da síntese de GMPc (PRESTON et al., 2004). Similarmente, o ANP poderia estar envolvido na síntese de GMPc nas células de Leydig, o qual também se acumularia em resposta ao tratamento com Sildenafil. Por outro lado, o NO exerce um efeito inibitório na esteroidogênese das células de Leydig, que não é mediado pela GCs (DEL PUNTA et al., 1996). De acordo com Middendorff et al. (1997), o NO e o CNP influenciam a liberação de testosterona. Enquanto o CNP estimularia a produção de

testosterona via ativação da PKA pelo GMPc em camundongos, a diminuição dos níveis de testosterona foi detectada em resposta ao NO, uma vez que este agente poderia inibir a enzima P450<sub>scc</sub> pela ligação direta ao ferro heme.

Foi demonstrado que doadores de NO aumentam a secreção de testosterona e GMPc quando usados em baixa concentração ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M); entretanto eles inibem a síntese de testosterona, mas não afetam o GMPc, em altas concentrações ( $> 10^{-5}$  M) (VALENTI et al., 1999). Provavelmente, o Sildenafil não aumenta a produção de NO, visto que o tratamento crônico com esta droga estimulou a esteroidogênese de células de Leydig.

As células de Leydig do testículo humano apresentam os componentes essenciais da via NO/GMPc (nNOS, GCs, GMPc, os aminoácidos glutamato e aspartato, e a proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina) (DAVIDOFF et al., 1995). Por outro lado, as células de Leydig de ratos são desprovidas da via L-arginina/NO (WEISSMAN et al., 2005); como observado no presente estudo a ausência da expressão das sintases de NO em células de Leydig de camundongos.

Estudos posteriores serão necessários para observar os efeitos do Sildenafil sobre a  $[Ca^{2+}]_i$ , um importante mediador da esteroidogênese das células de Leydig. Vários fatores influenciam a produção de androgênios pelas células de Leydig, estimulando um aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular: O LHRH exerce efeitos estimulatórios sobre a esteroidogênese basal de ratos pela ativação da PLC e mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular pelo  $IP_3$ ; a ativação de receptores de endotelina-1 promove um aumento na produção de testosterona via envolvimento de  $Ca^{2+}$ ; o ATP extracelular estimula a síntese de testosterona pelas células de Leydig de ratos através da ativação de receptores purinérgicos-P2 específicos ligados ao aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ ; o ANP estimula a produção de testosterona via mecanismo envolvendo a formação de GMPc e captura de íons  $Ca^{2+}$  do meio externo. Existe também a possibilidade do envolvimento dos nucleotídeos guanina e adenina, moléculas mensageiras, na abertura de canais de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática ou ativação de uma cascata de eventos que levam a este efeito (ROSSATO et al., 2001).

É bem estabelecido, em outras células esteroidogênicas, que o mecanismo de estímulo-secreção requer o aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  para ativar o metabolismo mitocondrial. Em particular, um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  ativa a proteína StAR facilitando o transporte de colesterol para a mitocôndria. O  $Ca^{2+}$  é também transportado para dentro da mitocôndria aumentando a síntese de NADH e NADPH. Este último é requerido pela P450<sub>scc</sub> para a clivagem do colesterol em pregnenolona. Neste contexto, o aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  exerce dois efeitos estimulatórios na produção de esteróides: agindo sobre a oferta do principal substrato para a

síntese de testosterona; e modificando o estado redox da mitocôndria (COSTA; VARANDA, 2007).

O mixotiazol (MYX) é um composto conhecido por afetar a cadeia de transporte de elétrons de mitocôndrias, inibindo a produção de testosterona mediada por LH nas células de Leydig. Adicionalmente, o MYX significativamente estimulou a esteroidogênese basal dessas células. Existe evidência de que o PBR e a proteína StAR funcionam coordenadamente neste processo, com a StAR atuando como iniciador do transporte de colesterol e o PBR como um portão para a entrada do colesterol na mitocôndria. A possível explicação para a esteroidogênese mediada por MYX se dá através da estimulação da atividade do PBR na membrana mitocondrial. Além disso, o cálcio também está envolvido na síntese de testosterona mediada por MYX, uma vez que a mitocôndria é capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  e regular seus níveis intracelulares. Logo, a inibição do metabolismo mitocondrial estimulou a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  desta organela, que resultou no aumento dos níveis intracelulares deste íon e da produção de testosterona (MIDZAK et al., 2007).

Foi demonstrado que os androgênios exercem efeitos vasodilatadores diretos em artérias de humanos e animais experimentais. Oka et al. (2007) descreveram que dehidroepiandrosterona, um precursor da testosterona, bloqueou completamente a vasoconstrição da hipóxia pulmonar, que foi acompanhada pela abertura dos canais de  $\text{K}^+$ , aumento da expressão e atividade da GCs e melhoria da resposta vasodilatadora da artéria pulmonar ao NO.

Em adição, Seyrek et al. (2007) recentemente demonstraram que concentrações suprafisiológicas de testosterona atuam via abertura de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis à ATP para induzir relaxamento da artéria radial *in vitro*.

Portanto, o presente estudo não descarta a possibilidade do envolvimento da biossíntese aumentada de hormônios esteróides, após o tratamento crônico com Sildenafil, na melhoria dos sintomas da hipertensão pulmonar.

A partir dos 40 anos, os níveis de testosterona diminuem continuamente, e promovem sintomas de diminuição de libido, disfunção erétil, osteoporose, distribuição de gordura corporal alterada, diminuição da força física e alterações de comportamento. Antes de qualquer terapia de substituição hormonal, é essencial excluir o câncer de próstata, pois seu progresso depende, positivamente, das concentrações de androgênios (KAMINSKY; SPERLING, 2010). Níveis aumentados de testosterona estimulam o desenvolvimento do tumor na próstata.

O volume do ejaculado e as concentrações espermáticas estão positivamente associadas com o volume testicular e concentrações de testosterona no soro, sugerindo uma participação funcional da testosterona na espermatogênese normal. A privação deste hormônio impede a divisão meiótica de espermatócitos primários em espermátides, encerrando a produção espermática. Níveis elevados de testosterona circulante é um pré-requisito para a espermatogênese e produção de espermatozóides morfolologicamente normais e funcionalmente intactos (MINTER; DeLIBERTO, 2008).

O mecanismo pelo qual os inibidores de PDE exercem seus efeitos farmacológicos é pela inibição da fosfodiesterase, enzima responsável pela hidrólise dos nucleotídeos cíclicos, criando um meio rico em substratos energéticos. Níveis aumentados de GMPc afetam muitas funções intracelulares, incluindo o transporte de cálcio. Concentrações de cálcio alteradas afetam a motilidade espermática, e o influxo deste íon na célula é responsável pela inicialização da reação de acrossoma. Uma função adicional do GMPc é atuar como segundo mensageiro para o NO e inibidores de PDE, capazes de aumentar a produção do radical. O NO mantém a motilidade espermática, mas é benéfico apenas em concentrações cuidadosamente reguladas. Este gás é uma potente espécie reativa de oxigênio que interage com ânions superóxido para formar radicais hidroxiperoxil ou peroxinitrito, que formará o radical hidroxil; todos eles são prejudiciais aos espermatozóides. Desta forma, o Sildenafil tem o potencial de alterar a função espermática através de efeitos *in vivo* sobre as concentrações de NO, cujos efeitos benéficos deste radical em concentrações nanomolares tornam-se altamente nocivos em concentrações milimolares (GLENN et al., 2007).

Glenn et al. (2009) demonstraram que o tratamento agudo com Sildenafil pode influenciar a taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário prematuro, através de sua ação sobre os espermatozóides. Dados anteriores demonstraram um aumento na motilidade e reação de acrossoma antecipada após tratamento com Sildenafil. Por outro lado, Du Plessis, Jongh e Franken (2004) não observaram efeitos do Sildenafil sobre a motilidade, velocidade, amplitude lateral da cabeça, frequência de batimento e linearidade de espermatozóides. O presente trabalho também demonstrou ausência de efeitos do Sildenafil sobre os parâmetros espermáticos.

As sintases de NO e duas isoformas distintas de PDE (PDE1 e PDE4) estão presentes nas células espermáticas de humanos. O Sildenafil é um inibidor potente para PDE5, mas esta droga também possui efeitos inibitórios menores sobre as atividades da PDE6 e PDE1 ( $IC_{50} = 0.034$  e  $0.28\mu\text{mol/L}$ , respectivamente). Estudos imunocitoquímicos demonstraram que diferentes tipos de PDEs estão localizados em diferentes regiões do espermatozóide; a PDE4

localiza-se principalmente na peça intermediária, enquanto a PDE1 é mais intensa na cabeça. Esta localização diferenciada das PDEs no espermatozóide permite a modulação seletiva da função espermática pela regulação de diferentes *pools* de AMPc e ativação da PKA (Du PLESSIS; JONGH; FRANKEN, 2004).

Nenhuma mudança significativa foi observada nos parâmetros de motilidade, vigor, integridade de acrossoma e DNA dos espermatozoides após o tratamento crônico com Sildenafil, apesar de uma tendência de aumento na motilidade e vigor, e uma diminuição na integridade do acrossoma e DNA. Por outro lado, as mitocôndrias apresentaram-se vacuolizadas. Adicionalmente, a imunolocalização da GCs e PKA nos espermatozoides mostrou-se diminuída após o tratamento. Nenhuma alteração de marcação foi observada para a PKG.

Acreditava-se que os leucócitos seminais eram as únicas fontes das espécies reativas de oxigênio (ROS) no ejaculado, mas hoje é bem estabelecido que os espermatozoides são, também, responsáveis pela produção de ROS. Os gametas masculinos têm numerosas estratégias antioxidantes para protegê-los contra os danos das ROS, tais como as enzimas manganês superóxido desmutase (SOD), catalase, o sistema glutathiona peroxidase/ redutase, e substâncias não enzimáticas (ácido ascóbio, glutathiona e  $\alpha$ -tocoferol, entre outras). Níveis baixos e regulados das ROS participam da capacitação, aquisição da motilidade hiperativada, reação de acrossoma e interação com o ovócito. Quando o equilíbrio fisiológico entre a produção e supressão das ROS é perturbado, a função do espermatozóide pode ser comprometida e o estresse oxidativo promove a infertilidade masculina. Níveis aumentados de ROS estão associados com a lipoperoxidação do espermatozóide, diminuição da motilidade, fragmentação do DNA e aumento do processo de apoptose. Recentemente, foi proposto que as mitocôndrias são os principais contribuintes para o estresse oxidativo (RAMALHO-SANTOS et al., 2009).

A principal fonte de formação de ROS em células somáticas envolve a perda de elétrons da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias durante a respiração celular, com uma estimativa de 2% do oxigênio consumido sendo convertido em ânion superóxido. Usualmente, esta atividade é balanceada por fatores antioxidantes no espaço intramembrana e matriz mitocondrial. Entretanto, a produção de ROS pelas mitocôndrias pode suprimir os mecanismos de defesa criando uma fonte de estresse oxidativo, implicado em numerosas condições patológicas (KOPPERS et al., 2008). Possivelmente, o tratamento crônico com Sildenafil afetou a cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias dos espermatozoides, induzindo a formação de ROS e dano peroxidativo da peça intermediária, uma vez que as

mitocôndrias apresentaram-se vacuolizadas. Além disso, a via de transdução de sinal foi prejudicada, como observado pela diminuição da expressão da GCs e PKA.

Willipinski-Stapelfeldt et al. (2004) descreveram que a via de sinalização do AMPc predominou sobre aquela do GMPc em espermatozóides de humanos, com concentrações celulares de 10  $\mu\text{mol/L}$  para o AMPc e 0.1  $\mu\text{mol/L}$  para o GMPc. Estes dados indicaram um excesso de 100 vezes mais para o primeiro em relação ao segundo, referindo-se a uma função predominante das vias de sinalização dependentes de AMPc. Além disso, foi demonstrado a presença e atividade funcional da GCs nessas células, e imunolocalização de eNOS e nNOS. No presente trabalho, o Sildenafil induziu alterações morfológicas em espermatozóides de camundongos, possivelmente, através do estímulo da via do NO.

Um sistema complexo de vias intracelulares é ativado por agonistas da guanilato ciclase em espermatozóides. A motilidade é afetada, principalmente, pelo aumento de AMPc, enquanto que a reação de acrossoma depende diretamente da síntese de GMPc. Ambos os nucleotídeos cíclicos ativam quinases específicas e canais iônicos. Uma complexa interação dos sistemas de produção de GMP e AMPc ocorre, facilitada pelo uso de inibidores de PDEs, resultando em uma disfunção da função espermática. Quantidades excessivas de certos ativadores da guanilato ciclase podem exercer efeitos opostos e anti-reprodutivos, aumentando o estresse oxidativo e peroxidação lipídica das membranas espermáticas. Doadores de NO ativam um mecanismo de regulação por *feedback* negativo e dessensibilizam a GCs, levando à diminuição progressiva de GMPc (REVELLI et al., 2002).

Uma variedade de proteínas quinases (proteínas quinases dependentes e independentes de AMPc, caseína quinase II e proteína quinase C) estão associadas com a maturação de proteínas espermáticas via fosforilação diferencial. A inibição da fosforilação de proteínas dependentes de AMPc por inibidores de PKA bloqueia a capacitação de espermatozóides de camundongos e humanos. Ativadores de PKC potencializam a capacitação, enquanto os inibidores a impedem. O  $\text{Ca}^{2+}$  exerce uma função importante na capacitação e reação de acrossoma de espermatozóides, e a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta durante estes processos. Isto promove a ativação da PLC, que converte o fosfatidilinositol bifosfato em DAG e  $\text{IP}_3$ . Este último está envolvido na capacitação e reação de acrossoma. O DAG ativa a  $\text{PLA}_2$  e PKC, que estão envolvidas na reação de acrossoma e são capazes de abrir os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática. A pentoxifilina é um inibidor de fosfodiesterase que eleva a concentração intracelular do AMPc que, por sua vez, regula certas proteínas quinases envolvidas na fosforilação de proteínas de membrana associadas com a capacitação. Este fármaco pode atuar via mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que ativa a  $\text{PLA}_2$ , resultando na

síntese de AA e lisofosfolipídios requeridos para a fusão de membranas associadas com a reação de acrossoma. A  $[Ca^{2+}]_i$  aumentada pode ativar a PKC, induzindo a reação de acrossoma independentemente, via fosforilação de proteínas de membrana (AIN et al., 1999).

Os resultados imunocitoquímicos do presente estudo demonstraram uma diminuição na expressão da GCs e PKA em espermatozóides. A primeira é responsável pela formação de nucleotídeos cíclicos, que ativam proteínas quinases que, por sua vez, fosforilam proteínas-alvo, tais como canais de  $Ca^{2+}$ , mudando o comportamento da célula. Adicionalmente, a GCs e a PKA participam da via de sinalização responsável pelos processos de capacitação e reação de acrossoma. Uma vez no trato reprodutor feminino, aqueles espermatozóides com moléculas sinalizadoras intracelulares inibidas, possivelmente, não serão capazes de fertilizar o ovócito. Como o NO é um importante primeiro mensageiro dessa cascata de eventos, concentrações aumentadas deste gás podem ter prejudicado a expressão de proteínas.

O tratamento crônico com Sildenafil exerceu um efeito estimulatório na produção de testosterona, provavelmente via acumulação de GMPc e estimulação de suas vias dependentes. Apesar das alterações morfológicas em espermatozóides, o tratamento crônico não afetou de forma significativa os parâmetros espermáticos. Importantes implicações deste esquema terapêutico devem ser enfatizadas antes de seu uso clínico, visto que o aumento dos níveis de testosterona está relacionado com estímulo produção de espermatozóides, aumento da agressividade e libido, aceleração do desenvolvimento de crianças e adolescentes, entre outros.

## 9 CONCLUSÕES

- As alterações ultra-estruturais encontradas nas células de Leydig após um mês de tratamento crônico com Sildenafil, bem como o aumento da expressão de proteínas da via esteroidogênica estão associados com o estímulo da produção de testosterona por essas células. As características apresentadas são típicas de células ativadas para produção hormonal;
- Após dois meses do esquema terapêutico os animais demonstraram sinais de adaptação ao tratamento, como indicado por algumas características ultra-estruturais de células de Leydig típicas do estado basal, nenhuma alteração na expressão da StAR e níveis normais de testosterona no soro;
- As alterações morfológicas dos espermatozoides após o tratamento com Sildenafil não foram suficientes para afetar os parâmetros espermáticos.

## **10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ e encontra-se protocolado sob o número L-0035/2008 (Anexo A).

## **11 FONTE DE FINANCIAMENTO**

Este projeto está sendo financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES V) / Fundação Oswaldo Cruz.

## REFERÊNCIAS

ABRAMS, D.; SCHULZE-NEICK, I.; MAGEE A. G. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. **Heart**, London, v. 84, p. 1-2, 2006.

ABUELHIJA, M. et al. Lipopolysaccharide Increased the Expression Levels of IL-18, ICE and IL-18 R in Murine Leydig Cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v. 60, p. 151-159, 2008.

AIN, R. et al. Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrossome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signaling molecules. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v. 5, p. 618-626, 1999.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALVAREZ, J. D. The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice. **J. Biol. Rhythms**, New York, v. 23, p. 26-36, 2008.

ANDRIC, S.A., et al. Protein Kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 293, p. E1399-1408, 2007.

BALERCIA, G. et al. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 25, p. 245-249.

BALLARD, S. A. et al. Sildenafil, an inhibitor of Phosphodiesterase type 5, enhances nitric oxide mediated relaxation of human corpus cavernosum. **Int. J. Impot. Res.**, London, v. 8, p. 103, 1996.

BARROSO, G. et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertil. Steril.**, New York, v. 92, p. 835-848, 2009.

BECKER, A. J.; UCKERT, S.; STIEF, C. G. The basics of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition in urology. **Urologe.**, Berlin, v. 47, p. 1582-1587, 2008.

BLOUNT, M. A. et al. Conversion of phosphodiesterase-5 (PDE5) catalytic site to higher affinity by PDE5 inhibitors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 323, p. 730-737, 2007.

CAWLEY, S. M. et al. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. **Cell. Signal.**, Oxford, v. 19, p. 1023-1033, 2007.

CHUNG, K. F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 533, p. 110-172, 2006.

CONTI, M. et al. Regulation of follicle-stimulating hormone and dibutyryl adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate of a phosphodiesterase isoenzyme of the Sertoli cell. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 110, p. 1189-1196, 1982.

CONTI, M. et al. Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate of a phosphodiesterase from the rat Sertoli cell. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 7979-7987, 1995.

CORBIN, J. D. et al. [<sup>3</sup>H] Sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. **Mol. Pharmacol.**, Bethesda, v. 63, p. 1364-1372, 2003.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5 : target of Sildenafil. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, p. 13729-13732, 1999.

\_\_\_\_\_. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. **Int. J. Clin. Pract.**, Oxford, v. 56, p. 453-459, 2002.

COSTA, R. R., VARANDA, W. A. Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels. **J. Physiol.**, Paris, v. 585.2, p. 339-349, 2007.

DAVIDOFF, M. S. et al. Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. **Arch. Histol. Cytol.**, Niigata, v. 58, p. 17-30, 1995.

DAVIDOFF, M. S. et al. Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 287, p. 161-170, 1997.

DESJARDINS, C.; EWING, L. L. **Cell and molecular biology of the testis**. 1. ed. New York: Oxford University, 1993.

DIMITRIADIS, F. et al. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. **Asian. J. Androl.**, Shanghai, v. 10, p. 115-133, 2008.

DUFAU, M. L. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 50, p. 483-508, 1988.

DU PLESSIS, S. S.; JONGH, P. S.; FRANKEN, D. R. Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. **Fertil Steril**, New York, v. 81, p. 1026-1033, 2004.

ELSHAL, M. F. et al. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal Chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects : association with cigarette smoking. **Clin. Biochem.**, Toronto, 2009. In press.

FARBER, H. W.; LOSCALZO J. Pulmonary arterial hypertension. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 351, p. 1655-1665, 2004.

FIGUEIROA, M. S. **Efeito do extrato aquoso do chá verde e suas catequinas puras sobre a produção de testosterona pelas células de Leydig de rato *in vitro***. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

FLAHERTY, C. O.; LAMIRANDI, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 41, p. 528-540, 2006.

FRASER, L. R. et al. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. **J. Reprod. Dev.**, Tokyo, v. 51, p. 37-46, 2005.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GHOFRANI, H. A. et al. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. **Lancet**, London, v. 360, p. 895-900, 2002.

GHOFRANI, H. A. et al. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 44, p. 1488-1496, 2004.

GLENN, D. R. J. et al. Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrossome reaction in vitro. **Fertil. Steril.**, New York, v. 87, p. 1064-1070, 2007.

GLENN, D. R. J. et al. Sildenafil citrate (Viagra) impairs fertilization and early embryo development in mice. **Fertil. Steril.**, New York, v. 91, p. 893-899, 2009.

GUPTA, M.; KOVAR, A.; MEIBOHM, B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 45, p. 987-1003, 2005.

HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. **Int. Rev. Cytol.**, New York, v. 233, p. 181-241, 2004.

HANSSON, V.; SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v. 73, p. 81-92, 2000.

HATZIMOURATIDIS, K.; HATZICHRISTOU, D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: the day after. **Eur. Urol.**, Amsterdam, v. 51, p. 75-89, 2007.

HEDGER, M. P.; EDDY, E. M. Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 35, p. 1309-1319, 1986.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **J. Cell. Sci.**, Cambridge, v. 113, p. 1671-1676, 2000.

HOSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HUMPL, T. et al. Beneficial effect of oral Sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, Hagerstown, v. 111, p. 3274-3280, 2005.

JAGANNATHAN, S.; PUBLICOVER, S. J.; BARRATT, C. L. R. Voltage-operated calcium channels in male germ cells. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, p. 203-215, 2002.

JANSZEN, F. H. A. et al. The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. **Biochem. J.**, London, v. 160, p. 433-437, 1976.

JIMENEZ-GONZALEZ, C. et al. Calcium signaling in human spermatozoa : a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v. 12, p. 253-267, 2006.

KAMINSKY, A.; SPERLING, H. Testosterone replacment therapy for prostate cancer. **Urology A**, Berlin, epud ahead of print, 2010.

KARATZA, A. A. et al. Treatment of primary pulmonary hypertension with oral Sildenafil. **Respiration**, Basel, v. 71, p. 192-194, 2004.

KIRSCH, M. et al. Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. **FASEB J.**, Bethesda, v. 22, p. 30-40, 2008.

KOPPERS, A. J. et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 93, p. 3199-3207, 2008.

KOTERA, J. et al. cGMP-dependent protein kinase protects cGMP from hydrolysis by phosphodiesterase-5. **Biochem. J.**, London, v. 372, p. 419-426, 2003.

KOTHARI, S. S.; DUGGAL, B. Chronic oral Sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. **Ind. Heart J.**, New Delhi, v. 54, p. 404-409, 2002.

KWAN, H. Y. et al. P. Role of cyclic nucleotides in the control of cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels in vascular endothelial cells. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v. 36, p. 857-866, 2009.

LABORATORIOS PFIZER. **Viagra: monografia do produto**. São Paulo: Pfizer, 1998

LANGTRY, H. D.; MARKHAM, A. Sildenafil: A review of its use in erectile dysfunction. **Drugs**, Auckland, v. 57, p. 967-989, 1999.

LEE, N. P. Y.; CHENG, C. Y. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. **Biol. Reprod.**, Madson, v. 70, p. 267-276, 2004.

LIN, T. Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis. II. Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 5, p. 201-205, 1984.

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

LIU, C. et al. Treatments for pulmonary arterial hypertension. **Respir. Med.**, London, v. 100, p. 765-774, 2006.

LOBATO, E. B. et al. Treatment with phosphodiesterase inhibitors type III and V: milrinone and sildenafil is an effective combination during thromboxane-induced acute pulmonary hypertension. **Br. J. Anaesth.**, Oxford, v. 96, p. 317-322, 2006.

MANNA, P. R.; JO, Y.; STOCCO, D. M. Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$  : role of protein kinase A and protein kinase C signaling. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 193, p. 53-63, 2007.

MEIKLE, A. W.; LIU, X.; STRINGHAM, J. D. Extracellular calcium and luteinizing hormone effects on 22-hydroxycholesterol used for testosterone production in mouse Leydig cells. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 12, p. 148-151, 1991.

MICHELAKIS, E. D. et al. Oral Sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, Hagerstown, v. 105, p. 2398-2403, 2002.

MICHELAKIS, E. D. et al. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, Hagerstown, v. 108, p. 2066-2069, 2003.

MIDDENDORFF, R. et al. New aspects of Leydig cell function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 424, p. 125-138, 1997.

MIDDENDORFF, R. et al. Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. **Andrologia**, Berlin, v. 32, p. 41-64, 2000.

MIDZAK, A. S. et al. Effect of myxothiazol on Leydig cell steroidogenesis: inhibition of luteinizing hormone-mediated testosterone synthesis but stimulation of basal steroidogenesis. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 148, p. 2583-2590, 2007.

MIKHAIL, G. W. et al. Clinical and hemodynamic effects of Sildenafil in pulmonary hypertension: acute and mid-term effects. **Eur. Heart J.**, Oxford, v. 25, p. 431-436, 2004.

MINTER, L. J.; DeLIBERTO, T. J. Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume and sêmen characteristics in the coyote (*Canis Latrans*). **Theriogenology**, New York, v. 69, p. 946-952, 2008.

MONTORSI, F. et al. Can phosphodiesterase type 5 inhibitors cure erectile dysfunction? **Eur. Urol.**, Amsterdam, v. 49, p. 979-986, 2006.

MOURDJEVA, M. et al. Spatial and temporal distribution of atrial natriuretic factor in the rat testis. **Biol. Cell**, Colchester, v. 93, p. 301-307, 2001.

MÜLLER, D. et al. Spatiotemporal regulation of the two atrial natriuretic peptide receptors in testis. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 145, p. 1392-1401, 2004.

NAYLOR, A. et al. Sildenafil (VIAGRA): an inhibitor of cyclic GMP-specific Phosphodiesterase type 5 for the treatment of male erectile dysfunction. **Eur. Urol.**, Amsterdam, v. 30 (suppl 2), p. 158, 1996.

OLIVEIRA, E. C.; AMARAL, C. F. S. Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 81, p. 390-394, 2005.

PAPADOPOULOS, V.; LIU, J.; CULTY, M. Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import ? **Mol. Cell. Endocrinol.**, Limerick, v. 265-266, p. 59-64, 2007.

PAYNE, A. H.; HARDY, M. P. **The Leydig cell in health and disease**. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007.

PEIXOTO, C. A. et al. Immunocytochemical localization and distribution of human albumin in *Wuchereria bancrofti* adult worms. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v. 123, p. 173-177, 1999.

POTTER, L. R.; ABBEY-HOSCH, S.; DICKEY, D. M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocr. Rev.**, Chevy Chase, v. 27, p. 47-72, 2006.

PRESTON, I. R. et al. Acute and chronic effects of sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respir. Med.**, London, v. 99, p. 1501-1510, 2005.

PUTNEY, J. W. J. A model for receptor-regulation calcium entry. **Cell Calcium**, Amsterdam, v. 7, p. 1-12, 1986.

RABNOVITCH, M. et al. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia : hemodynamic and structural features. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 236, p. 818-827, 1979.

RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction : from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v. 15, p. 553-572, 2009.

RASHATWAR, S. S.; CORNWELL, T. L.; LINCOLN, T. M. Effects of 8-bromo-cGMP on  $Ca^{2+}$  levels in vascular smooth muscle cells : possible regulation of  $Ca^{2+}$ -ATPase by cGMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 84, p. 5685-5689, 1987.

REFFELMANN, T. ; KLONER, R. A. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? **Cardiovasc. Res.**, Oxford, v. 83, p. 204-212, 2009.

REVELLI, A. et al. Guanylate cyclase activity and sperm function. **Endocr. Rev.**, Chevy Chase, v. 23, p. 484-494, 2002.

RICH, S. The current treatment of pulmonary arterial hypertension. **Chest**, Northbrook, v. 130, p. 1198-1202, 2006.

RONE, M. B.; FAN, J.; PAPADOPOULOS, V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein intractions and implications in disease states. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1791, p. 646-658, 2009.

ROSSATO, M. et al. Store-operated calcium influx and stimulation of steroidogenesis in rat Leydig cells : role of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 142, p. 3865-3872, 2001.

ROSSI, P. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in somatic and germ cells of mouse seminiferous tubules. **J. Reprod. Fertil.**, Colchester, v. 74, p. 317-327, 1985.

ROTEM, R. et al. Atrial natriuretic peptide induces acrossomal exocytosis of human spermatozoa. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 274, p. E218-E223, 1998.

RUNO, J. R.; LOYD, J. E. Primary pulmonary hypertension. **Lancet.**, London, v. 361, p. 1533-1544, 2003.

SAHARA, M. et al. New insights in the treatment strategy for pulmonary arterial hypertension. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, Norwell, v. 20, p. 377-386, 2006.

SARAIVA, K. L. A. et al. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reprod. Toxicol.**, Elmsford, v. 22, p. 754-759, 2006.

SARAIVA, K. L. A. et al. Changes in mouse Leydig cells ultrastructure and testosterone secretion after diethylcarbamazine administration. **Micron**, Oxford, v. 39, p. 580-586, 2008.

SARKER, R. et al. Dual cell cycle-specific mechanisms mediate the antimitogenic effects of nitric oxide in vascular smooth muscle cells. **J. Hypertens.**, London, v. 15, p. 275-283. 1997.

SASTRY, B. K. et al. Clinical efficacy of Sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 43, p. 1149-1153, 2004.

SCHULZE-NEICK, I. et al. Intravenous Sildenafil is a potent pulmonary vasodilator in children with congenital heart disease. **Circulation**, Hagerstown, v. 108[suppl II], p. 167-173, 2003.

SCHWARZ, E. R. et al. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int. J. Impot. Res.**, Basingstoke, v. 19, p. 139-148, 2007.

SCIPIONI, A. et al. Immunohistochemical localization of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 124, p. 401-407, 2005.

STOCCO, D. M. et al. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. **Mol. Endocrinol.**, Chevy Chase, v. 19, p. 2647-2659, 2005.

STOCKER, C. et al. Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomized trial in infants after cardiac surgery. **Intensive Care Med.**, New York, v. 29, p. 1996-2003, 2003.

SULLIVAN, M. H. F.; COOKE B.A. The role of Ca<sup>2+</sup> in steroidogenesis in Leydig cells. **Biochem. J.**, London, v. 236, p. 45-51, 1986.

TOMIC, M. et al. Calcium signaling in single rat Leydig cells. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 136, p. 3422-3429, 1995.

TUDER, R. M. Hipertensão pulmonar: caracterização baseada na experiência de centros de referência. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 52, p. 127-129, 2006.

UCKERT, S., et al. Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. **Eur. Urol.**, Amsterdam, v. 50, p. 1153-1156, 2006.

UDRISAR, D. P. et al. Androgen and estrogen-dependent regulation of insulin-degrading enzyme in subcellular fractions of rat prostate and uterus. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 230, p. 479-487, 2005.

UTHAYATHAS, S. et al. Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacol. Rep.**, Kraków, v. 59, p. 150-163, 2007.

VALENTI, S. et al. Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic cGMP production by purified rat Leydig cells cultured in vitro. **Int. J. Andro.**, Oxford, v. 22, p.

VISCONTI, P. E. et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **J. Reprod. Immunol.**, Limerick, v. 53, p. 133-150, 2002.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation : the guanylate cyclase-cyclic GMP system. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, Hagerstown, v. 12(suppl 5), p. 115-118, 1988.

WALTHER, T.; STEPAN, H. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 180, p. 17-22, 2004.

WANDERLEY, M. I.; NEGRO-VILAR, A. Pretreatment with phorbol ester and LHRH agonist reduces testosterone production and protein kinase C activity in rat Leydig cells challenged with PDBu and LHRH. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 29, p. 1557-1565, 1996.

WEDEL, B. et al. Mutation of His-105 in the  $\beta 1$  subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 91, p. 2592-2596, 1994.

WEISSMAN, B. A. et al. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat Leydig cells by nitric oxide. **J. Androl.**, Lawrence, v. 26, p. 369-378, 2005.

WENG, Q. et al. Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ HSD, P450c17, and P450arom in Gottingen Miniature Pig Testes. **J. Reprod. Dev.**, Tokyo, v. 51, p. 299-304, 2005.

WIESNER, B. et al. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control  $Ca^{2+}$  entry into sperm. **J. Cell Biol.**, New York, v. 142, p. 473-484, 1998.

WILLIPINSKI-STAPELFELDT, B. et al. Comparative analysis between cyclic GMP and cyclic AMP signaling in human sperm. **Mol. Hum. Reprod.**, Oxford, v. 10, p. 543-552, 2004.

WITTE, T. S.; SCHAFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrossome reaction of mammalian spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 102, p. 181-193, 2007.

Yang, J. et al. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. **Toxicol. In Vitro.**, Oxford, v. 21, p. 558-565, 2007.

YETIK-ANACAK, G.; CATRAVAS, J. D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vascul. Pharmacol.**, New York, v. 45, p. 268-276.

ZHAO, A. Z. et al. Recent advances in the study of  $Ca^{2+}$ /CaM-activated phosphodiesterases : expression and physiological functions. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.**, Orlando, v. 31, p. 237-251, 1997.

ZHAO, L. et al. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, Hagerstown, v. 104, p. 424-8, 2001.

ZHAO, L. et al. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. **Circulation**, Hagerstown, v. 107, p. 234-7, 2003.

## APÊNDICE A. Artigo publicado

Int. J. Exp. Path. (2009), 90, 454–462  
doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00660.x

## ORIGINAL ARTICLE

## Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion

Karina Lidianne Alcântara Saraiva<sup>\*,†</sup>, Amanda Karolina Soares E. Silva<sup>\*</sup>, Maria Inês Wanderley<sup>†</sup>, Araken Almeida De Araújo<sup>‡</sup>, José Roberto Botelho De Souza<sup>¶</sup> and Christina Alves Peixoto<sup>\*,†</sup>

<sup>\*</sup>Laboratório de Ultraestrutura do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), <sup>†</sup>Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), <sup>‡</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, <sup>§</sup>Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco and <sup>¶</sup>Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

### INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

Received for publication:  
7 October 2008  
Accepted for publication:  
18 January 2009

## Correspondence:

Dr Christina A. Peixoto  
Laboratório de Ultraestrutura  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
FIOCRUZ  
Av. Moraes Rego s/n  
Recife  
CEP 50670-420  
Brazil  
Tel: (55) 81 210 12557  
Fax: (55) 81 210 12516  
E-mail: cpeixoto@cpqam.fiocruz.br

### Summary

The phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor, Sildenafil, is a novel, oral treatment approach for pulmonary hypertension. As Leydig cells present PDE5, this study was conducted to investigate the effects of the chronic treatment with Sildenafil (25 mg/kg) on male *Swiss Webster* mice steroidogenesis. After a 4-week long experimental design, Leydig cells were analysed by morphological and immunocytochemical procedures. Serum testosterone was assayed by radioimmunoassay. Leydig cells presented noteworthy ultrastructural alterations, such as a vesicular smooth endoplasmic reticulum, large vacuoles scattered through the cytoplasm, enlarged mitochondria with discontinuous cristae and whorl membranes with vesicles at the periphery, which are typical characteristics of an activated steroid-secreting cell. Important immunocytochemical labelling for steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and testosterone were detected in isolated Leydig cells. In addition, Sildenafil-treated mice showed significant increased levels of total testosterone. The results obtained in the present study are consistent with the hypothesis that the accumulation of cyclic guanosine monophosphate by PDE5 inhibition could be involved in the androgen biosynthesis stimulation. Important clinical implications of hormonal disorders should be taken into account for patients with pulmonary hypertension.

### Keywords

Leydig cells, P450<sub>scc</sub>, sildenafil, StAR, steroidogenesis, testosterone

The cyclic nucleotide monophosphates (cAMP and cGMP) are important intracellular regulators of several processes, including smooth muscle motility, electrolyte homeostasis, neuroendocrine signals and retinal phototransduction. The labile gas, nitric oxide (NO), is a crucial mediator of smooth

muscle relaxation and it interacts with soluble guanylate cyclases (sGC) in the cytoplasm to increase the conversion of guanosine triphosphate (GTP) into cyclic guanosine monophosphate (cGMP). On the other hand, natriuretic peptides activate membrane-bounded guanylate cyclases and

accumulate intracellular cGMP. This increase in cGMP triggers a signal transduction cascade that encompasses the activation of cyclic nucleotide-dependent protein kinases A and G, subsequent phosphorylation of the actin-myosin system, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  channels and adenosine triphosphate-driven  $\text{Ca}^{2+}$  pumps located in the outer cell membrane of sarcoplasmic reticulum. This cascade leads to a reduction in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and to smooth muscle relaxation (Uckert *et al.* 2006; Dimitriadis *et al.* 2008).

Sildenafil, a chemical compound designated as UK-92,480, is a water soluble citrate salt that was first synthesized by Pfizer in United Kingdom to treat hypertension and angina pectoris. Interestingly, this drug exhibited a different pharmacological effect, a marked penile erection, and became the first-line treatment option to erectile dysfunction (Kaki & Kell 2004; Uthayathas *et al.* 2007). It has been reported that more than 20 million men worldwide are treated with this drug, and about \$2 billion per year are spent on it (Sharma 2007).

The Sildenafil therapeutic possibilities arise from modulating intracellular levels of cGMP. This cyclic nucleotide is degraded into the inactive form by intracellular phosphodiesterase type 5 (PDE5) enzyme, which is present in the smooth muscle of the systemic vasculature and in platelets (Ghofrani *et al.* 2006). The main pharmacological action of Sildenafil is the inhibition of the cGMP-specific PDE5 with an inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) between 2 and 7 nM (Abbott *et al.* 2004), leading to cGMP accumulation and special effects in targeting organs.

Pulmonary hypertension is a rare and aggressive disease that affects children and adults with a bad prognostic and little life expectation. It can be classified as a primary or secondary hypertension, with various aetiologies. The cause of the primary pulmonary hypertension is not yet understood, but the secondary may be due to pulmonary, cardiac and extrathoracic malfunction (Uthayathas *et al.* 2007).

Sildenafil has revolutionized the treatment of pulmonary hypertension. Studies have demonstrated that this drug attenuated pulmonary hypertension by increasing the supply of blood to the lungs. This medicine reduced the right ventricular systolic pressure, right ventricular hypertrophy, the pulmonary artery muscularization and increased cGMP levels, suggesting that the NO-cGMP pathway contributed to the drug response (Zhao *et al.* 2001, 2003).

Several clinical research studies of pulmonary hypertension have been conducted using high dosages of Sildenafil for long time as additional therapy in children and adults (Schulze-Neick *et al.* 2003; Stocker *et al.* 2003; Karatza *et al.* 2004; Humpl *et al.* 2005; Preston *et al.* 2005; Ganière *et al.* 2006; Lobato *et al.* 2006). According to Karatza *et al.*

(2005), Sildenafil therapy in series of children with pulmonary hypertension increased exercise capacity, and improved oxyhaemoglobin saturations without any side effects, appearing to be beneficial in the management of this disease.

However, important implications of the pulmonary hypertension treatment with high and diary doses of Sildenafil should be taken into account. Recently, PDE5 was localized by immunohistochemistry and western blotting in vascular smooth muscle cells, as well as in Leydig and peritubular cells of the rat testis (Scipioni *et al.* 2005). Therefore, it seems necessary to investigate whether compounds interfering with PDE5 activity, as Sildenafil, might affect testicular physiology.

The present work describes, for the first time, the effects of the chronic treatment with Sildenafil on mouse Leydig cells to contribute to a better knowledge about its action on the steroidogenesis.

## Materials and methods

### Chemicals

The Sildenafil was obtained from Pfizer Inc., New York, NY, USA; the anaesthetics Ketamine and Xylazine from Sespo Comércio e Indústria Ltda., Sao Paulo, Brazil; Hank's balanced salt solution (HBSS) and Medium 199 (M199) from Gibco, Grand Island, NY, USA; Bovine serum albumin (BSA, fraction V) from Miles, Naperville, IL, USA; Percoll from GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden; Collagenase (type I), Soybean trypsin inhibitor, Human chorionic gonadotropin (hCG), Leupeptin, Glutaraldehyde, Paraformaldehyde, Cacodylic acid, Sodium phosphate monobasic and dibasic heptahydrate, Osmium tetroxide, Calcium chloride, Potassium ferricyanide, Ammonium chloride, Tween 20, Lead (II) nitrate and Sodium citrate from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA; SPIN-PON resin (Embed 812), LR-White resin and Uranyl acetate from Electron Microscopy Science, Washington, PA, USA; Acetone and Ethanol were purchased from Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda., Rio de Janeiro, Brazil.

### Experimental design

Forty pubertal *Swiss Webster* mice (obtained from the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Brazil) aged 25 days and weighing 15–20 g were used in all experiments. Mice were examined for health status and acclimated to the laboratory environment at 25 °C and 12 h light:12 h dark photoperiod. The animals were housed in metal cages and fed a standard laboratory diet. The experimental group was composed of 20 animals that received

456 K. L. A. Saraiva *et al.*

25 mg/kg body weight of Sildenafil for 4 weeks administered through the drinking water (Zhao *et al.* 2003). Body weights were recorded every day and the drug concentration in the water was adjusted to maintain the dose. The control group was also composed of 20 animals that received only pure water using the same procedure as described above. All experiments were carried out according to ethical guidelines (L-0035/08 – CEUA/FIOCRUZ).

After treatment with Sildenafil, the experimental and control animals were anaesthetized with ketamine (115 mg/kg, i.m.) and xylazine (10 mg/kg, i.m.), before blood collection by cardiac puncture without anticoagulant. Serum was separated and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  for radioimmunoassay of testosterone hormone. Testes were quickly dissected and fixed for morphological analysis.

#### Light microscopy

The testes were fixed in Bouin's solution for 8 h. Then, they were dehydrated in an ethanol series and embedded in paraffin wax. Serial sections of  $4\ \mu\text{m}$  were cut using a microtome (Leica RM 2125RT), and stained with haematoxylin-eosin for histological observation (Weng *et al.* 2005).

#### Leydig cell isolation

Isolation and purification of mice Leydig cell-enriched preparations were modified from Hedger and Eddy (1986) and Wanderley and Negro-Vilar (1996). The testes were decapsulated with fine forceps without breaking seminiferous tubules, under aseptic conditions, and digested in an enzyme solution of 0.5 mg/ml collagenase, 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin in Hank's balanced salt containing 0.1% BSA (HBSS/BSA), pH 7.4, in a thermostated shaking water bath (20 min, 90 Hz,  $34^{\circ}\text{C}$ ). The dispersed testes were suspended in 50 ml (final volume) HBSS/BSA and allowed to settle (5 min). The supernatants containing Leydig cells were aspirated using a plastic pipette, filtered through a  $70\ \mu\text{m}$  nylon cell strainer and washed with 50 ml HBSS/BSA. The cell suspension was centrifuged at 150 g, 15 min,  $20^{\circ}\text{C}$ . The pellet obtained was re-suspended in 5 ml HBSS/BSA, representing a crude testicular interstitial cell suspension. Discontinuous Percoll density gradients (20%, 35%, 43%, 68% and 90%) were used to obtain purified Leydig cells. The crude Leydig cell suspension was then applied on the top of this gradient and centrifuged at 800 g for 30 min at  $20^{\circ}\text{C}$ . Cells in the 35–43% and 43–68% interfaces were aspirated carefully using a syringe and transferred to centrifuge tubes containing M199 and 0.1% BSA. After mixing, the tubes were centrifuged at 150 g for

20 min at  $20^{\circ}\text{C}$  and the supernatant obtained was discarded. To remove excess of Percoll, the cells pellets were washed twice with M199 containing 0.1% BSA and then finally re-suspended in the same solution. These preparations contained greater than 70% Leydig cells as determined by electron microscopy (Hedger & Eddy 1986). Cell viability (90–95%) was quantified by Trypan blue exclusion.

For immunocytochemical assays, the isolated Leydig cells were stimulated with 1 mIU/ml of hCG at  $34^{\circ}\text{C}$  for 30 min to stimulate the steroidogenic pathway. Then, these cells were immediately fixed for electron microscopy analysis.

#### Electron transmission microscopy

For routine procedures, the fragments of testes and isolated Leydig cells were fixed overnight in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM calcium chloride and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone, and embedded in Embed 812. Polymerization was performed at  $60^{\circ}\text{C}$  for 3 days (Saraiva *et al.* 2006). Ultrathin sections were collected on 300-mesh nickel grids, counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate and examined using a FEI Morgani 268D transmission electron microscope.

For immunocytochemical study, the isolated and hCG-stimulated Leydig cells were fixed overnight in a solution containing 0.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. After fixation, the samples were washed three times in the same buffer, incubated with 50 mM ammonium chloride for 40 min, dehydrated in ethanol, and embedded in LR-White resin. Polymerization was performed at  $30^{\circ}\text{C}$  for 5 days. This procedure was carried out as described by Peixoto *et al.* (1999).

#### Immunocytochemistry

Ultrathin sections of isolated and hCG-stimulated Leydig cells were cut with a diamond knife and collected on nickel grids. They were incubated for 30 min at room temperature in 0.02 M PBS, pH 7.2, containing 1% BSA and 0.01% Tween 20 (PBS-BT). The sections were then incubated for 1 h with primary antibodies against steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, cytochrome P450<sub>sc</sub> side-chain cleavage enzyme (P450<sub>sc</sub>) and testosterone at dilutions of 1:25, 1:200 and 1:25, respectively, in PBS-BT. The sections were then washed in PBS-BT and incubated with a secondary antibody, 10 nm colloidal gold-labelled goat anti-rabbit IgG. As

antibody control, sections were incubated only in the presence of the gold-labelled marker. Following the immunostaining procedures, the sections were counterstained with 5% uranyl acetate and lead citrate (Peixoto *et al.* 1999).

Quantitative analysis was performed on photomicrographs at a final magnification of 56,000 $\times$  taken from 10 different Leydig cells, randomly chosen to compare the numbers of gold-labelled particles in control and Sildenafil-treated cells with Knuskal–Wallis test. As the experimentally treated cells and control samples were processed in an identical method, no correction of tissue shrinkage was made.

#### Hormone assays

Serum testosterone was assayed using solid-phase radioimmunoassay as described in the instructions provided by manufacturer's kit (Coat-A-Count Total Testosterone; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). The sensitivity of the testosterone assay was 4 ng/dl and the intra and inter-assay coefficients of variation were 4–18% and 5.9–12% respectively. The values are expressed in ng/ml.

Data were analysed with Mann–Whitney test to compare the testosterone levels between controls and the organisms submitted to Sildenafil treatment (Zar 1996).

#### Antibodies

The polyclonal antibodies, StAR (sc-25806, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA, USA), cytochrome P450<sub>scc</sub> enzyme (AB1244; Chemicon International, Inc., Billerica, MA, USA) and testosterone (ab8557, ABCAM Inc., Cambridge, MA, USA) were raised in rabbits against different peptides, corresponding to the amino acids 1–285 representing full length StAR of human origin, the amino acids 421–441 of rat cytochrome P450<sub>scc</sub> enzyme and the full length testosterone protein conjugated to BSA respectively. The 10 nm colloidal gold-labelled goat anti-rabbit IgG was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

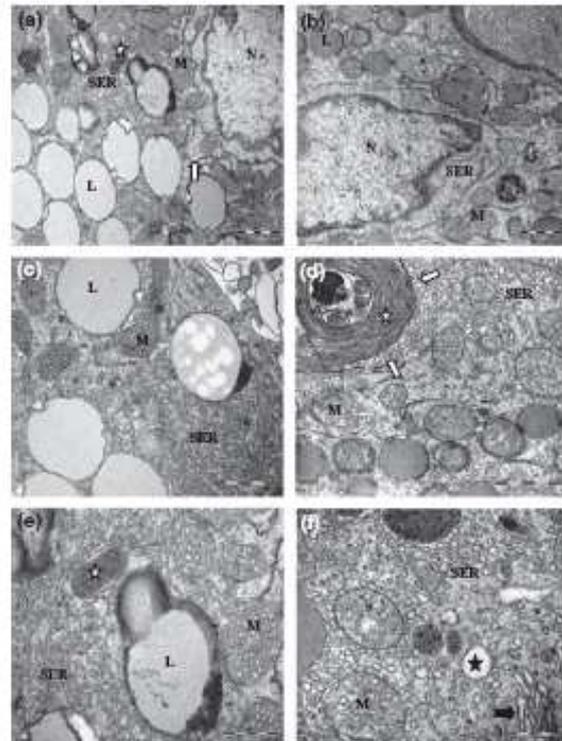
## Results

#### Histological analysis

No morphological differences were observed among Leydig cells from control and experimental groups (data not shown).

#### Electron microscopy analysis

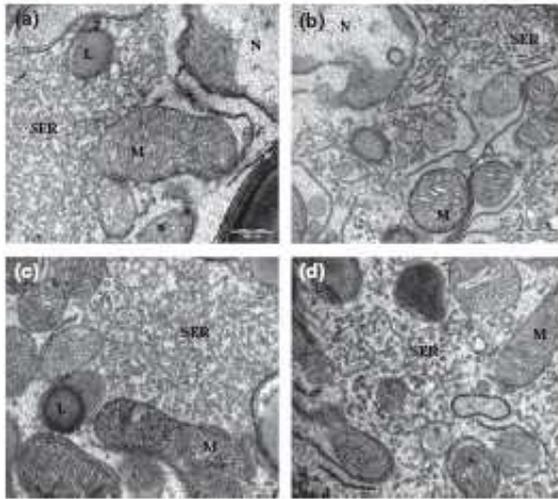
In testicular tissue, control Leydig cells showed morphological characteristics as irregular polygonal shape, in some



**Figure 1** Testis Leydig cells. (a, c and e) Untreated Leydig cells showing nucleus (N), lipid droplets (L), several mitochondria with tubular cristae (M), tubular smooth endoplasmic reticulum (SER), scarce rough endoplasmic reticulum (arrow) and peroxisomes (star). (b, d and f) 25 mg/kg Sildenafil-treated Leydig cells presenting nucleus (N), lipid droplets (L), lysosome (open arrow), enlarged mitochondria with disarranged cristae (M), vesicular smooth endoplasmic reticulum (SER), whorle membranes (white star) with surrounding vesicles (white arrows), vacuoles scattered through the cytoplasm (black star) and Golgi (black arrow). Bars, 1  $\mu$ m (a, b, c, d); 500 nm (e, f).

cases an asymmetrical nucleus located eccentrically in the cell body with large nucleolus, light nucleoplasm and heterochromatin clumps less massive on the inner surface of the nuclear envelope. The filopodia were protruded and interdigitated with the filopodia from opposite cells. The tubular smooth endoplasmic reticulum (SER) was abundant, consisting of interconnected, branched and anastomosing tubules, throughout the cytoplasm. This tubular SER were occasionally surrounded mitochondria and lipid droplets. The membrane whorles, which are concentric packs of flattened and partially fenestrated cisternae of the SER, were frequently observed. The rough endoplasmic reticulum was scarce, localized mainly in perinuclear and peripheral regions. Mitochondria were numerous throughout the cytoplasm with an

458 K. L. A. Saraiva et al.

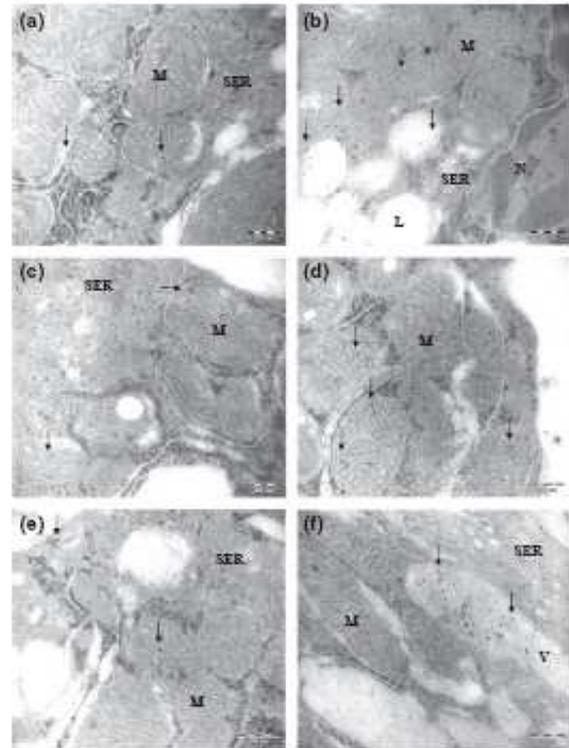


**Figure 2** Isolated Leydig cells. (a) Untreated Leydig cell without hCG stimulation; (b) 25 mg/kg Sildenafil-treated Leydig cells without hCG stimulation; (c) Untreated Leydig cell with hCG stimulation; (d) 25 mg/kg Sildenafil-treated Leydig cells with hCG stimulation. All treatment had similar ultrastructural morphology: lipid droplets (L), mitochondria with tubular cristae (M), nucleus (N) and trabecular smooth endoplasmic reticulum (SER). Bars, 500 nm.

irregular distribution, and along their surface, cisternae of SER often enveloped them. The mitochondria size was variable, with tubular and thick cristae. Several Golgi complexes were dispersed in the cell body, often found near a cell pole, as the nucleus is eccentrically located. Some dense bodies, probably lysosomal in nature, were detected. Peroxisomes of irregular sizes were identified in portions of the cytoplasm. Several lipid droplets, variable in size, were viewed through the cytoplasm and some of them maintained close contact with the SER (Figure 1a,c and e).

Sildenafil treated Leydig cells presented all the organelles cited above. Some differences were observed, such as a vesicular SER, consisting of separated vesicles of variable diameters. Islets of tubular SER appeared among the vesicles. Some large vacuoles were found in the peripheral cytoplasm, presumably opening into the extracellular space. The mitochondria were enlarged with disarranged or discontinued cristae. Several vesicles were observed on the membrane whorles periphery, probably involved in hormonal precursor's secretion (Figure 1b,d and f). All of these alterations described above are typical of an activated cell with an increased steroidogenic capacity.

Similar morphological differences were observed in isolated Leydig cells. However, the SER presented a trabecular



**Figure 3** StAR, P450scc and testosterone immunocytochemistry. (a, c and e) Weak labelling was observed in non-Sildenafil treated samples for StAR (a), P450scc (c) and testosterone (e) (arrows). (b, d and f) An increased labelling to StAR (b), P450scc (d) and testosterone (f) was detected in 25 mg/kg Sildenafil-treated Leydig cell (arrows). Lipid droplets (L), Mitochondria (M), smooth endoplasmic reticulum (SER), vacuole (V). Bars, 200 nm.

appearance. This change could be related to the isolation procedure. hCG-stimulation did not alter the ultrastructural characteristics of isolated Leydig cells from treated and control groups (Figure 2).

#### *StAR, P450scc and testosterone in Leydig cells*

Immunocytochemistry revealed that enzymatic steroidogenesis pathway was significantly more active in Leydig cells treated with Sildenafil. Evident labelling to StAR, P450scc and testosterone were detected throughout the cytoplasm of treated cells when compared with control samples. However, in relation to the detection of P450scc, a strong reaction was observed in the mitochondria (Figure 3 and Table 1).

**Table 1** Quantitative analysis of gold-labelled particles distribution in control and Sildenafil-treated Leydig cells

	Number of gold-labelled particles					
	StAR		P450 <sub>sc</sub>		Testosterone	
	Control	Sildenafil (25 mg/kg)	Control	Sildenafil (25 mg/kg)	Control	Sildenafil (25 mg/kg)
Mitochondria	1 ± 1.333	4.9 ± 4.581	3.1 ± 1.449	9.8 ± 4.341*	0.3 ± 0.675	2.6 ± 2.875
SER	0	3.6 ± 4.971	0.8 ± 1.317	2.8 ± 1.989	0.6 ± 0.699	4.1 ± 2.767
Lipid droplets	0	3 ± 5.621	0	0	0	1.333 ± 1.506
Vacuoles	0.222 ± 0.441	0.3 ± 0.675	0.143 ± 0.378	0.5 ± 0.926	0.143 ± 0.378	3.889 ± 8.373
Total counting	1.2 ± 1.317	10.6 ± 10.426*	4 ± 2.108	13 ± 4.163*	1 ± 1.054	11 ± 6.092*

StAR, steroidogenic acute regulatory; P450<sub>sc</sub>, P450 side-chain cleavage enzyme; SER, smooth endoplasmic reticulum.

Significant changes were found in treated cells (\*Kruskal-Wallis,  $P < 0.01$ ). Mean of gold-labelled particles (mean ± SD);  $n = 10$ .

**Table 2** Effect of Sildenafil treatment on mice serum testosterone levels (ng/ml)

	Serum testosterone levels (ng/ml)					
	N	Mean	Minimum	Maximum	SD	Mann-Whitney
Control	16	0.39	0.13	1.60	0.36	$Z = 3.26$
Sildenafil (25 mg/kg)	17	4.84	0.17	14.00	5.14	

Significant difference between Sildenafil 25 mg/kg and control samples,  $P < 0.01$ .

#### Serum testosterone concentration

The serum testosterone levels were significantly higher in 25 mg/kg Sildenafil administrated mice when compared with control animals (Mann-Whitney,  $P < 0.01$ ). The parameters of the two groups are shown in Table 2.

#### Discussion

The relevance of cGMP system on steroidogenesis can be demonstrated by the use of Sildenafil. Particularly, in the testis, this cyclic nucleotide is involved in spermatozoa motility, development of testicular germ cells, relaxation of peritubular lamina propria cells, testosterone production in Leydig cells and dilatation of testicular blood vessels (Middendorff *et al.* 2000).

The steroid-secreting Leydig cells regulate the development and activity of the male reproductive tract and external sex characteristics, and may enhance spermatogenesis in the seminiferous tubules. Steroid hormones are synthesized from cholesterol in a multi-step enzymatic process, in which the StAR appears to transfer cholesterol from cellular stores to the inner mitochondrial membrane to be converted to pregnenolone by the cytochrome P450<sub>sc</sub> enzyme. The pregnenolone is transported and enzymatically converted to testosterone precursors in the SER,

before the testosterone synthesis (Clark & Cochrum 2007; Yang *et al.* 2007).

This is the first research that demonstrated the effects of the chronic treatment with Sildenafil on Leydig cells steroidogenesis. These cells consist of a abundant smooth endoplasmic reticulum, numerous mitochondria with tubular cristae and a variable number of lipid droplets, which participate actively in hormonal biosynthesis.

Sildenafil treated Leydig cells showed a vesicular SER and some large vacuoles scattered throughout the cytoplasm that are features of an active secreting cell. According to Ohata (1979), these vacuoles are derived from testosterone-containing vesicles of the SER and could migrate towards the cell surface to open into the extra-cellular space.

The function of membranous whorles is still uncertain. It is hypothesized that this organelle stores cholesterol used in testosterone synthesis. Interestingly, in Sildenafil treated Leydig cells, several vesicles were observed in the whorles' periphery, which could be related to the hormonal precursors transport.

Isolated Leydig cells presented similar ultrastructural characteristics; however, they showed an SER with a trabecular appearance. This morphological alteration could be related to the isolation procedure, as these cells were digested in an enzymatic solution, probably affecting the filaments network.

460 K. L. A. Saraiva *et al.*

All the ultrastructural alterations observed in this work could be related to an enhancement of the testosterone synthesis, resultant from PDE5 inhibition and cGMP accumulation. To confirm this hypothesis, an immunocytochemical and hormonal study was performed. The results indicated an enhanced labelling to StAR, P450<sub>scc</sub> and testosterone in isolated hCG-stimulated Leydig cell from the treated group. Also, a significant increase in the plasmatic testosterone was achieved in treated group compared with that in control.

The PDE5 inhibitors promote their pharmacological effects by inhibiting phosphodiesterase type 5, an enzyme responsible for the degradation of cGMP. The raised levels of this cyclic nucleotide affect many intracellular functions (Glenn *et al.* 2007). This drug mechanism could be involved in the activation of the steroidogenic pathway and testosterone secretion, as recently PDE5 was identified in Leydig cells (Scipioni *et al.* 2005). Steroid hormones are synthesized from cholesterol in the gonads in response to pituitary hormones, such as hCG via the classical first messenger/second messenger pathway. To delineate the mechanism of hCG-mediated induction of testosterone synthesis, a study was performed to investigate the changes in 3 $\beta$ -HSD-1, P450<sub>scc</sub> and StAR expression in mouse Leydig cells and an enhanced expression of these enzymes was detected (Yang *et al.* 2007). In the present work, after the chronic treatment with Sildenafil, isolated and hCG-stimulated Leydig cells presented an augmented immunolocalization of StAR, P450<sub>scc</sub> and testosterone. These data indicate that Sildenafil and hCG would possibly act synergistically to increase cGMP levels via different mechanisms. The hCG increases intracellular cGMP production by activating guanylyl cyclase system (Lin *et al.* 1979; Mukhopadhyay & Leideberger 1988), and Sildenafil induces an accumulation of cGMP by inhibiting the PDE5, or could act via NO or ANP-dependent mechanism (Preston *et al.* 2004).

The cyclic GMP is synthesized by two classes of enzymes called guanylyl cyclases, and both generate cGMP from intracellular GTP. The particulate guanylyl cyclases are membrane bound receptors that bind natriuretic and guanylin peptides. The sGC is a heme-containing, heterodimeric nitric oxide receptor. It consists of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , which make up the active enzyme. The cGMP acts directly with effectors, such as cGMP-dependent protein kinases, cyclic nucleotide-gated channels, and cGMP-regulated phosphodiesterases (Wong & Garbers 1992; Krumenacker & Murad 2006).

Andric *et al.* (2007) described that the stimulation of both guanylyl cyclases and inhibition of phosphodiesterase 5 *in vitro* were accompanied by elevations in cGMP and androgen production. However, the inhibition of sGC and protein

kinase G (PKG) significantly reduced the StAR phosphorylation, leading to a decreased steroidogenesis. Thus, the authors suggested that cGMP participates in Leydig cell steroidogenesis through the PKG-dependent modification of the StAR protein.

A study investigated the effects of 4 $\beta$ -PMA, a potent activator of protein kinase C (PKC), on atrial peptide-induced testosterone production and cGMP accumulation in Leydig cells. This compound inhibited testosterone production and markedly reduced the amount of cGMP through an enhanced phosphodiesterase activity, stimulated by PKC. The testosterone production and cGMP formation was completely reversed in the presence of a phosphodiesterase inhibitor. The cause of the decreased hormone production after 4 $\beta$ -PMA treatment was related to the diminished accumulation of the second messenger (Mukhopadhyay & Leideberger 1988).

Similarly, the present work shows that the chronic treatment with Sildenafil increased the testosterone biosynthesis in Leydig cells, probably through cGMP accumulation due to PDE5 inhibition.

The results obtained in the present study are in agreement with those of Carosa *et al.* (2004). Men suffering from erectile dysfunction have androgen levels significantly lower than normal ones. These authors demonstrated the effects of two different type V phosphodiesterase inhibitors treatments, Sildenafil (50 mg) and Tadalafil (20 mg) on the reversibility of testosterone reduction. This pharmacological therapy was able to enhance testosterone and reduce LH levels, probably due to the higher frequency of full sexual intercourse. However, the authors did not rule out the possibility of a direct effect of the PDE5 inhibitors on the on the human testis, as this tissue expresses quite a high level of PDE5.

Khurana and Pandey (1993) demonstrated that the atrial natriuretic factor, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide (CNP), induced the production of intermediate precursors of testosterone biosynthesis, in purified mouse Leydig cells. All of these natriuretic peptides stimulated the steroidogenesis pathways by a transmembrane signal transduction mechanism involving the generation and accumulation of intracellular cGMP. This stimulatory effect begins at the first step involved in the conversion of cholesterol to pregnenolone.

The pulmonary vasodilator effects of Sildenafil on acute and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats are potentiated by atrial natriuretic peptide (ANP), possibly by a synergistic effect on the increase in plasma cGMP synthesis (Preston *et al.* 2004). Similarly, ANP could be involved in cGMP synthesis in the Leydig cell, which would be accumulated in response to Sildenafil treatment. Con-

versely, the NO exerts an inhibitory effect on Leydig cell steroidogenesis, which is not mediated by the sGC as it fails to increase cGMP production (Del Punta *et al.* 1996). According to Middendorff *et al.* (1997), NO and CNP have been shown to influence testosterone release. While CNP increase testosterone via a promiscuous activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP in mice, a decrease on testosterone levels was detected in response to NO, as this agent could inhibit P450<sub>scc</sub> enzyme by directly binding to its heme iron.

Androgens have been shown to exert direct vasodilator effects in arteries from both humans and experimental animals. Oka *et al.* (2007) demonstrated that Dehydroepiandrosterone, a testosterone precursor, completely blocked hypoxic pulmonary vasoconstriction, which was accompanied by opening potassium channels, upregulation of sGC protein expression/activity and improved pulmonary artery vasodilator responsiveness to NO.

In addition, Seyrek *et al.* (2007) have recently demonstrated that supraphysiological concentrations of testosterone act via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening to induce relaxation in radial artery *in vitro*.

Therefore, the present study did not rule out the possible involvement of the enhanced steroid hormones biosynthesis, after the chronic treatment with Sildenafil, on pulmonary hypertension improvement.

In conclusion, the chronic treatment with Sildenafil exerted a stimulatory effect on testosterone production, probably via cGMP accumulation. This increased hormonal synthesis should be taken into account, as this therapeutic scheme has been extensively used worldwide in patients with pulmonary hypertension disorders. Additional experiments are in development in our laboratory to describe the possible effects on sperm parameters and fertilizing capacity.

## Acknowledgements

This work has been supported by Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

Abbott D., Comby P., Charuel C. *et al.* (2004) Preclinical safety profile of Sildenafil. *Int. J. Impot. Res.* 16, 498–504.  
 Andric S.A., Janjic M.M., Stojkov N.J., Kostic T.S. (2007) Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1399–E1408.

## Sildenafil stimulates steroidogenesis 461

Carosa E., Martini P., Brandetti F. *et al.* (2004) Type V phosphodiesterase inhibitor treatments for erectile dysfunction increase testosterone levels. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 61, 382–386.  
 Clark B.J. & Cochrum R.K. (2007) The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. *Drug Metab. Rev.* 39, 353–370.  
 Del Punta K., Charreau E.H., Pignataro O.P. (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137, 5337–5343.  
 Dimitriadis F., Giannakis D., Pardalidis N., Zikopoulos K., Paraskevaids E., Giotitsas N., Kalaboki V., Tsounapi P., Baltogiannis D., Georgiou I., Saito M., Watanabe T., Miyagawa I., Sofikitis N. (2008) Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian. J. Androl.* 10, 115–133.  
 Ganière V., Feihl F., Tagan D. (2006) Dramatic beneficial effects of sildenafil in recurrent massive pulmonary embolism. *Int. Care Med.* 32, 452–454.  
 Ghofrani H.A., Osterloh L.H., Grimminger F. (2006) Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 689–702.  
 Glenn D.R.J., McVicar C.M., McClure N., Lewis S.E.M. (2007) Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction *in vitro*. *Fertil. Steril.* 87, 1064–1070.  
 Hedger M.P. & Eddy E.M. (1986) Monoclonal antibodies against rat Leydig cell surface antigens. *Biol. Reprod.* 35, 1309–1319.  
 Humpl T., Reyes J.T., Holtby H., Stephens D., Adatia I. (2005) Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension: twelve-month clinical trial of a single-drug, open-label, pilot study. *Circulation* 111, 3274–3280.  
 Kabi J.S. & Kell P.D. (2004) Update on oral treatments for male erectile dysfunction. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18, 267–274.  
 Karatza A.A., Narang I., Rosenthal M., Bush A., Magee A.G. (2004) Treatment of primary pulmonary hypertension with oral sildenafil. *Respiration* 71, 192–194.  
 Karatza A.A., Bush A., Magee A.G. (2005) Safety and efficacy of Sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. *Int. J. Cardiol.* 100, 267–273.  
 Khurana M.L. & Pandey K.N. (1993) Receptor-mediated stimulatory effect of atrial natriuretic factor, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide on testosterone production in purified mouse Leydig cells: activation of cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Endocrinology* 133, 2141–2149.  
 Krumenacker J.S. & Murad F. (2006) NO-cGMP signaling in development and stem cells. *Mol. Genet. Metab.* 87, 311–314.  
 Lin T., Marchwinski J., Nankin H. (1979) *In vitro* studies of the testis: the effect of LH on cyclic nucleotides. *Horm. Metab. Res.* 11, 573–577.

462 K. L. A. Saraiva et al.

- Lobato E.B., Beaver T., Muehlschlegel J., Kirby D.S., Klodell C., Sidi A. (2006) Treatment with phosphodiesterase inhibitors type III and V: milrinone and sildenafil is an effective combination during thromboxane-induced acute pulmonary hypertension. *Br. J. Anaesth.* 96, 317–322.
- Middendorff R., Müller D., Paust H.J., Holstein A.F., Davidoff M.S. (1997) New aspects of Leydig cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 125–138.
- Middendorff R., Davidoff M.S., Behrends S., Mewe M., Miethens A., Müller D. (2000) Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. *Andrologia* 32, 41–64.
- Mukhopadhyay A.K. & Leideberger F.A. (1988) Effect of a tumor-promoting phorbol ester on atrial peptide-induced testosterone production and cyclic GMP accumulation by isolated mouse Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 56, 171–176.
- Ohata M. (1979) Electron microscopy study on the testicular interstitial cells in the mouse. *Arch. Histol. Jpn.* 42, 51–79.
- Oka M., Karoor V., Homma N. et al. (2007) Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 74, 377–387.
- Peixoto C.A., Norões J., Rocha A., Dreyer G. (1999) Immunocytochemical localization and distribution of human albumin in *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123, 173–177.
- Preston I.R., Hill N.S., Gambardella L.S., Warburton R.R., Klinger J.R. (2004) Synergistic effects of ANP and Sildenafil on cGMP levels and amelioration of acute hypoxic pulmonary hypertension. *Exp. Biol. Med.* 229, 920–925.
- Preston I.R., Klinger J.R., Houtches J., Nelson D., Farber H.W., Hill N.S. (2005) Acute and chronic effects of Sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir. Med.* 99, 1501–1510.
- Saraiva K.L.A., Silva Junior V.A., Dias E.S.F., Peixoto C.A. (2006) Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod. Toxicol.* 22, 754–759.
- Schulze-Neick I., Hartenstein P., Li J. et al. (2003) Intravenous sildenafil is a potent pulmonary vasodilator in children with congenital heart disease. *Circulation* 108, II167–II173.
- Scipioni A., Stefanini S., Santone R., Giorgi M. (2005) Immunohistochemical localization of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberl and adult rat testis. *Histochem. Cell Biol.* 124, 401–407.
- Seyrek M., Yildiz O., Ulusoy H.B., Yildirim V. (2007) Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 309–316.
- Sharma R. (2007) Novel phosphodiesterase-5 inhibitors: current indications and future directions. *Indian J. Med. Sci.* 61, 667–679.
- Stocker C., Penny D.J., Brizard C.P., Cochrane A.D., Soto R., Shekerdemian L.S. (2003) Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. *Int. Care Med.* 29, 1996–2003.
- Ueckert S., Hedlund P., Andersson K.E., Truss M.C., Jonas U., Stief C.G. (2006) Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. *Eur. Urol.* 50, 1153–1156.
- Uthayathas S., Karuppagounder S.S., Thrash B.M., Parameshwaran K., Suppiramaniam V., Dhanasekaran M. (2007) Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. *Pharmacol. Rep.* 59, 150–163.
- Wanderley M.I. & Negro-Vilar A. (1996) Pretreatment with phorbol ester and LHRH agonist reduces testosterone production and protein kinase C activity in rat Leydig cells challenged with PDBu and LHRH. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1557–1565.
- Weng Q., Medan M.S., Watanabe G., Tsubota T., Tanioka Y., Taya K. (2005) Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450scc, 3 $\beta$ HSD, P450c17, and P450arom in Göttingen miniature pig testes. *J. Reprod. Dev.* 51, 299–304.
- Wong S.K. & Garbers D.L. (1992) Receptor guanylyl cyclases. *J. Clin. Invest.* 90, 299–305.
- Yang J., Zhang Y., Wang Y., Cui S. (2007) Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 558–565.
- Zar J.H. (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 662 p.
- Zhao L., Mason N.A., Morell N.W. et al. (2001) Sildenafil inhibits hypoxia-pulmonary hypertension. *Circulation* 104, 424–428.
- Zhao L., Manson N.A., Strange J.W., Walker H., Wilkings M.R. (2003) Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. *Circulation* 107, 234–237.

## **APÊNDICE B. Publicações, participação em cursos, congressos e apresentação de trabalhos**

### **Artigo Indexado**

SARAIVA, K. L. *et al.* Chronic treatment with Sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 90, p. 454-462, 2009.

### **Participação em Congressos e cursos**

Participação no XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios, RJ.

Participação no Simpósio de Microscopia no cerrado, 24-26 de setembro de 2008, Pirinópolis, GO.

Participação no XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 4-7 de outubro de 2009, Belo Horizonte, MG.

Participação no 2<sup>nd</sup> South-American Workshop on Advanced Fluorescence Techniques: from spectroscopy to microscopy, 22-26 de setembro de 2009, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

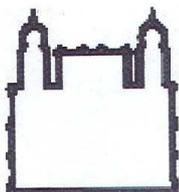
### **Apresentação de trabalhos**

SARAIVA, K. L. A.; ALMEIDA, A. A.; SILVA JR, V. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A. Ultrastructural effect of Sildenafil on mice Leydig cells. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, RJ, 2007.

SARAIVA, K. L. A. ; SILVA, A. K. S. ; WANDERLEY, M. I. ARAÚJO, A. A. ; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical study of the Leydig cell steroidogenic proteins after chronic

treatment with sildenafil. **Simpósio de Microscopia no cerrado**, 24-26 de setembro de 2008, Pirinópolis, GO.

SARAIVA, K. L. A. ; SILVA, A. K. S. ; WANDERLEY, M. I. ARAÚJO, A. A. ; SOUZA, J. R. B. ; PEIXOTO, C. A. Phosphodiesterase type 5 inhibitor stimulates Leydig cell steroidogenesis. **Simpósio de Microscopia no cerrado**, 24-26 de setembro de 2008, Pirinópolis, GO.

**ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**

MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-FIOCRUZ

**CERTIFICADO**

**C**ertificamos que o protocolo intitulado “**Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 sobre a esteroidogênese de camundongos**” sob a responsabilidade de **Christina Alves Peixoto**, foi licenciado pelo nº **L-0035/08** e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ)**. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 07 de maio de 2012.

Rio de Janeiro, 07 de maio de 2008.

**Octavio Augusto França Presgrave**  
Coordenador da CEUA  
FIOCRUZ

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)