

Amanda Leitolis

**INGESTÃO EXCESSIVA DE SÓDIO CAUSA ALTERAÇÕES NA  
REATIVIDADE DO CORPO CAVERNOSO *IN VITRO* E  
DISFUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos.

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Áurea Elizabeth Linder.

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Leitolis, Amanda

Ingestão excessiva de sódio causa alterações na reatividade do corpo cavernoso in vitro e disfunção erétil em ratos / Amanda Leitolis ; orientador, José Eduardo da Silva Santos ; co-orientadora, Áurea Elizabeth Linder. - Florianópolis, SC, 2013.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. sal. 3. corpo cavernoso. 4. disfunção erétil. 5. RhoA/Rho-quinase. I. da Silva Santos, José Eduardo. II. Linder, Áurea Elizabeth. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Amanda Leitolis

**INGESTÃO EXCESSIVA DE SÓDIO CAUSA ALTERAÇÕES NA  
REATIVIDADE DO CORPO CAVERNOSO *IN VITRO* E  
DISFUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do  
Título de “Mestre em Farmacologia” e aprovada em sua forma  
final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.  
Florianópolis, 4 de Fevereiro de 2013.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Monteiro de Lima

Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

(UFSC)

---

Dr. Fernando Silva Carneiro

(USPRP)

---

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

(UFSC)



*Aos meus pais, Ana e Nelson, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e esforço diário para permitir a realização dos meus sonhos.*

*Ao meu namorado William, por sua eterna dedicação em me fazer feliz.*



*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”*

Fernando Pessoa





## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus pela oportunidade diária de crescimento pessoal e espiritual. Pelas dificuldades que me permitiram amadurecimento e me ensinaram a perseverança. E por ter me presenteado com saúde e pessoas maravilhosas que me ajudaram a alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Juliana e André, e aos meus pais Ana e Nelson, por se dedicarem e trabalharem todos os dias pela felicidade dos seus filhos e suportarem todas as minhas ausências ao longo desses dois anos.

Ao meu afilhado Artur, por me trazer alegria e vida nova.

Ao William pelo amor, dedicação, apoio e paciência. Por ter se feito presente, mesmo que distante, em todos os meus dias em Florianópolis e por participar ativamente da realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. José Eduardo, pela disposição, dedicação e preocupação em ensinar e auxiliar durante toda a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Áurea Elizabeth Linder pelas experiências transmitidas com relação à parte técnica deste trabalho e orientação.

Ao Prof. Giles Alexander Rae que gentilmente nos emprestou alguns materiais necessários para a realização deste estudo, por ter aceitado compor a banca de avaliação desta dissertação, pelos valiosos ensinamentos e por ser exemplo para todos os discentes da Farmacologia.

À Prof<sup>a</sup> Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, por ter de forma tão gentil disponibilizado o sistema de registro utilizado em grande parte dos experimentos realizados neste trabalho.

À Muryel de Carvalho Gonçalves, pela valiosa ajuda em experimentos na reta final deste trabalho.

Aos colegas do LabCardio, Karla, Renê, Ronald e Jéssica, pelo auxílio no manejo dos animais, pela ajuda em experimentos e convivência  
diária.

Aos colegas de laboratório, Ana Kelly, Luigi e Kiuanne pelos momentos de descontração.

Aos colegas do NOlab, Ana, Regina, Karin, Edir, Bete e Gustavo sempre dispostos a ajudar.

Às meninas da UFPR, Sandra, Priscila, Bruna e Rita que mesmo distantes auxiliaram dispondo do seu tempo para ajudar principalmente com a produção de ração e também pelos momentos divertidos e conversas.

À Adriane Madeira pelo carinho e auxílio em experimentos.

Aos amigos egressos do PPGF, Manuel, Lara e Thiago.

À Mabel pela convivência divertida, por ter me acolhido, me ensinado os primeiros experimentos e a rotina do laboratório.

Ao Prof. Luiz Fernando Pereira (PUCPR), pela oportunidade de participar e aprender com seus projetos durante a graduação. Por ter me influenciado positivamente a seguir na área de pesquisa e por ser exemplo pessoal e profissional.

Aos colegas da turma de mestrado em Farmacologia 2011, Sandro, Marília, Livia e Leonardo.

Às queridas Alessandra, Stefânia e Lenyta que por meio de conversas tornaram esses dois anos mais divertidos. Obrigada pelo carinho de vocês.

Àqueles que se tornaram minha família em Florianópolis, Flora, Renata, Vagner, Patrícia, Ronald e Muryel. Obrigada pela amizade sincera, conselhos, carinho e alegria que tornaram esses dois anos mais leves.

À Gisele e Mariana, que mesmo distantes fazem a amizade presente. Obrigada pelo incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente os bioteristas Pedro e Murilo.

Ao Dr. Fernando Silva Carneiro (USPRP) e ao Prof. Carlos Rogério Tonussi, que gentilmente aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho.

À FAPESC e CNPq, cujos recursos permitiram o desenvolvimento deste estudo.

**RESUMO**

---

LEITOLIS, A. Ingestão excessiva de sódio causa alterações na reatividade do corpo cavernoso *in vitro* e disfunção erétil em ratos, 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

A incorporação de produtos alimentícios industrializados à dieta causou aumento significativo da quantidade de sal ingerida pela população mundial. No Brasil, cerca de 89% dos homens entre 19 e 59 anos consomem sódio acima do nível seguro de ingestão. Evidências indicam que a ingestão exacerbada de sal pode causar inúmeras doenças. Neste trabalho, avaliamos as alterações causadas pela dieta hipersódica (NaCl 4%) no corpo cavernoso *in vitro* e na função erétil de ratos. Para isso, ratos Wistar machos, com 60 dias de idade, receberam ração acrescida de 4% de sódio pelo período de 2, 4, 8, 12 ou 24 semanas. Os animais que consumiram sal em excesso pelo maior período de tempo tiveram diminuição do peso testicular e aumento do peso renal, acompanhado de maior produção de urina. Em experimentos *in vitro*, corpos cavernosos de ratos expostos à dieta hipersódica apresentaram hiper-reatividade quando a contração foi induzida pelo estímulo elétrico de campo. Este efeito foi acompanhado por uma menor sensibilidade ao inibidor de Rho-quinase (composto Y-27632) e evidências funcionais de alterações no influxo de cálcio para o meio intracelular. Nossos resultados sugerem que modificações na recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático também podem ocorrer. Apesar da dieta não prejudicar o relaxamento mediado pelo óxido nítrico, estabelecido como principal mediador da ereção, ao avaliarmos a função erétil dos animais por meio da administração subcutânea de apomorfina observamos que ratos expostos à dieta hipersódica têm menos ereções que animais da mesma idade que consumiram dieta padrão (controle). Este conjunto de efeitos, *in vitro* e *in vivo*, ocorreu de modo independente do aparecimento de hipertensão arterial, a qual até o momento tem sido o principal fator que estabelece alguma relação entre o consumo excessivo de sal e a disfunção erétil. Como conclusão, a ingestão demasiada de sódio pode causar alterações no corpo cavernoso e afetar diretamente a função erétil de ratos, independente da elevação da pressão arterial destes animais. Modificações na funcionalidade da via

RhoA/Rho-quinase e mobilização de cálcio parecem contribuir para este efeito. Novos estudos são necessários para esclarecer a importância destas alterações para a disfunção erétil causada pelo consumo de sal.

**Palavras-chave:** sal, corpo cavernoso, disfunção erétil, RhoA/Rho-quinase, cálcio.





**ABSTRACT**

---

LEITOLIS, A. Excessive sodium intake induces changes in the reactivity of corpus cavernosum *in vitro* and erectile dysfunction in rats, 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

The consumption of processed foods caused a significant increase in salt quantity consumed by the world population. In Brazil, around 89% of men between ages 19-59 ingest sodium above the safe level recommended. Evidence indicates that the heightened intake of salt can cause several diseases. In this study, we evaluated the changes caused by high salt diet (4% NaCl) in corpus cavernosum of rats *in vitro*, as well as in the erectile function of conscious rats. Wistar male rats (60 days old) received chow added with 4% NaCl for 2, 4, 8, 12 or 24 weeks. Consumption of high salt diet for 24 weeks resulted in decreased testicular weight and increased kidney weight, accompanied by augmented diuresis. When studied *in vitro*, strips of corpus cavernosum of rats that consumed high salt diet for 24 weeks presented enhanced contractile responses to electrical field stimulation. This effect was accompanied by a decreased susceptibility to the Rho-kinase inhibitor, compound Y-27632, and functional evidence of changes in the influx of calcium into the cytosol, besides impaired calcium uptake into the sarcoplasmic reticulum. Although high salt diet did not affect the relaxation mediated by nitric oxide, the main mediator of erection, we observed that rats exposed to high salt diet have fewer erections induced by subcutaneous injection of apomorphine, when compared with animals of same age fed regular diet (control group). The changes in responsiveness of corpus cavernosum observed *in vitro* and the reduced number of erection found *in vivo* in rats fed high salt diet appear to be independent of the influence of salt on the onset of hypertension, since no significant changes on systolic blood pressure were found in these animals. In conclusion, chronic high sodium intake can impair the functionality of corpus cavernosum *in vitro* and the ability of rats to achieve erections. For the best of our knowledge, this is the first study establishing a relationship between excessive consumption of salt and erectile dysfunction, independently of hypertension. Both modification in the functionality of RhoA/Rho-kinase pathway and calcium mobilization appear to contribute to

this effect. Further studies are needed to clarify the significance of these changes for erectile dysfunction caused by high salt intake.

**Key-words:** salt, corpus cavernosum, erectile dysfunction, RhoA/Rho-kinase, calcium.



## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>Figura 1</b> .....	40
<b>Figura 2.</b> Mecanismos intracelulares pelos quais o NO promove a ereção.....	42
<b>Figura 3.</b> Mecanismos intracelulares que mantém o corpo cavernoso flácido. ....	45
<b>Figura 4.</b> Manutenção da contração do corpo cavernoso pela via RhoA/Rhoquinase. ....	48
<b>Figura 5.</b> Alterações no peso úmido de tecidos de ratos expostos à dieta hipersódica. ....	65
<b>Figura 6.</b> Avaliação da diurese em animais controle e tratados com dieta hipersódica. ....	66
<b>Figura 7.</b> Análise da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos tratados com dieta hipersódica ou ração padrão (controle). ....	67
<b>Figura 8.</b> Resposta contrátil à fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais naïve. ....	68
<b>Figura 9.</b> Efeitos da adição de cloreto de potássio ou fenilefrina em tiras corpo cavernoso de animais naïve. Em A, contrações causadas por cloreto de potássio. ....	69
<b>Figura 10.</b> Efeitos da fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais naïve. ....	70
<b>Figura 11.</b> Efeito do KCl e da fenilefrina em corpos cavernosos de animais controle e tratados com dieta hipersódica por 12 ou 24 semanas. ....	71
<b>Figura 12.</b> Efeito da fenilefrina sobre tiras de corpo cavernoso de animais controle e tratados com dieta hipersódica. ....	72
<b>Figura 13.</b> Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida pela PE. ....	74
<b>Figura 14.</b> Relaxamento causado pelo composto Y-27632 em tiras de corpo cavernoso pré-contraídas com fenilefrina. ....	75

<b>Figura 15.</b> Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pela fenilefrina.....	76
<b>Figura 16.</b> Relaxamento induzido pelo estímulo elétrico de campo (EEC) em tiras de corpos cavernosos obtidos de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.....	77
<b>Figura 17.</b> Contração induzida pelo estímulo elétrico de campo (EEC) em tiras de corpos cavernosos obtidas de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.....	78
<b>Figura 18.</b> Efeito inibitório do composto Y-27632 sobre a contração induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.....	79
<b>Figura 19.</b> Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.....	80
<b>Figura 20.</b> Influência da inibição da SERCA na resposta contrátil induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos à dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.....	81
<b>Figura 21.</b> Aumento da reatividade ao $\text{CaCl}_2$ no corpo cavernoso de animais expostos à dieta hipersódica durante 24 semanas..	82
<b>Figura 22.</b> Redução do número de ereções induzidas por apomorfina em animais expostos à dieta hipersódica.....	83
<b>Figura 23.</b> Avaliação de parâmetros relacionados à ereção induzida por apomorfina.....	84
<b>Figura 24.</b> Modelo hipotético das alterações causadas pela dieta hipersódica no corpo cavernoso de ratos.....	93





## **LISTA DE ABREVIACÕES**

---

<b>ACh -</b>	Acetilcolina
<b>ATR -</b>	Atropina
<b>CaCl<sub>2</sub> -</b>	Cloreto de cálcio
<b>CaM -</b>	Calmodulina
<b>CC -</b>	Corpo cavernoso
<b>CCR -</b>	Curva concentração-resposta
<b>CFR -</b>	Curva frequência-resposta
<b>CGPR -</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>CPI-17 -</b>	Fosfatase inibitória do tipo 1
<b>DAG -</b>	Diacilglicerol
<b>DCV -</b>	Doenças cardiovasculares
<b>EEC -</b>	Estímulo elétrico de campo
<b>eNOS (NOS III) -</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ET -</b>	Endotelina
<b>GAPs -</b>	Proteínas ativadoras de GTPases
<b>GCs -</b>	Ciclase de guanilil solúvel
<b>GEFs -</b>	Fator de troca do nucleotídeo guanina
<b>GDI s -</b>	Inibidores da dissociação do GDP
<b>GMPc -</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>GNT -</b>	Guanetidina
<b>GPCR -</b>	Receptores acoplados a proteína G
<b>GTP -</b>	Guanosina trifosfato
<b>IP3 -</b>	Inositol trifosfato
<b>KCl -</b>	Cloreto de cálcio
<b>L-NAME -</b>	NG-Nitroarginina metil éster
<b>MLC -</b>	Miosina de cadeia leve

<b>MLCK -</b>	Quinase de miosina de cadeia leve
<b>MLCP -</b>	Fosfatase de miosina de cadeia leve
<b>MPOA -</b>	Área pré-óptica medial
<b>MYPTI-1 -</b>	Subunidade regulatória da MLCP
<b>NA -</b>	Noradrenalina
<b>NANC -</b>	Não-adrenérgico não-colinérgico
<b>nNOS (NOS I) -</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO -</b>	Óxido nítrico
<b>PAS -</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PDE -</b>	Fosfodiesterase
<b>PE -</b>	Fenilefrina
<b>PGF<sub>2α</sub> -</b>	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
<b>PH -</b>	Domínio rico em resíduos de cisteína
<b>PIP<sub>2</sub> -</b>	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
<b>PKG -</b>	Proteína quinase dependente de GMPc
<b>PLCβ -</b>	Fosfolipase C beta
<b>PSS -</b>	Solução salina fisiológica
<b>PVA -</b>	Núcleo paraventricular
<b>RBD -</b>	Sítio de ligação para Rho
<b>ROCK -</b>	Rho-quinase
<b>RyR -</b>	Receptor de rionidina
<b>S.C. -</b>	Subcutânea
<b>SERCA -</b>	Bomba de cálcio do retículo sarco(endo)plasmático
<b>SNC -</b>	Sistema nervoso central
<b>SR -</b>	Retículo sarcoplasmático

<b>TAPSI -</b>	Tapsigargina
<b>TXA<sub>2</sub> -</b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VIP -</b>	Peptídeo intestinal vasoativo

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	35
1.1 Sal .....	36
1.1.1 Aspectos históricos .....	36
1.1.2 Dieta hipersódica e doenças.....	37
1.2 Função erétil.....	38
1.2.1 Estrutura, vascularização e inervação peniana.....	38
1.2.2 Fisiologia da função erétil .....	40
1.2.3 Controle do tônus do músculo liso do corpo cavernoso....	41
1.2.4 Mecanismos de relaxamento – via de sinalização NO/cGMP .....	41
1.2.5 Mecanismos de contração.....	43
1.3 Via Rhoa/Rho-quinase .....	46
1.4 Disfunção erétil.....	48
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	51
2.1 Objetivo geral .....	52
2.2 Objetivos específicos .....	52
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	53
3.1 Animais.....	54
3.2 Grupos experimentais .....	54
3.3 Preparação isolada: corpo cavernoso .....	54
3.4 Protocolos experimentais.....	55
3.4.1 Validação da metodologia de corpo cavernoso isolado de rato .....	55
3.4.1.1 Padronização da tensão basal.....	55
3.4.1.2 Avaliação da reatividade ao KCl.....	55

3.4.1.3 Avaliação da reatividade à pe após pré-exposição ao KCl ou ao KCl e à PE.....	56
3.4.2 Investigação da influência da dieta hipersódica sobre a reatividade do corpo cavernoso de ratos.....	57
3.4.2.1 avaliação da reatividade ao KCl e à PE .....	57
3.4.2.2 Avaliação da resposta contrátil à fenilefrina .....	57
3.4.3 Análise dos efeitos da estimulação elétrica de campo (EEC) sobre o corpo cavernoso de animais controle e tratado com dieta hipersódica por 24 semanas .....	57
3.4.3.1 Análise da contração induzida pelo EEC e dos efeitos da inibição da síntese do óxido nítrico.....	58
3.4.3.2 Análise do relaxamento induzido pela EEC.....	58
3.4.3.3 Efeitos do inibidor da Rho-quinase sobre a contração induzida pela EEC.....	58
3.4.4 Avaliação de alterações na mobilização de cálcio intra e extracelular no corpo cavernoso por meio de experimentos funcionais .....	59
3.4.4.1 Reatividade ao $\text{CaCl}_2$ extracelular.....	59
3.4.4.2 Avaliação do envolvimento do cálcio intracelular na contração induzida pela PE.....	59
3.4.4.3 Avaliação do envolvimento do cálcio intracelular na contração induzida pelo EEC.....	59
3.4.5 Efeitos da inibição da SERCA sobre a contração induzida pela EEC .....	59
3.5 Coleta e avaliação do peso de tecidos .....	60
3.6 Avaliação da diurese .....	60
3.7 Medida não invasiva de pressão arterial por plestimografia (tail cuff).....	60

3.8 Ereção induzida por apomorfina .....	61
3.9 Análise estatística .....	61
3.10 Drogas e reagentes.....	62
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
4.1 Variação no peso de órgãos, diurese e pressão arterial de animais submetidos ao modelo de dieta hipersódica.....	64
4.2 Padronização do modelo de corpo cavernoso isolado.....	67
4.3 Avaliação da influência da dieta hipersódica na reatividade de corpos cavernosos a agentes contráteis e relaxantes .....	70
4.3.1 Resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais controle e tratados com dieta hipersódica .....	70
4.3.2 Influência do composto Y-27632 na resposta contrátil e relaxante de corpos cavernosos .....	73
4.3.3 Influência da liberação do cálcio de estoques intracelulares na reatividade à fenilefrina .....	75
4.4 Avaliação da influência da dieta hipersódica na reatividade contrátil e relaxante de corpos cavernosos induzida por estímulo elétrico de campo.....	76
4.4.1 Influência do composto Y-27632 na resposta contrátil induzida à estimulação elétrica de campo.....	78
4.5 Influência da dieta hipersódica sobre a liberação do cálcio de estoques intracelulares e entrada de cálcio extracelular em corpos cavernosos. ....	79
4.5.1 Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pela estimulação elétrica de campo.....	79
4.5.2 Influência da inibição da serca sobre a contração induzida pelo estímulo elétrico de campo .....	80
4.5.3 Avaliação da reatividade ao CaCl <sub>2</sub> .....	81



4.6 Avaliação das alterações causadas pelo consumo de sal sobre a função erétil de ratos acordados.....	82
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>



## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Sal

### 1.1.1 Aspectos históricos

Durante milhões de anos de evolução nossos ancestrais subsistiram sobretudo por meio do consumo de frutas, legumes e eventualmente carne proveniente de caça. Em decorrência disso, a ingestão diária de sal desses humanos primitivos era de aproximadamente 0,25 g, apenas uma fração do que consumimos hoje (MacGREGOR & de WARDENER, 1998). Entretanto, há cerca de 5000 anos os chineses descobriram que este mineral poderia ser utilizado como conservante de alimentos. Em pouco tempo, o sal estava em destaque na economia como o artigo de comércio mais tributado no mundo. Esta descoberta permitiu o desenvolvimento de comunidades assentadas que conseqüentemente aumentaram de modo exponencial o seu consumo de sal (HE & MacGREGOR, 2010; MacGREGOR & de WARDENER, 1998). Historicamente sabe-se que o imposto sobre o sal foi uma das principais causas da Revolução Francesa (RITZ & MEHLS, 2009).

Paradoxalmente à perspectiva atual, na Roma antiga o sal era lembrado como sinônimo de saúde. Este conceito se refletiu na constituição de algumas palavras em latim como *salus* (saúde) e *salubris* (saudável), além de termos como *salarium* que remetia a quantia de sal paga a oficiais e soldados romanos (RITZ & MEHLS, 2009).

Com o advento da invenção dos refrigeradores, a utilização do sal como conservante foi abolida causando queda em seu consumo. Entretanto, a incorporação recente (em termos evolutivos) de produtos alimentícios industrializados à dieta causou aumento significativo da quantidade de sal ingerida por dia para quantias entre 9-12 g por pessoa em estimativa mundial, mais do que o dobro dos 5 g recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BROWN *et al.* 2009; JAMES *et al.* 1987; MacGREGOR & de WARDENER, 1998). Estudos anteriores demonstraram que, na dieta da população adulta de europeus e norte-americanos, 75% do sal ingerido é proveniente de comidas processadas e/ou preparadas em restaurantes (BROWN *et al.* 2009).

No Brasil, segundo a pesquisa mais recente de Análise do Consumo Alimentar Pessoal feita pelo Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE) (2011), a proporção de indivíduos que consomem sódio acima do nível seguro de ingestão é de 89% entre homens e 70% entre mulheres, para a faixa etária de 19 a 59 anos, e de 80% e 62% para homens e mulheres com 60 anos ou mais, respectivamente.

### 1.1.2 Dieta hipersódica e doenças

Há quase 60 anos, Meneely e colaboradores (1953) reportaram através de um estudo inovador, que o tempo de vida de ratos poderia ser reduzido com o aumento no consumo de sal de maneira dose-dependente, isto porque a ingestão exacerbada de sódio causava nesses animais maior incidência de aterosclerose e insuficiência renal. Mais tarde, Dahl (1961) observou o desenvolvimento de hipertensão em ratas expostas cronicamente a ração com sal em excesso. Estes estudos foram os primeiros a avaliar as consequências do consumo excessivo de sal por meio da utilização da dieta hipersódica ou dieta *high-salt* em roedores. Atualmente um crescente número de evidências sugere que a ingestão exacerbada de sal pode aumentar diretamente o risco de algumas doenças como o derrame, hipertrofia ventricular esquerda, doença renal proteinúrica, cálculo renal e osteoporose (FRISOLI *et al.* 2012), sendo inclusive descrita como uma causa do câncer de estômago (FOX *et al.* 1999).

Além destas, a patologia mais frequentemente relacionada à ingestão excessiva de sal é a hipertensão. Embora ela só tenha sido descrita, em termos científicos, ao final do século XIX e início do século XX, a primeira alusão a alterações fisiológicas em decorrência desse hábito está documentada no livro “Citações de Medicina Familiar”, compilado na China antiga há mais de 4500 anos, no qual está registrado: “Portanto, se muito sal é usado em alimentos, o pulso enrijece” (apud LEVRAN & PORTA, 2005). Uma explicação para este fenômeno foi dada por Guyton e colaboradores em 1972, que propuseram que o equilíbrio de sódio é regulado pelo mecanismo de pressão-natriurese e que, portanto, quando ingerido o sódio aumentaria transitoriamente a pressão sanguínea. Todavia, alguns indivíduos são deficientes quanto à excreção de sódio e para que ela ocorra necessitam de pressão arterial mais elevada (GUYTON *et al.* 1972). Estudos recentes vêm demonstrando que

a hipertensão associada à ingestão exacerbada de sal envolve mecanismos muito mais complexos e a participação de muitos fatores interligados, como por exemplo, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (DRENJANČEVIĆ-PERIĆ *et al.* 2009).

## 1.2 Função Erétil

### 1.2.1 Estrutura, vascularização e inervação peniana

O pênis, órgão genital masculino, é responsável pela micção e função sexual. Está localizado acima do escroto, que abriga os testículos, e ligado à sínfise púbica. Estruturalmente é formado por três cilindros divididos entre um par de tecidos extensamente vascularizados, chamados de corpos cavernosos (CC) e um corpo esponjoso, sendo que este último abriga a uretra e dilata-se na porção distal formando a glândula (Figura 1A) (JÚNIOR *et al.* 2010; TESTUT & LATARJET, 1960). Os corpos cavernosos, constituídos por feixes de fibras musculares lisas, compõem a maior parte do pênis; são estruturas alongadas e aderidas intimamente à porção inferior do ísquio e do púbis. Internamente são compostos por estruturas funcionais eréteis denominadas sinusóides ou trabéculas (revestidos de células endoteliais) e externamente são envolvidos por um envoltório fibroso, denso e resistente, a túnica albugínea peniana (NARDOZZA JR, *et al.* 2010; TESTUT & LATARJET, 1960).

O fornecimento de sangue para o pênis é mantido principalmente por três pares de artérias, as cavernosas, que penetram e se ramificam em artérias de resistência helicoidais dentro dos corpos cavernosos, as dorsais, que irrigam a parte dorsal do pênis e as bulbouretrais, que suprem o corpo esponjoso e a uretra (AWAD *et al.* 2011; NARDOZZA JR *et al.* 2010). Todas elas surgem a partir de um ramo comum da artéria pudenda interna. Por outro lado, a drenagem venosa peniana é complexa e formada por dois sistemas, um superficial, composto pela veia dorsal superficial e pela veia pudenda externa superficial, e um profundo, formado pelas veias dorsal profunda, circunflexa, emissária, cavernosa e crural (AWAD *et al.* 2011; NARDOZZA JR *et al.* 2010).

O controle do tônus do músculo liso do corpo cavernoso e de seu sistema vascular é mantido tanto por inervação somática (sensorial), quanto autonômica (simpática

parassimpática). A via sensorial e motora é composta por ramos do nervo podendo denominados nervo dorsal do pênis, nervo perineal e nervo inferior retal (BROOKS, 2007). As fibras somáticas motoras medeiam impulsos para músculos esqueléticos (controle voluntário), enquanto as somáticas sensoriais medeiam informações aferentes ao SNC a partir da pele do pênis, da glândula e da uretra, bem como do interior do corpo cavernoso. A inervação autonômica, por sua vez, é composta por fibras de diâmetro pequeno, pouco ou não mielinizadas que conduzem impulsos mediando respostas involuntárias. No pênis as fibras autonômicas são coletivamente denominadas de nervo cavernoso (para revisão ver AWAD *et al.* 2011).

### *1.2.2 Fisiologia da função erétil*

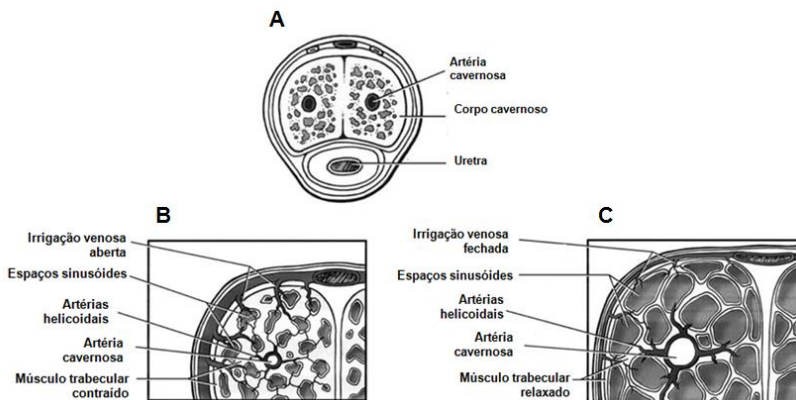
Diante de uma estimulação sexual, impulsos nervosos provocam a liberação de neurotransmissores que elevam o fluxo sanguíneo no pênis através do relaxamento de artérias e da musculatura lisa dos corpos cavernosos. Neste último, ocorre expansão dos sinusóides (tumescência) que mecanicamente comprimem as veias emissárias impedindo o retorno venoso (venooclusão) levando a rigidez e ereção (Figura 1B e 1C). Este processo é o resultado de um evento neurovascular complexo no qual estão envolvidos nervos, endotélio, vasos sanguíneos, células musculares lisas, mecanismos centrais e periféricos, neurais e/ou humorais (para revisão ver ANDERSSON, 2011).

No sistema nervoso central (SNC), para que a resposta erétil aconteça, ocorrem processamento e integração de estímulos táteis, olfativos, auditivos, visuais e imaginativos, todos coordenados por algumas áreas anatômicas cerebrais principais, como a amígdala medial, a área-préoptica medial (MPOA), o núcleo paraventricular (PVN), a substância cinzenta periaquedutal e o tegmento ventral (ANDERSSON, 2011; ANDERSSON & WAGNER, 1995). A regulação desses processos envolvem vias e mecanismos tanto espinais como supraespinais. Entre os neurotransmissores mais conhecidos encontram-se a serotonina, a oxitocina, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO), adrenocorticotropina e os peptídeos opióides. A ereção que envolve a interação desses estímulos é conhecida

como psicogênica (ANDERSSON, 2011; ANDERSSON & WAGNER, 1995).

Além dos neurotransmissores já citados, a dopamina também tem papel importante no mecanismo da ereção por promover efeitos facilitadores sobre a motivação sexual, cópula e reflexos genitais (HULL *et al.* 2004). Ambas as classes de receptores para dopamina D1 ou D1-símile (D1, D5) e D2 ou D2-símile (D2, D3, D4) estão relacionados à função erétil controlada pelo SNC. Por conta disso, a administração sistêmica de apomorfina, agonista não-seletivo dos receptores de dopamina, induz resposta erétil em mamíferos (BEAULIEU & GAINETDINOV, 2011; MELIS & ARGIOLAS, 1995;)

Os mecanismos periféricos que controlam a ereção reflexogênica dependem da inervação simpática, parassimpática, somática e sensorial das diferentes estruturas do pênis. As terminações nervosas neste tecido são categorizadas como adrenérgicas, colinérgicas e não-adrenérgicas/não-colinérgicas (NANC), como nervos contendo peptídeo intestinal vasoativo (VIP), substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e óxido nítrico sintase (TEIXEIRA *et al.* 2001).



**Figura 1.** Em A, corte transversal do pênis. Em B, conformação anatômica das estruturas do pênis no estado flácido evidenciando o músculo cavernoso e as artérias contraídas. Em C, conformação anatômica das estruturas do pênis no estado ereto deixando em evidência os sinusóides dilatados e a compressão venosa (venooclusão). Adaptado de Billups (2005).



### 1.2.3 Controle do tônus do músculo liso do corpo cavernoso

O tônus dos corpos cavernosos determina a flacidez e a ereção peniana. Resumidamente, a flacidez é mantida pelo estado contrátil das células musculares lisas por meio da fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC, do inglês *myosin light chain*), enquanto que a ereção é obtida pelo relaxamento dessas mesmas células em decorrência da defosforilação da MLC (para revisão ver HONG *et al.* 2011). Nos próximos itens abordaremos os principais mecanismos envolvidos na regulação do tônus do corpo cavernoso.

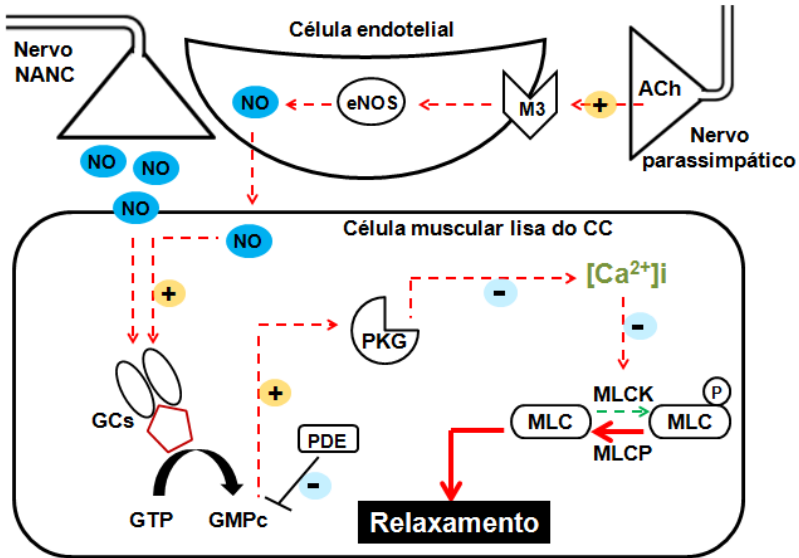
### 1.2.4 Mecanismos de relaxamento – via de sinalização NO/cGMP

Estudos funcionais utilizando preparações de corpos cavernosos isolados demonstram que a ereção é um processo mediado principalmente pelo óxido nítrico (NO) produzido pelas isoformas constitutivas de enzimas óxido nítrico sintases (NOS): a endotelial (eNOS ou NOS III) e a neuronal (nNOS ou NOS I). Uma vez liberado, tanto pelas células endoteliais quanto por terminações nervosas (NANC), o NO difunde-se para células musculares lisas adjacentes dilatando as artérias helicoidais e o músculo liso trabecular por meio da ligação ao grupamento heme da enzima ciclase de guanil solúvel (GCs) (ANDERSSON & WAGNER, 1995). Esta ativação resulta em aumento da taxa de conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). Em seguida, moléculas de GMPc ativam proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) que, por sua vez, fosforilam vários alvos, como canais iônicos de  $Ca^{2+}$  e receptores de IP3, promovendo a redução dos níveis intracelulares citosólicos de cálcio e resultando em relaxamento (Figura 2) (para revisão ver LUCAS *et al.* 2000).

Esta cascata de sinalização é regulada principalmente pela atividade da enzima fosfodiesterase (PDE, do inglês *phosphodiesterase*) do tipo 5, que tem por função quebrar a ligação de nucleotídeos cíclicos deixando-os na sua forma linear e inativa, neste caso GMP. Das onze isoenzimas conhecidas, as PDE 5, 6 e 9 são consideradas específicas para GMPc (SHAKUR *et al.* 2001; THOMPSON, 1991).

Além do NO, outras substâncias também podem mediar a ereção, entre elas, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o

peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Ambos atuam pela ativação da adenil ciclase aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico (ANDERSSON & WAGNER, 1995).



**Figura 2. Mecanismos intracelulares pelos quais o NO promove a ereção.** Diante de um estímulo sexual ocorre a ativação de fibras parassimpáticas que liberam NO, tanto diretamente, a partir de fibras NANC, como indiretamente, por meio da liberação de ACh de terminações colinérgicas que atuam sobre receptores M3 no endotélio sinusoidal. Uma vez liberado o NO difunde-se para as células musculares lisas próximas, onde ativa enzimas GCs permitindo aumento de GMPc, que por sua vez, ativa PKG. Esta, por meio da fosforilação de vários alvos, leva a diminuição dos níveis de cálcio intracelular. Como o  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para a ativação da MLCK esta diminuição leva ao relaxamento. ACh: acetilcolina; NO: óxido nítrico; GCs: ciclase de guanilil solúvel; PKG: proteína quinase dependente de GMPc; MLC: miosina de cadeia leve; PDE: fosfodiesterases; MLP: fosfatase de miosina de cadeia leve.

### 1.2.5 Mecanismos de contração

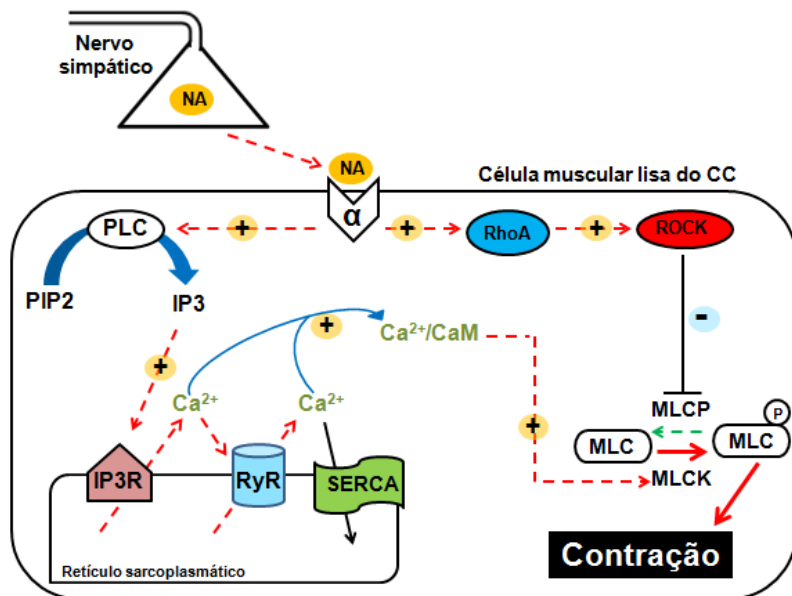
A manutenção do estado flácido do pênis é feita principalmente por fibras eferentes simpáticas que por meio da liberação de noradrenalina (NA), promovem a contração das artérias helicoidais e do corpo cavernoso. Neste tecido, são encontrados  $\alpha$ -adrenoceptores dos subtipos  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1d}$ ,  $\alpha_{2a}$  e  $\alpha_{2c}$  no músculo liso e  $\alpha_{1b}$  e  $\alpha_{2b}$  no endotélio e nervos (TRAISH *et al.* 1999). Dentre as outras substâncias vasoconstritoras mais importantes no CC, podemos citar a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), o tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e a endotelina-1 (ET-1), sintetizados por enzimas específicas localizadas tanto no músculo liso quanto no endotélio (ANDERSSON & WAGNER, 1995; TEIXEIRA *et al.* 2001).

A ligação da NA em receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, pertencentes à família de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), estimula enzimas fosfolipases C beta ( $PLC-\beta$ ) a hidrolisar fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) para liberar inositol (1,4,5) trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). Posteriormente, moléculas de  $IP_3$  ligam-se a receptores de  $IP_3$  presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (SR, do inglês *sarcoplasmic reticulum*), provocando a liberação do  $Ca^{2+}$  ali estocado. Uma vez presente em concentrações maiores no meio intracelular o  $Ca^{2+}$  livre liga-se à calmodulina (CaM), formando o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que ativa a quinase de miosina de cadeia leve (MLCK do inglês, *myosin light chain kinase*). A MLCK fosforila a MLC, o que resulta no aumento da afinidade dos filamentos grossos de miosina pelos filamentos de actina e leva à contração celular (HONG *et al.* 2011, GRATEZEK *et al.* 2009). Em paralelo, a ligação da NA ao seu receptor também ativa a via RhoA/Rho-quinase, que controla um processo no qual há aumento da força de contração de modo independente do aumento de cálcio intracelular, e que resulta na sensibilização dos filamentos contráteis ao cálcio (Figura 3) (WANG *et al.* 2002).

O cálcio é um segundo mensageiro comum que regula muitos processos celulares. Por isso, uma homeostase adequada desse íon é necessária para a regulação do tônus do músculo liso. Neste sentido, o envolvimento de três mecanismos principais pode ser destacado: i) o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular por canais regulados por voltagem; ii) a ativação de receptores

ligados à membrana que permitem a entrada de cálcio extracelular; e por fim iii) a ativação de vias de sinalização específicas que dependem da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado para o citosol (de TEJADA, 2002).

O retículo sarcoplasmático figura como o principal estoque intracelular de cálcio em células musculares, podendo armazenar concentrações milimolares do cátion (POZZAN *et al.* 1994). Funcionalmente, o SR permite a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  através da ativação dos receptores  $\text{IP}_3$  e de receptores de rionidina (RyR), iniciando o processo de contração muscular. Além disso, pode controlar o processo de relaxamento por meio da recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol pela ação da bomba de cálcio do SR (SERCA, do inglês *sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*). Esta bomba possui duas funções, causar relaxamento pela diminuição do cálcio intracelular e ao mesmo tempo restaurar o estoque de cálcio necessário para a próxima contração muscular (PERIASAMY & KALYANASUNDARAM, 2007).



**Figura 3. Mecanismos intracelulares que mantêm o corpo cavernoso flácido.** Na ausência da estimulação sexual a NA ativa receptores  $\alpha$ -adrenérgicos provocando aumento da atividade da PLC e consequente aumento de moléculas de IP3 disponíveis na célula. O IP3 promove a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular por meio de receptores de IP3 e RyR. O  $\text{Ca}^{2+}$  juntamente com a CaM, ativa a MLCK aumentando a fosforilação da MLC, levando a contração celular. Controlando este mecanismo, a SERCA recapta cálcio para dentro do SR. Paralelamente, a ativação da proteína G também pode resultar em ativação de RhoA e de seu efetor ROCK. Este último inibe a MLCP impedindo sua atividade, favorecendo a contração e a flacidez peniana. NA: noradrenalina; PLC: fosfolipase C; IP3: inositol trifosfato; IP3R: receptor de IP3; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; RyR: receptor de rionidina; SERCA: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; MLC: miosina de cadeia leve; MLCP: fosfatase de cadeia leve de miosina; MLCK: quinase de cadeia leve de miosina; CaM: calmodulina.

### 1.3 Via RhoA/Rho-quinase

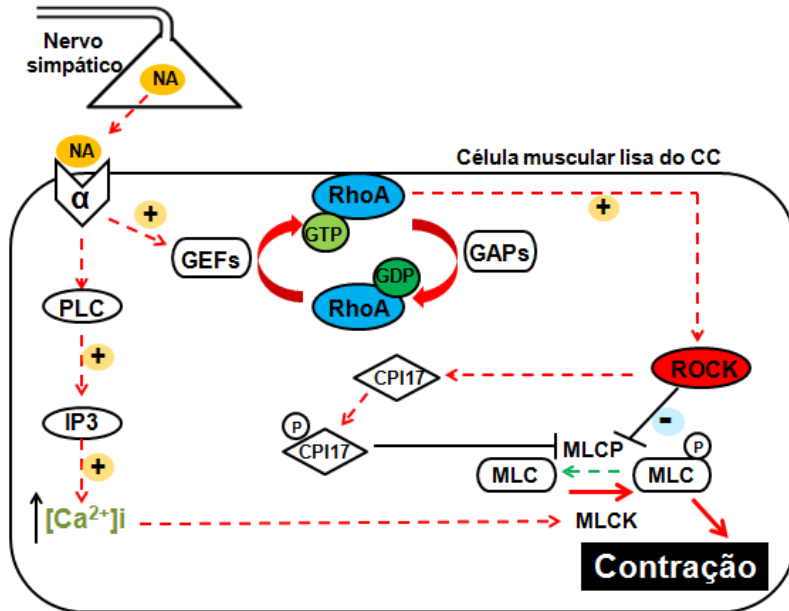
No músculo liso a ativação da via de sensibilização ao cálcio é controlada por uma proteína denominada RhoA, pertencente à superfamília Ras de proteínas G pequenas, caracterizadas pela atividade GTPase (WENNERBERG *et al.* 2005). As pequenas Rho GTPases controlam uma série de funções celulares básicas como a dinâmica do citoesqueleto, a progressão do ciclo celular, transcrição, motilidade, dentre outras (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002). Em 1992, Hirata e colaboradores, demonstraram o envolvimento da Rho na inibição da MLCP, enfatizando sua importância na manutenção do mecanismo de contração celular.

Como intermediária na transmissão de sinal dos GPCRs, a RhoA produz seus efeitos ligando-se a efetores específicos. No ano de 1996 descobriu-se que as enzimas Rho-quinases (ROCKs) seriam um desses efetores (KIMURA *et al.* 1996) e, atualmente, sabe-se que são os mais importantes. As ROCKs são serina/treonina quinases citoplasmáticas com aproximadamente 160-180 kDa de peso molecular encontradas em duas isoformas, a ROCK I e a ROCK II, sendo ambas expressas no músculo liso. Estruturalmente as ROCKs são formadas por um domínio quinase na porção N-terminal, um sítio de ligação para Rho (RBD, do inglês *Rho-binding domain*) e um domínio rico em resíduos cisteína (PH do inglês, *Pleckstrin-homology*) na região C-terminal (SOMLYO & SOMLYO, 2004; WIRTH, 2010).

Paralelamente à via de contração controlada pelo IP3 e pelo cálcio, a ligação de agonistas a certos GPCRs pode desencadear a ativação da via RhoA/Rho-quinase. Esta ativação conta com a participação de alguns mediadores, dentre eles o fator de troca do nucleotídeo guanina (GEFs) que promove a troca de uma molécula de GDP por uma de GTP ligada à RhoA e induz a diminuição da atividade de proteínas ativadoras de GTPases (GAPs), que aceleram a hidrólise do GTP ligado à RhoA, bem como reduzem a atividade de proteínas inibidoras da dissociação do GDP (GDIs), cuja ação inibe a dissociação do complexo GDP/RhoA. Estes eventos associados promovem a ativação e translocação de RhoA do citoplasma para a membrana celular (PUETZ *et al.* 2009).

Uma vez ativada a RhoA liga-se à ROCK, a qual favorece a contração celular e consequente flacidez do tecido peniano através da fosforilação de resíduos de treonina e serina na subunidade regulatória da MLCP, denominada MYPT-1 (do inglês, *myosin-phosphatase target unit*) (KIMURA *et al.* 1996; AMANO *et al.* 1996). Outro alvo importante da ROCK é a fosfatase inibitória do tipo 1 (CPI-17), que quando fosforilada é ativada e liga-se à subunidade fosfatase da MLCP, bloqueando sua função inibitória (ETO *et al.* 2004). Além do mecanismo de ativação da via RhoA/Rho-quinase descrito acima, estudos têm demonstrado que em algumas situações apenas o aumento de cálcio no citoplasma promove a translocação de RhoA para o citoplasma e a consequente ativação desta via (WANG *et al.* 2006).

A funcionalidade da via RhoA/Rho-quinase tem sido alvo de inúmeros estudos que procuram elucidar a sua participação em processos patológicos, e já está determinado que alterações na regulação dessa via podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão (ZHOU & LIAO, 2009), da aterosclerose (JIN *et al.* 2006) e da disfunção erétil (CHITALEY *et al.* 2001a).



**Figura 4. Manutenção da contração do corpo cavernoso pela via RhoA/Rhoquinase.** Paralelamente a ativação da via do IP3 (mostrada em mais detalhes na figura 3), a estimulação de proteínas GEFs ativa RhoA, que por sua vez se liga à enzima ROCK. Esta ligação pode inibir a MLCP pela ação direta da ROCK ou pela ação da ROCK sob a CPI17. Estas ações em conjunto impedem o efeito promotor do relaxamento causado pela MLCP e favorecem a contração celular induzida pelo IP3. NA: noradrenalina; PLC: fosfolipase C; GEFs: fator de troca do nucleotídeo guanina; GAPs: proteínas ativadoras de GTPases; CPI17: fosfatase inibitória do tipo 1; MLC: miosina de cadeia leve; MLCP: fosfatase de cadeia leve de miosina; MLCK: quinase de cadeia leve de miosina.

#### 1.4 Disfunção erétil

A disfunção erétil (DE), definida como “incapacidade consistente ou recorrente de alcançar ou manter uma ereção peniana adequada para uma relação sexual satisfatória” (National Institutes of Health Consensus Statements), figura como uma condição muito comum em homens de meia idade (LUE *et al.* 2004; BURCHARDT *et al.* 2000). Esta patologia pode ser procedente de problemas de natureza psicogênica ou orgânica, sendo na grande maioria (80% dos casos),



representada por disfunções do tipo orgânica, a qual é subdividida em vasculogênica (mais comum), neurogênica, anatômica e hormonal. Em caráter classificatório a DE pode ser leve, moderada ou completa (DIAZ Jr & CLOSE, 2010).

Independente da intensidade ou da etiologia primária pela qual a DE acontece o componente psicológico sempre coexiste (MILLER, 2000; DIAZ Jr & CLOSE, 2010). Efeitos adversos na qualidade de vida, no bem estar pessoal e nas relações familiares e sociais ocorrem em indivíduos nessa condição (FELDMAN *et al.* 1994). Estima-se que no mundo cerca de 152 milhões de homens estejam acometidos pela DE; além disso, perspectivas para 2025 indicam que esta doença poderá atingir até 322 milhões de homens (TSERTSVADZE *et al.* 2000; AYTA *et al.* 1999). No Brasil, um estudo epidemiológico de Moreira Jr e colaboradores, demonstrou que 46,2% dos homens entrevistados (> de 18 anos) reportaram algum grau de DE, sendo 31,5, 12,1 e 2,6% relativos a DE mínima, moderada ou completa, respectivamente (MOREIRA Jr *et al.* 2001).

A DE é a disfunção sexual mais estudada em homens (UCKERT *et al.* 2007). Em virtude disto, inúmeros avanços no entendimento dos mecanismos de ação de drogas, bem como dos mecanismos de ereção, foram elucidados e permitem a utilização de uma ampla variedade de drogas disponíveis atualmente. Historicamente, as primeiras terapias utilizadas incluíam opções cirúrgicas ou agentes injetáveis como a papaverina, a fentolamina e as prostaglandinas (EARDLEY *et al.* 2009; UCKERT *et al.* 2007). Entretanto, no final dos anos 80 e início dos anos 90, a descoberta do NO como principal mediador periférico da ereção permitiu o desenvolvimento da primeira droga oral efetiva contra a DE o sildenafil, um inibidor seletivo da PDE do tipo V (MARTINEZ-PINEIRO *et al.* 1993). Atualmente, este e outros inibidores de PDE 5, como o vardenafil e o tadalafil, são amplamente utilizados. Apesar do sucesso dos inibidores da PDE, parte dos pacientes não responde a este tratamento (EARDLEY *et al.* 2010). Por isso terapias alternativas estão sendo investigadas. Entre os compostos que estão em fase clínica de desenvolvimento encontram-se os que aumentam a liberação de dopamina no sistema nervoso central e os inibidores da Rho-quinase (ALBERSEN *et al.* 2010).

A patologia da DE é considerada uma condição multifatorial que tem o envelhecimento como um dos principais fatores associados, embora casos envolvendo homens mais jovens também tenham sido relatados (PRINS *et al.* 2002; MIALON *et al.* 2012). O estilo de vida sedentário, a obesidade, o tabagismo, a diabetes e a hipertensão estão postulados entre os fatores de risco para esta doença (DERBY *et al.* 2000). Tais fatores estão intimamente relacionados com doenças cardiovasculares (DCV), o que coloca a DE como um marcador potencialmente observável de DCV subjacentes (MINER, 2012; KIRBY *et al.* 2005).

Estudos anteriores demonstraram que uma parte dos pacientes hipertensos também apresenta DE, sendo que a gravidade de uma desordem é proporcional à gravidade da outra (CHITALEY *et al.* 2001b; BUCHARDT *et al.* 2000). Em virtude destes e de outros estudos, a relação entre a hipertensão e a DE tem sido bem aceita. Em adição, o consumo excessivo de sal é admitido como fator ambiental relacionado à hipertensão. Logo, indivíduos que ingerem quantias excessivas desse mineral podem comprometer sua função erétil devido a prejuízos na regulação da pressão arterial. Apesar disso, pesquisas apontam que mecanismos intracelulares podem causar efeitos danosos à vasculatura, de modo independente da hipertensão (SCHIFFRIN, 2005). Ao considerar isto, foi possível hipotetizar que o consumo excessivo de sal poderia causar detrimento da resposta erétil independente do acometimento da pressão arterial. Tendo em vista que alterações na via RhoA/Rho-quinase foram observadas em animais expostos à dieta hipersódica (CRESTANI *et al.* 2012), é possível que modificações nesta mesma via causem efeitos no corpo cavernoso que contribuam para o desenvolvimento da DE.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1 Objetivo geral

Investigar as alterações decorrentes da ingestão exacerbada de sal no corpo cavernoso e na função erétil de ratos, bem como, explorar a participação da via RhoA/Rho-quinase neste processo.

## 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a diurese, a variação no peso de órgãos e a pressão arterial sistólica destes animais;
- Avaliar o efeito de substâncias contráteis e relaxantes sobre o corpo cavernoso de ratos tratados com dieta hipersódica;
- Investigar o efeito do composto Y-27632 em corpos cavernosos de ratos tratados com dieta hipersódica;
- Avaliar o efeito da estimulação elétrica de campo sobre estes tecidos;
- Avaliar a função erétil de animais expostos à dieta com excesso de sal.

### **3. METODOLOGIA**

---

### 3.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade e pesando entre 190-240 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, com luminosidade e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/escuro;  $22 \pm 2$  °C, respectivamente) e tiveram livre acesso à água e ração até o início do tratamento. Todo o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o protocolo PP00706.

### 3.2 Grupos experimentais

Tanto estudos pioneiros (MENEELY *et al.* 1952; DAHL, 1961), como pesquisas mais recentes (YU, *et al.* 1998; WALKER *et al.* 2012) utilizam entre 0,3, e 8,0% de NaCl na dieta hipersódica de roedores, em virtude disso e na tentativa de selecionar uma porcentagem intermediária de NaCl para ser utilizada no presente estudo, a concentração de 4% foi escolhida.

Os animais foram divididos de maneira aleatória em dois grupos experimentais. O grupo controle recebeu ração comercial padrão contendo 0,27% de NaCl, enquanto o grupo tratado recebeu ração acrescida de 4% de NaCl. Ambos os grupos foram ainda subdivididos em outros cinco grupos de acordo com o período de exposição à dieta, sendo analisados ao final de 2, 4, 8, 12 ou 24 semanas de tratamento.

### 3.3 Preparação isolada: corpo cavernoso

Após os períodos pré-estabelecidos de exposição ao sal, os animais foram mortos por superdosagem da mistura anestésica de cetamina e xilazina e tiveram o pênis cuidadosamente removido. Em seguida, o tecido foi colocado em uma placa de petri contendo solução salina fisiológica (PSS) para a retirada de tecidos aderentes e isolamento de duas tiras de corpo cavernoso. Para isso foram removidas a veia dorsal peniana e o tecido esponjoso e, em seguida, as tiras foram montadas em cubas de vidro de 6 ml contendo PSS e ligadas a

um transdutor de força isométrica acoplado ao sistema de aquisição de dados (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália). Para ensaios de estimulação elétrica de campo estes tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina (um anel acima e um gancho abaixo) e conectados a estimulador elétrico (12206, PanLab, Espanha).

Em todos os experimentos as tiras foram mantidas sob tensão basal de 250 mg (conforme dados obtidos durante a validação do modelo descrito no item 3.4.1.1), ajustadas à cada troca de PSS (intervalos de 15 minutos), a qual foi mantida a 37 °C, pH 7,4 e borbulhada continuamente com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A composição do PSS utilizado foi (em mM): NaCl (130), KCl (4,7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,18), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,17), NaHCO<sub>3</sub> (14,9), Dextrose (5,5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,6) e EDTA (0,08).

### **3.4 Protocolos experimentais**

#### **3.4.1 Validação da metodologia de corpo cavernoso isolado de rato**

##### ***3.4.1.1 Padronização da tensão basal***

Tiras de corpo cavernoso de animais naïve foram submetidas a tensões basais de 150, 200, 250 ou 300 mg durante um período de estabilização de 45 minutos. Ao término da estabilização os tecidos foram contraídos com fenilefrina (PE 3 µM). Quinze minutos após, as preparações foram lavadas novamente e estabilizadas por mais 60 minutos, seguidos de nova exposição à PE, porém na concentração de 10 µM. Por fim, após nova estabilização de 60 minutos os tecidos foram contraídos novamente com PE (30 µM) pelo mesmo período de tempo. Após a realização deste ensaio a tensão basal escolhida para os experimentos subsequentes foi 250 mg.

##### ***3.4.1.2 Avaliação da reatividade ao KCl***

Após um período de estabilização de 45 minutos, a PSS contida nas cubas foi substituída por solução de cloreto de potássio (KCl) na concentração de 60, 80 ou 120 mM durante 15 minutos. Em seguida as preparações foram lavadas e estabilizadas por mais 30 minutos para nova exposição ao KCl 60, 80 ou 120 mM, porém

alternando-se a cuba para evitar exposição de uma mesma concentração de KCl no mesmo tecido. Por fim, depois de lavadas e novamente estabilizadas, as tiras foram igualmente contraídas de maneira alternada com KCl 60, 80 ou 120 mM. Neste protocolo cada uma das preparações foi exposta às três concentrações de KCl.

#### *3.4.1.3 Avaliação da reatividade à PE após pré-exposição ao KCl ou ao KCl e à PE*

Seguindo protocolo semelhante ao descrito no item anterior, após 45 min de estabilização os tecidos foram expostos ao KCl 80 mM (por 15 min) e 30 minutos depois à PE (10  $\mu$ M). Posteriormente as tiras foram estabilizadas por 60 minutos e nova exposição à PE na mesma concentração anterior foi realizada. Após a realização deste experimento em todos os demais protocolos os corpos cavernosos utilizados para experimentos em banho de órgãos foram estabilizados por 60 minutos, contraídos com KCl (80 mM) e, 30 minutos depois, expostos à PE (10  $\mu$ M), antes da realização dos demais protocolos experimentais.

#### *3.4.1.4 Avaliação da reatividade e manutenção do tônus contrátil à fenilefrina*

Após um período de estabilização de 1 hora foi adicionada PE (1, 3 ou 10  $\mu$ M) às cubas e 60 minutos depois de nova estabilização os tecidos foram novamente expostos à PE, nas mesmas concentrações anteriores, porém alternando-se a concentração utilizada em cada preparação. Por fim, após nova estabilização de 60 min, as tiras foram expostas novamente a PE nas mesmas concentrações anteriores e também de modo alternado em cada uma das tiras. Neste protocolo, cada uma das preparações foi exposta às três concentrações de PE.

Em protocolo semelhante ao descrito acima, outro grupo de tiras de corpo cavernoso foi estabilizado durante 60 minutos e em seguida exposto à PE (10  $\mu$ M), sendo a contração evocada por essa droga registrada e mensurada ao longo de 30 minutos.



### **3.4.2 Investigação da influência da dieta hipersódica sobre a reatividade do corpo cavernoso de ratos**

#### *3.4.2.1 Avaliação da reatividade ao KCl e à PE*

Após o período de estabilização de 45 minutos, tiras de corpo cavernoso foram expostas a solução de cloreto de potássio (80 mM) durante 15 minutos. Em seguida, as preparações foram lavadas e estabilizadas por mais 30 minutos para adição de PE (10  $\mu$ M) na cuba e avaliação da reatividade a esse agonista.

#### *3.4.2.2 Avaliação da resposta contrátil à fenilefrina*

Após a verificação da viabilidade e reatividade das preparações (item 3.4.2.1), os tecidos foram lavados e estabilizados por mais 60 minutos para a realização de uma curva concentração-resposta (CCR) por meio da adição de concentrações cumulativas e crescentes dessa mesma droga (10 nM à 100  $\mu$ M).

#### *3.4.2.3 Análise dos efeitos do inibidor da enzima Rho-quinase Y-27632*

Após a verificação da viabilidade e reatividade (item 3.4.2.1), os tecidos foram estabilizados durante 60 minutos sendo que, nos 15 minutos finais deste período de estabilização foram incubados veículo (PSS) ou composto Y-27632 (1  $\mu$ M), seguido pela exposição a concentrações crescentes e cumulativas de PE (10 nM à 100  $\mu$ M). Em seguida, as tiras anteriormente incubadas com veículo foram novamente estabilizadas por 1 hora e pré-contraídas com PE (10  $\mu$ M). Na fase tônica desta contração adicionou-se concentrações crescentes e cumulativas do composto Y-27632 (1 nM à 100  $\mu$ M), com intervalos de 10 min entre cada adição.

### **3.4.3 Análise dos efeitos da estimulação elétrica de campo (EEC) sobre o corpo cavernoso de animais controle e tratado com dieta hipersódica por 24 semanas**

Em virtude dos resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente, os protocolos apresentados a partir desse ponto foram realizados apenas em ratos expostos à dieta

hipersódica durante 24 semanas e seus controles correspondentes. Após a verificação da viabilidade e reatividade dos tecidos (item 3.4.2.1) os seguintes protocolos foram realizados:

#### *3.4.3.1 Análise da contração induzida pela EEC e dos efeitos da inibição da síntese do óxido nítrico*

Após estabilização de 1 hora, os tecidos foram submetidos a estimulação elétrica de campo (EEC) aplicada na forma de trens de pulsos retangulares de 1 ms de duração e intensidade supramáxima de 20 V por 10 segundos, em frequências de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 Hz, sendo que cada tren de pulso foi aplicado quando a resposta evocada pelo tren precedente havia terminado por completo. Este protocolo de estimulação permitiu a construção de uma curva frequência-resposta (CFR). Em seguida, após novo intervalo de 30 min para estabilização, as preparações foram incubadas com atropina (ATR) e L-NAME nas concentrações de 1 e 100  $\mu\text{M}$  respectivamente, também por 30 min. Ao término desse período foi obtida uma nova CFR nos mesmos moldes da primeira.

#### *3.4.3.2 Análise do relaxamento induzido pela EEC*

Nos 45 min finais do período de estabilização de 1 h, foram adicionados a cuba 30  $\mu\text{M}$  de guanetidina (GNT). Em seguida e ainda na presença de GNT, a preparação foi exposta à PE (10  $\mu\text{M}$ ) e, após estabilização da resposta contrátil a esta droga, foi realizada uma CFR (1-128 Hz) nos mesmos moldes descritos no item anterior.

#### *3.4.3.3 Efeitos do inibidor da Rho-quinase sobre a contração induzida pela EEC*

Após 60 min da verificação da viabilidade e reatividade das tiras (item 3.4.2.1), foi realizada uma CFR para a EEC em frequências de 1 a 128 Hz. Após mais 45 min de estabilização foi incubado 1  $\mu\text{M}$  do composto Y-27632 por 15 minutos e em seguida a CFR foi repetida. De modo semelhante, em um segundo momento e após novo período de estabilização de 45 min, foi incubado composto Y-27632 (3  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos, seguidos da construção de nova CFR ao EEC.

### **3.4.4 Avaliação de alterações na mobilização de cálcio intra e extracelular no corpo cavernoso por meio de experimentos funcionais**

Após a verificação da viabilidade e reatividade dos tecidos (item 3.4.2.1) os seguintes protocolos foram realizados:

#### *3.4.4.1 Reatividade ao $\text{CaCl}_2$ extracelular*

Nos 15 min finais do período de equilíbrio de 1 h, a PSS contida nos banhos foi substituída por PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$ . Ao final dos 15 minutos, os tecidos foram expostos à PE (10  $\mu\text{M}$ ) e em seguida, ainda na presença de PE, foi realizada uma CCR ao próprio  $\text{CaCl}_2$  (3  $\mu\text{M}$  a 10 mM).

#### *3.4.4.2 Avaliação do envolvimento do cálcio intracelular na contração induzida pela PE*

Após 30 min da exposição ao KCl 80 mM, os tecidos foram contraídos com PE (10  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, as preparações foram lavadas e estabilizadas por 60 minutos e nos últimos 15 min desse período de estabilização a PSS contido nas cubas foi substituída por PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$  e nova exposição à PE (10  $\mu\text{M}$ ) foi realizada.

#### *3.4.4.3 Avaliação do envolvimento do cálcio intracelular na contração induzida pela EEC*

A PSS contida nos banhos foi substituído por PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$  durante os 15 minutos finais do período de 60 min estabilização. Ao término deste tempo, uma CFR (1-128 Hz) foi obtida. Para fins de comparação, outras tiras de CC foram estabilizadas por 60 min em PSS contendo  $\text{CaCl}_2$  e submetidas a uma CFR (1-128 Hz).

### **3.4.5 Efeitos da inibição da SERCA sobre a contração induzida pelo EEC**

Após a verificação da viabilidade e reatividade (item 3.4.2.2), os tecidos foram estabilizados por 45 min. Ao término deste período, as tiras foram mantidas em PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$  por 15 min e uma CFR (1-128 Hz) foi obtida. De modo

similar, as mesmas tiras foram novamente estabilizadas por 45 min, em seguida a PSS foi substituída por PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$  e realizou-se a incubação de tapsigargina (TAPSI) (1  $\mu\text{M}$ ). Após 15 min uma nova CFR (1-128 Hz) foi realizada.

### **3.5 Coleta e avaliação do peso de tecidos**

Para verificação de possíveis alterações causadas pela exposição à dieta hipersódica foram mensurados o peso úmido do rim e testículo direito (testículo, epidídimo e tecidos adjacentes), bem como do coração (ventrículos), uma vez que está bem demonstrado que o excesso de sal pode provocar aumento da massa do ventrículo cardíaco esquerdo (FROHLICH *et al.* 1993).

Estes tecidos foram removidos de animais anteriormente utilizados para experimentos em sistema de órgão isolado. Os resultados relativos a esta análise estão apresentados como a razão entre o peso de cada tecido avaliado e o peso corporal do respectivo animal.

### **3.6 Avaliação da diurese**

Para análise da diurese, animais dos grupos controles e tratados com NaCl 4% foram alocados em gaiolas metabólicas (um animal por gaiola), mantidas em sala com temperatura controlada de 22 °C, com livre acesso a água, porém privados de comida. A urina foi coletada e mensurada nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas após a colocação dos animais nas gaiolas. Ao término do experimento foram avaliados o volume total de urina eliminada por animal, o pH e a densidade da amostra. Todos os animais foram ambientados nas gaiolas metabólicas durante 3 horas no dia anterior ao experimento.

### **3.7 Medida não invasiva de pressão arterial por plestimografia (tail cuff)**

Para mensuração da pressão arterial sistólica (PAS) os animais foram transferidos para sala aquecida a 30 °C pelo período de 30 minutos antes da realização do experimento. Posteriormente, cada animal foi alocado em um contensor de acrílico e teve um manguito acoplado a um transdutor de pressão (modelo MLT125R, AD Instruments, Austrália) envolvido em sua cauda. Os dados

referentes à PAS foram registrados através de software específico (Chart v.7.2, AD Instruments, Austrália). Foram realizadas no mínimo 3 e no máximo 5 medidas de pressão para determinar a PAS média de cada animal.

### **3.8 Ereção induzida por apomorfina**

A avaliação do número de ereções induzidas pela apomorfina foi conduzida em animais previamente ambientados durante 30 minutos nas caixas de observação, antes da administração da droga e filmagem. Nestes experimentos, animais conscientes receberam uma injeção subcutânea (s.c.) de veículo (preparação de solução salina 0,9 g/100mL e ácido ascórbico 100 µg/mL) ou apomorfina (80 µg/kg) na região do dorso. Imediatamente após a injeção os ratos foram novamente alocados nas caixas de teste sem contato visual ou físico, para serem filmados durante o período de 40 min. A câmera foi posicionada abaixo das caixas para permitir melhor visualização do pênis.

Através das imagens foi avaliado o tempo de latência para a primeira ereção, o número e a duração das ereções obtidas por cada animal. Foram consideradas ereções somente os eventos nos quais foi possível observar o pênis do animal ereto, acompanhado de lordose na qual o animal se apoia nas patas traseiras, inclinando o corpo para frente, segurando o pênis com as patas dianteiras e fazendo a lambedura do mesmo. Eventos em que não foi observada a ereção, porém os outros comportamentos ocorreram, foram contados como lambeduras.

### **3.9 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). O número de animais em cada grupo experimental variou de 4 a 10. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism® versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para análise dos testes paramétricos pareados ou não-pareados, utilizou-se teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo post hoc de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3.10 Drogas e reagentes

As seguintes drogas ou reagentes foram utilizados neste estudo: fenilefrina, acetilcolina, atropina, guanetidina, L-NAME, tapsigargina, ácido ascórbico (comprados da Sigma-Aldrich Co. SainLouis, EUA), composto Y-27632 – (R)-(+)-trans-4-(1-Aminoetil)-N-(4-Piridil)ciclohexanocarboxamida dihidroclorido, apomorfina (comprados da Tocris Bioscience), cetamina e xilazina (Syntec do Brasil). Todos os sais utilizados para o preparo da PSS também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

A guanetidina e os anestésicos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Giles Alexander Rae e pelo PPGF, respectivamente.

## **4. RESULTADOS**

---

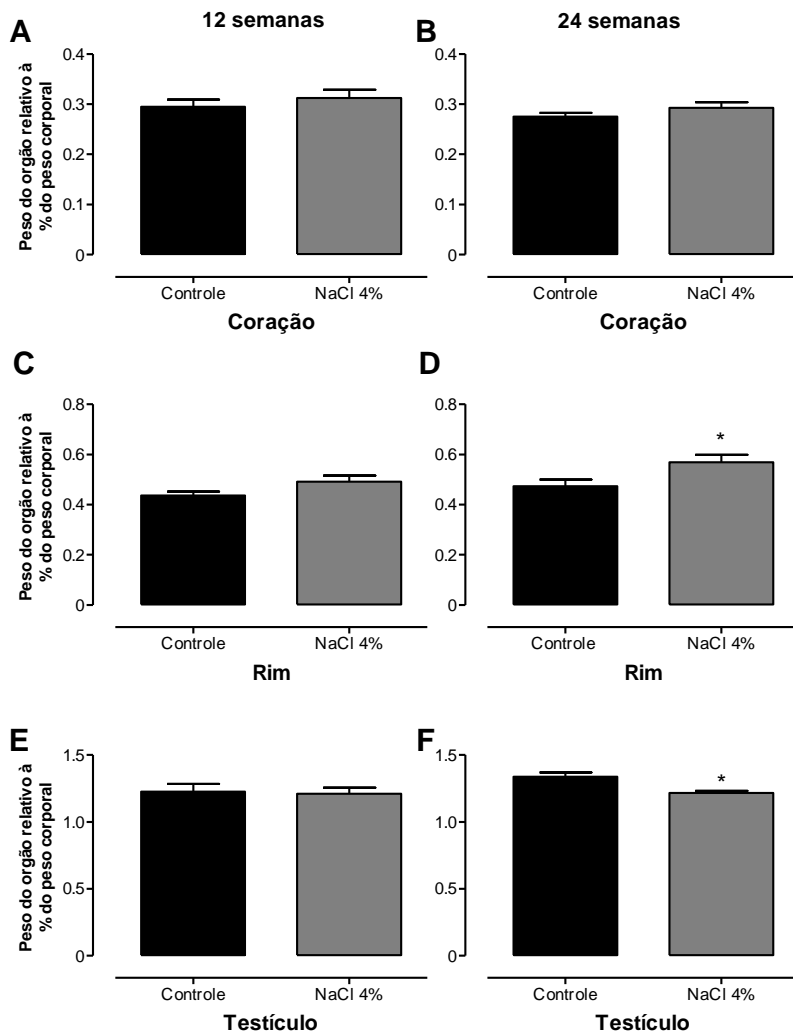
#### **4.1 Variação no peso de órgãos, diurese e pressão arterial de animais submetidos ao modelo de dieta hipersódica**

Objetivando caracterizar nosso modelo de estudo, alguns parâmetros anatômicos e fisiológicos dos animais foram verificados. A exposição ao sal não provocou alterações significativas em tecidos removidos de animais tratados com dieta hipersódica por 2, 4, 8 (dados não mostrados) ou 12 semanas (Figuras 5A, 5C, 5E). Entretanto, quando os animais consumiram sal em excesso ao longo de 24 semanas ocorreu aumento significativo do peso renal (Figura 5D) e diminuição do peso testicular (Figura 5F). O peso do coração foi similar entre animais tratados e seus respectivos controles (Figura 5B).

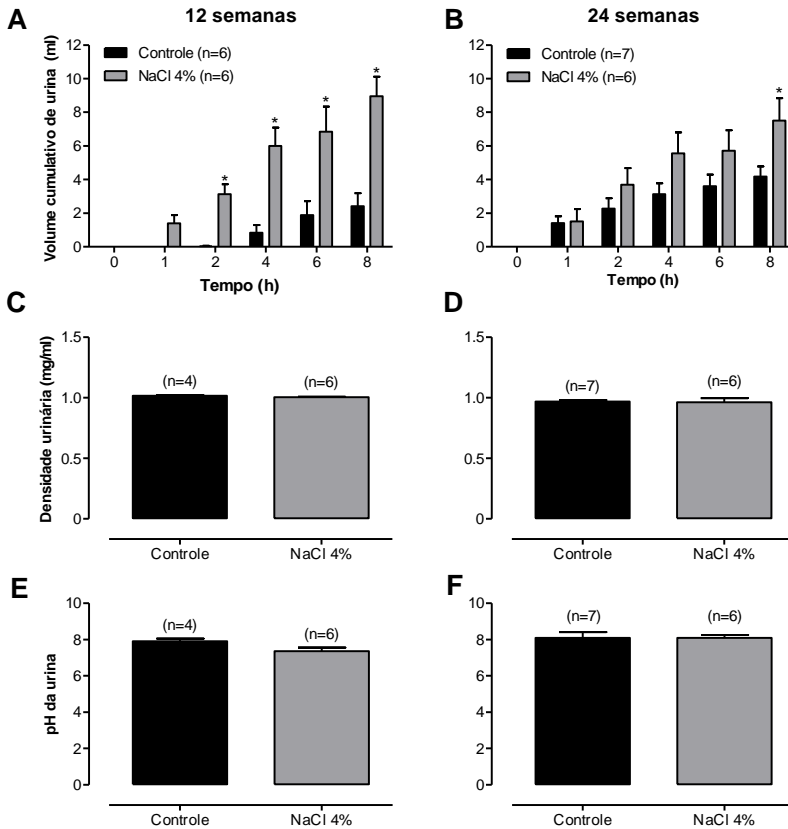
Além de avaliar o peso dos tecidos removidos, a diurese dos animais foi verificada. Nas figuras 6A e 6B observa-se que, quando comparados aos seus respectivos controles, os animais tratados com dieta hipersódica tiveram aumento no volume de urina. Por outro lado, o pH e a densidade urinária não foram afetados pelo tratamento (Figura 6C, D, E e F). As mesmas respostas foram observadas em animais expostos ao tratamento por tempos menores (dados não mostrados).

Considerando a íntima associação entre o consumo elevado de sódio e o aparecimento da hipertensão, a pressão sistólica dos animais foi mensurada. Não foram verificadas alterações neste parâmetro em animais dos grupos expostos à dieta hipersódica durante 2, 4 ou 8 semanas (dados não mostrados), bem como, nos animais que foram submetidos à dieta por períodos mais prolongados (Figuras 7A, 7B).

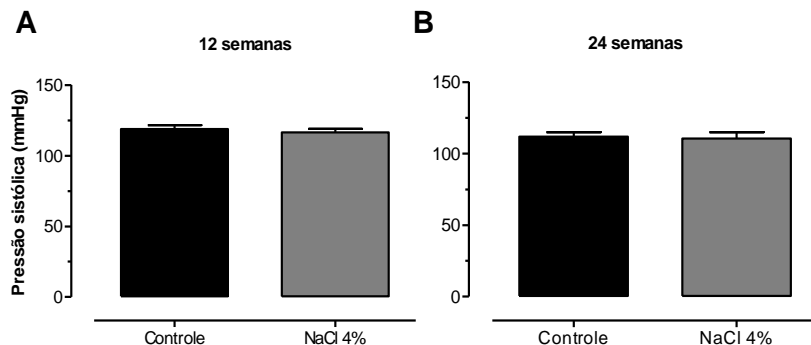




**Figura 5. Alterações no peso úmido de tecidos de ratos expostos à dieta hipersódica.** Os painéis A, C e E expressam, em porcentagem do peso corporal, o peso dos tecidos (coração; rim direito; testículo direito) removidos de animais tratados por 12 semanas e seus controles. Os painéis B, D e F são referentes a amostras (coração; rim direito; testículo direito) removidas do grupo 24 semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=8$ ), \* indica valor de  $p<0,05$ , segundo análise utilizando teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.



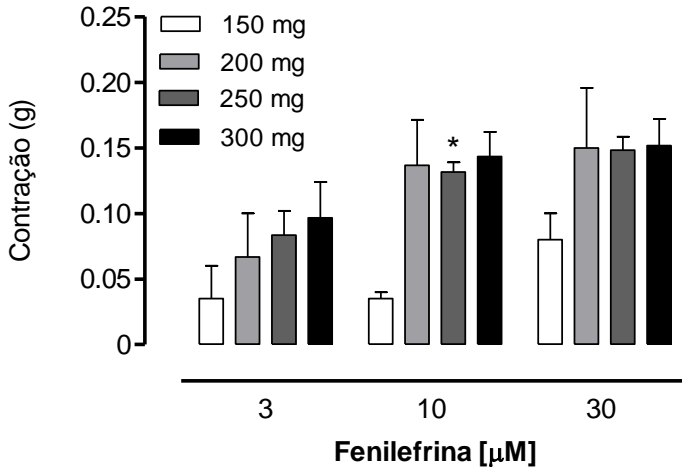
**Figura 6. Avaliação da diurese em animais controle e tratados com dieta hipersódica.** Em A e B, volume de urina produzida ao longo de 8 horas, em animais dos grupos de 12 ou 24 semanas de tratamento, conforme indicação na figura. Em C e D densidade urinária (em mg/ml). Em E e F pH urinário. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , segundo análise utilizando ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni (A e B) e teste *t* de Student para amostras não pareadas (C, D, E e F).



**Figura 7. Análise da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos tratados com dieta hipersódica ou ração padrão (controle).** Em A, PAS de animais tratados por 12 semanas. Em B, PAS de animais tratados por 24 semanas. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (teste *t* de Student para amostras não pareadas,  $n=5$ ).

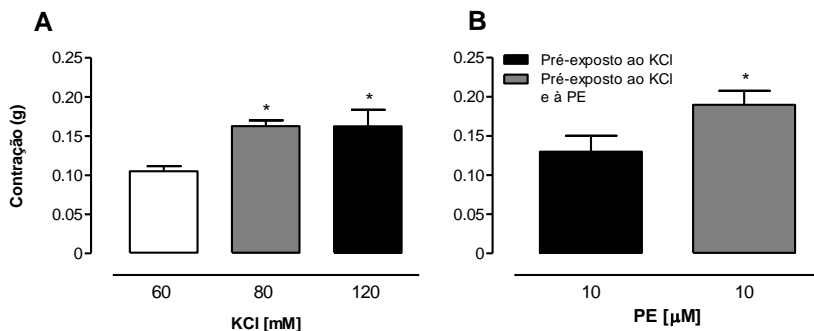
#### 4.2 Padronização do modelo de corpo cavernoso isolado

Para padronizar o modelo de corpo cavernoso isolado de rato, alguns parâmetros funcionais foram mensurados. Primeiramente foi determinada a tensão basal ótima para a realização dos experimentos. Como ilustra a figura 8, a adição de fenilefrina à cuba causou contrações de modo dependente da concentração em todas as tensões utilizadas (150, 200, 250 e 300 mg). Porém, a contração promovida por 10  $\mu$ M de PE em tiras sob tensão de 250 mg foi significativamente maior do que a contração obtida nas preparações sob tensão de 150 mg. Além disso, as tiras sob tensão de 250 mg responderam de maneira mais homogênea quando comparadas às tiras submetidas a tensão basal de 200 mg. Finalmente, o aumento da tensão basal para 300 mg não resultou em diferenças significativas na reatividade das preparações.



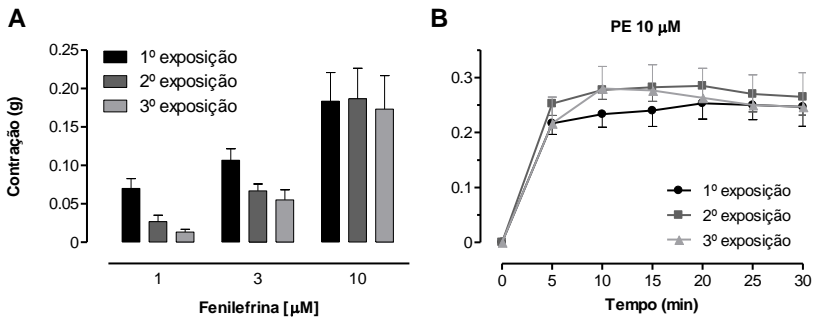
**Figura 8. Resposta contrátil à fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais naïve.** A tensão basal aplicada a cada grupo esta indicada na legenda da figura. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5), \* indica valor de  $p < 0,05$ , segundo análise utilizando ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

Uma vez determinado 250 mg como tensão ideal a ser utilizada em nossos experimentos, seguiu-se a padronização de protocolos que pudessem viabilizar a confiabilidade dos experimentos subsequentes. Para isso utilizamos KCl como ferramenta para estimar a viabilidade e a capacidade contrátil das tiras de músculo liso de corpo cavernoso. Na figura 9A observamos que as concentrações de 80 e 120 mM de KCl provocaram respostas contráteis semelhantes entre si e significativamente maiores que aquela promovida pela concentração de 60 mM. Além disso, observamos que quando as preparações eram expostas ao KCl (80 mM) e, subsequentemente à PE (10 µM), a reatividade à PE era aumentada significativamente nas demais exposições à esse agonista de receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos (Figura 9B).



**Figura 9. Efeitos da adição de cloreto de potássio ou fenilefrina em tiras corpo cavernoso de animais naïve.** Em **A**, contrações causadas por cloreto de potássio. Em **B** efeito da fenilefrina (10 µM) após pré-exposição ao KCl (80 mM) (barra preta) ou pré-exposições ao KCl (80 mM) e em seguida à PE (10 µM) (barra cinza). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=8), \* indica valor de  $p < 0,05$ , em relação à resposta induzida por KCl 60 mM em A [segundo análise utilizando ANOVA de uma via seguida de Bonferroni] e em relação ao grupo pré-exposto apenas ao KCl em B [teste *t* de Student para amostras não pareadas].

Ainda durante as etapas de padronização do modelo no laboratório foi averiguado se a reatividade do tecido cavernoso à fenilefrina seria mantida mesmo após várias exposições a essa droga. Para tanto, cada tira foi exposta a três concentrações de PE (1, 3, e 10 µM), mas administradas de forma randomizada respeitando-se intervalos de 60 minutos entre cada exposição. Como resultado, observamos que a concentração de 10 µM de PE promoveu contrações de amplitude semelhante nos três momentos em que foi adicionada à cuba, enquanto que as demais concentrações (1 e 3 µM) tiveram seus efeitos reduzidos (Figura 10A). Além disso, a concentração de 10 µM foi capaz de manter o tônus do tecido cavernoso ao longo do período de manutenção das preparações no sistema de órgão isolado (30 minutos), também nas três exposições (Figura 10B).

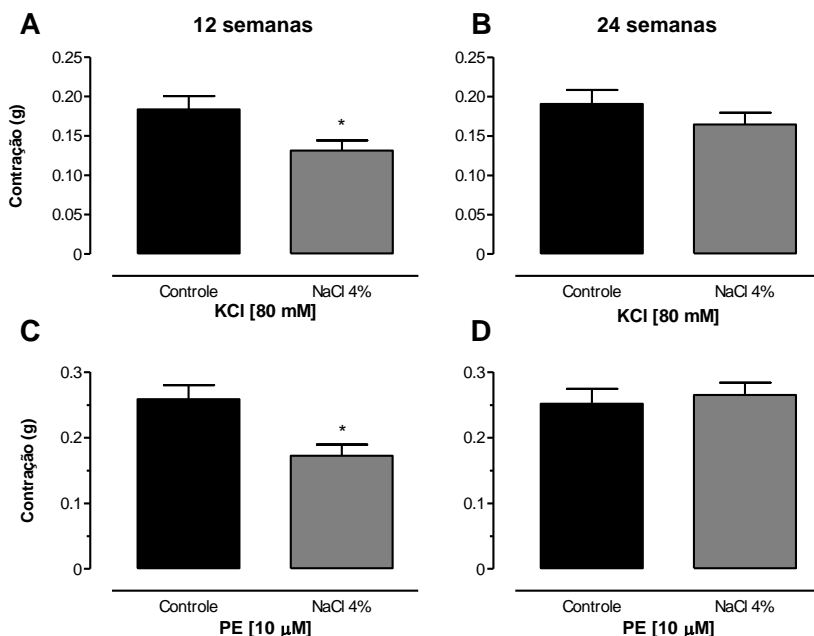


**Figura 10. Efeitos da fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais naïve.** Em A, contrações causadas pela PE (1, 3 ou 10 µM) em três momentos diferentes, conforme indicado na figura. Em B, manutenção da resposta à PE (10 µM) ao longo de 30 minutos. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=5). Não foram encontradas alterações significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

### 4.3 Avaliação da influência da dieta hipersódica na reatividade de corpos cavernosos a agentes contráteis e relaxantes

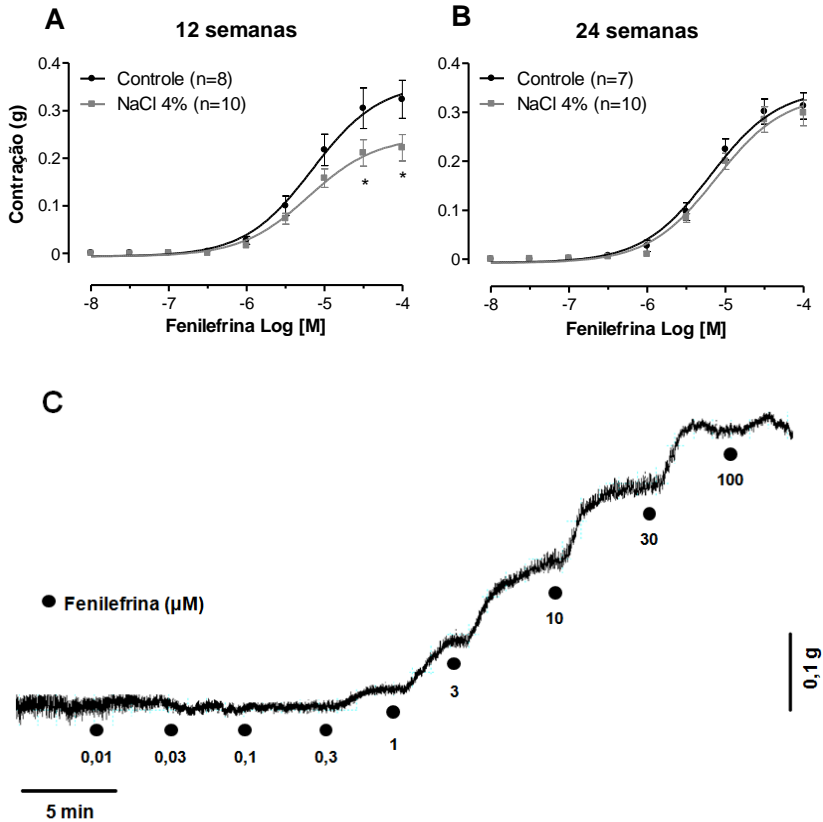
#### 4.3.1 Resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em tiras de corpo cavernoso de animais controle e tratados com dieta hipersódica

A avaliação da reatividade das preparações à solução de KCl 80 mM demonstrou uma diminuição da contração máxima nos corpos cavernosos do grupo em dieta com NaCl 4% por 12 semanas (Figura 11A), quando comparados aos seus respectivos controles, mas não no grupo 24 semanas (Figura 11B). O mesmo foi encontrado na contração induzida por PE 10 µM, uma diminuição significativa da resposta em corpos cavernosos de animais do grupo 12 semanas (Figura 11C), enquanto que as preparações do grupo 24 semanas responderam de forma semelhante ao grupo controle (Figura 11D).



**Figura 11. Efeito do KCl e da fenilefrina em corpos cavernosos de animais controle e tratados com dieta hipersódica por 12 ou 24 semanas.** Em A e B contração induzida por KCl (80 mM) em tecidos de animais controle e NaCl 4% tratados por 12 ou 24, semanas respectivamente. Em C e D, contração induzida por PE (10 μM) em tecidos de animais controle e NaCl 4% tratados por 12 ou 24 semanas, respectivamente. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=8), \* indica valor de  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle correspondente segundo análise utilizando teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.

A realização de CCRs para fenilefrina confirmou que o CC do grupo em dieta de NaCl 4% por 12 semanas teve resposta contrátil reduzida quando comparado ao grupo controle (Figura 12A). Por outro lado, as tiras de corpo cavernoso removidas de animais tratados por 24 semanas responderam à fenilefrina do mesmo modo que tiras de animais controle (Figura 12B). Um registro típico de uma curva de respostas dependentes da concentração, obtida por meio da adição de concentrações crescentes de PE em uma tira de corpo cavernoso removida de um animal controle (24 semanas) é mostrado na figura 12C.



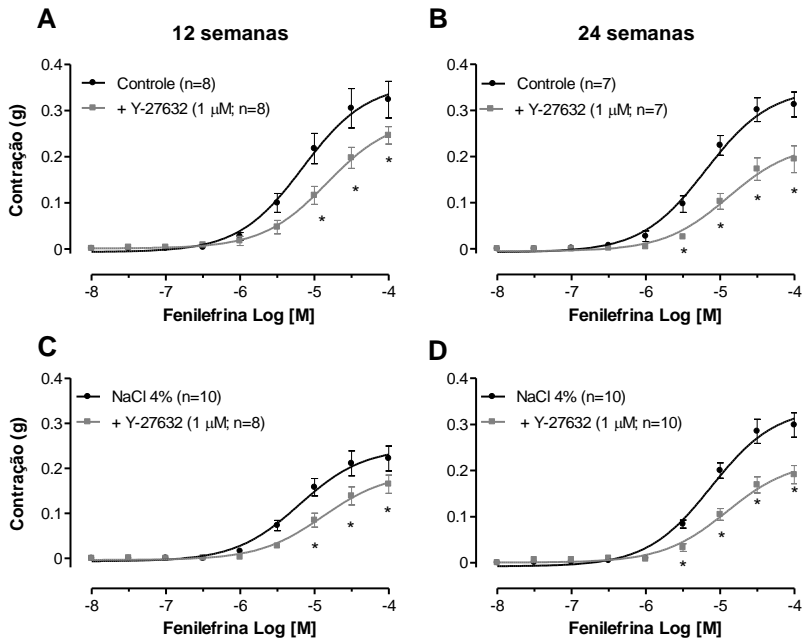
**Figura 12. Efeito da fenilefrina sobre tiras de corpo cavernoso de animais controle e tratados com dieta hipersódica.** Em A, diminuição da reatividade PE em corpos cavernosos de animais tratados por 12 semanas. Em B, efeito da PE em corpos cavernosos de animais controle ou tratados por 24 semanas. Em C, registro típico de uma curva de respostas dependentes da concentração à PE em preparação obtida de animal do grupo controle. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , segundo análise utilizando ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.



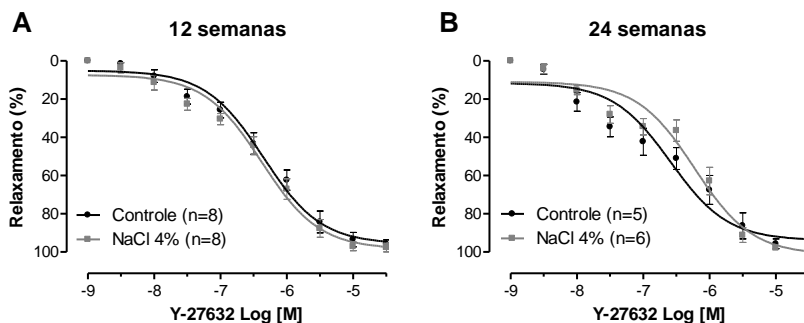
#### 4.3.2 Influência do composto Y-27632 na resposta contrátil e relaxante de corpos cavernosos

Na tentativa de verificar se a ingestão elevada de sódio é capaz de alterar o funcionamento da via RhoA/Rho-quinase no corpo cavernoso de ratos, as preparações foram incubadas com composto Y-27632 (1  $\mu$ M) 15 min antes da adição de concentrações crescentes e cumulativas de PE na presença do composto Y-27632. Nossos dados revelaram que o inibidor da ROCK provocou diminuição significativa, mas semelhante, da resposta contrátil induzida pela fenilefrina tanto nos tecidos oriundos de animais tratados (12 e 24 semanas) quanto nos tecidos de animais controles (Figura 13).

Além do efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida por PE, verificamos o efeito relaxante do mesmo. Para isso, as preparações foram contraídas com PE (10  $\mu$ M) e, na vigência da fase tônica da contração obtida adicionou-se concentrações cumulativas do composto Y-27632, com intervalos de dez minutos entre cada exposição. Como resultado, obtivemos curvas de relaxamento que não diferiram entre si; deste modo os corpos cavernosos dos grupos 12 e 24 semanas não demonstraram quaisquer alterações no relaxamento induzido por composto Y-27632, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 14).



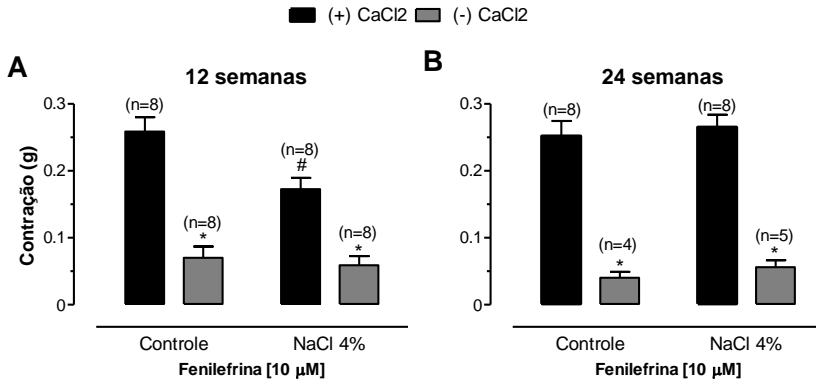
**Figura 13. Efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida pela PE.** Em A e B, inibição do efeito da PE causado pelo composto Y-27632 em preparações de animais controle (expostos à dieta normosódica) por 12 ou 24 semanas, respectivamente. Em C e D, inibição do efeito da PE causado pelo composto Y-27632 em preparações de animais tratados com dieta hipersódica por 12 e 24 semanas, respectivamente. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , quando comparado ao seu respectivo controle (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).



**Figura 14. Relaxamento causado pelo composto Y-27632 em tiras de corpo cavernoso pré-contraídas com fenilefrina.** Em A e B, efeito do composto Y-27632 em preparações de animais controle e tratados por 12 ou 24 semanas, respectivamente. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

#### 4.3.3 Influência da liberação do cálcio de estoques intracelulares na reatividade à fenilefrina

Nesse experimento objetivou-se determinar se alterações na mobilização de cálcio intracelular poderiam ocorrer em tecidos de animais tratados com dieta hipersódica 4%. Para tanto, foram realizadas contrações induzidas por PE (10  $\mu$ M) em tiras mantidas em líquido nutritivo sem cálcio por 15 minutos. Os valores mensurados demonstraram que a ausência de cálcio no líquido nutritivo resultou em diminuição significativa da contração evocada pela PE em ambos os grupos controle e tratado com dieta hipersódica por 12 semanas (Figura 15A), bem como nos grupos controle e tratado durante 24 semanas (Figura 15B).

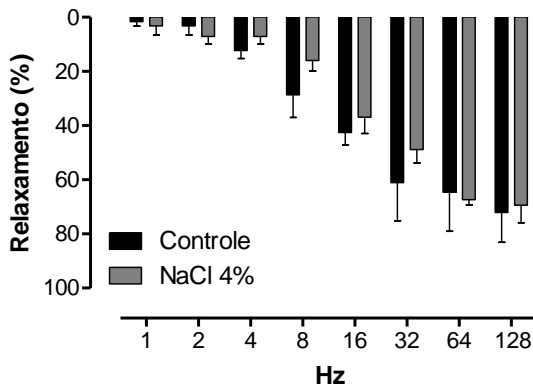


**Figura 15. Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pela fenilefrina.** Em A e B, resposta contrátil induzida pela PE (10 µM) em tiras de animais controle (dieta normosódica) e tratados por 12 ou 24 semanas com dieta hipersódica, respectivamente, mantidas em líquido nutritivo sem cálcio (barras cinza). As barras pretas mostram respostas à PE (10 µM) quando as preparações foram mantidas em líquido nutritivo regular (PSS com cálcio). Resultados expressos como média ± erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , quando comparado à resposta obtida no mesmo grupo na presença de cálcio (barras pretas), # indica valor de  $p < 0,05$  quando comparado às respostas obtidas no grupo controle (dieta normosódica) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

Os tecidos removidos de animais tratados com dieta hipersódica durante 2, 4 e 8 semanas apresentaram reatividade similar aos seus respectivos controles nos parâmetros descritos no item 4.3 (dados não mostrados).

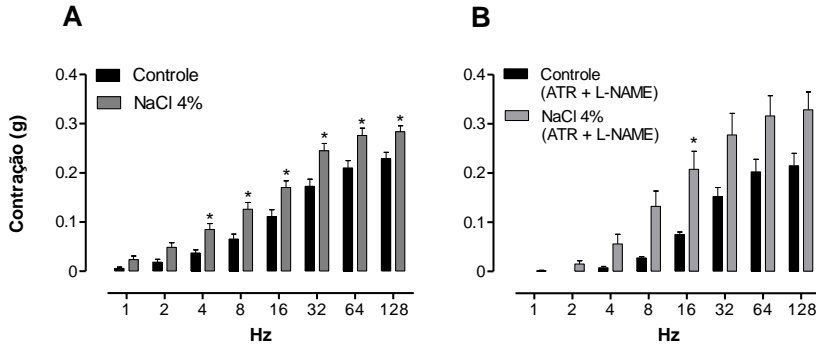
#### 4.4 Avaliação da influência da dieta hipersódica na reatividade contrátil e relaxante de corpos cavernosos induzida por estímulo elétrico de campo

Neste conjunto de experimentos foram avaliados apenas corpos cavernosos removidos de animais expostos à dieta hipersódica durante 24 semanas e seus respectivos controles. O relaxamento provocado pela estimulação elétrica de tecidos pré-incubados com GNT (30 µM) e pré-contraídos com PE (10 µM) não diferiu entre os grupos (Figura 16). Além disso, este relaxamento foi abolido totalmente quando o L-NAME foi adicionado previamente às cubas (dados não mostrados).



**Figura 16. Relaxamento induzido pelo estímulo elétrico de campo (EEC) em tiras de corpos cavernosos obtidos de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.** As preparações foram incubadas com GNT (30  $\mu$ M) e pré-contraídas com PE (10  $\mu$ M) antes do início do EEC (para detalhes ver item 3.4.3.2). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica valor  $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

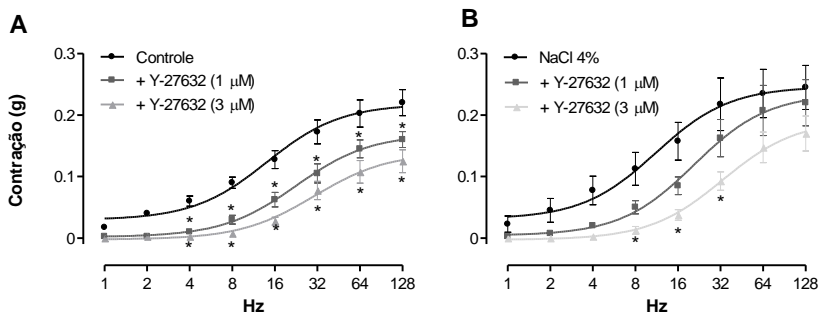
Por outro lado, observamos que quando estabilizadas em PSS sem adição de drogas (Figura 17A) e quando foram previamente incubadas com atropina (ATR, 1  $\mu$ M) mais L-NAME (100  $\mu$ M) por 30 minutos (Figura 17B), as tiras oriundas dos animais no grupo NaCl 4% apresentaram aumentada reatividade à estimulação elétrica. A contração induzida pela EEC foi totalmente abolida pela incubação de GNT (dados não mostrados).



**Figura 17. Contração induzida pelo estímulo elétrico de campo (EEC) em tiras de corpos cavernosos obtidas de animais expostos a dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.** A e B mostram, respectivamente, as respostas contráteis ao EEC (para detalhes ver item 3.4.3.1) na ausência ou presença de atropina (ATR 1  $\mu\text{M}$ ) e L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), conforme indicado em cada painel. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (A: n=8; B: n=5), \* indica  $p < 0,05$ , segundo análise utilizando ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

#### 4.4.1 Influência do composto Y-27632 na resposta contrátil induzida à estimulação elétrica de campo

Além de avaliar o efeito do composto Y-27632 sobre a contração induzida pela PE, observamos o efeito da incubação de 1 ou 3  $\mu\text{M}$  de Y-27632 sobre a contração induzida pela estimulação elétrica. A figura 18A demonstra que a adição do composto Y-27632 causou inibição significativa da contração induzida pela EEC em CC de animais controle. Porém, somente a concentração de 3  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir de modo significativo a contração causada pela EEC em tecidos de animais tratados (Figura 18B).

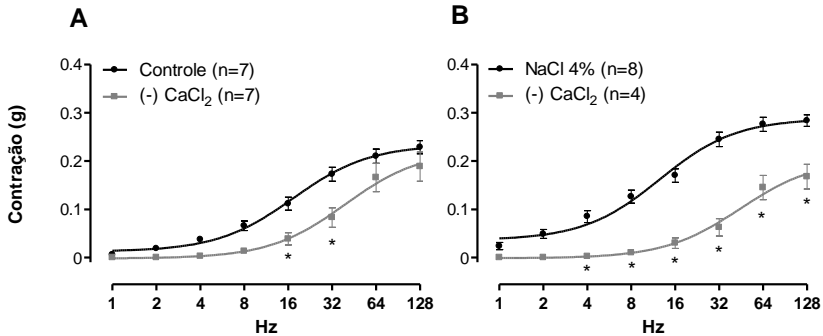


**Figura 18. Efeito inibitório do composto Y-27632 sobre a contração induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos e dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.** Em A e B, CFR para as respostas contráteis do EEC (para detalhes ver item 3.4.3.3) na ausência (círculos fechados) ou presença do composto Y-27632 1  $\mu$ M (quadrados cinzas) ou 3  $\mu$ M (triângulos cinzas). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4), \* indica  $p < 0,05$ , quando comparado à resposta obtida na ausência do composto Y-27632 (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

## 4.5 Influência da dieta hipersódica sobre a liberação do cálcio de estoques intracelulares e entrada de cálcio extracelular em corpos cavernosos.

### 4.5.1 Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pela estimulação elétrica de campo

Para determinar se o consumo excessivo de sal provocou alterações na liberação de cálcio de estoques intracelulares, os tecidos foram mantidos em PSS nominalmente sem  $\text{CaCl}_2$  e em seguida expostos à estimulação elétrica de campo para avaliação de respostas contráteis. A análise dos dados revelou que a ausência de cálcio no líquido nutritivo reduziu de maneira significativa a contração induzida pela EEC em ambos os tecidos (controle e NaCl 4%) (Figura 19). Entretanto, a inibição da contração nos tecidos do grupo NaCl 4% ocorreu de maneira muito mais acentuada (Figura 19B).

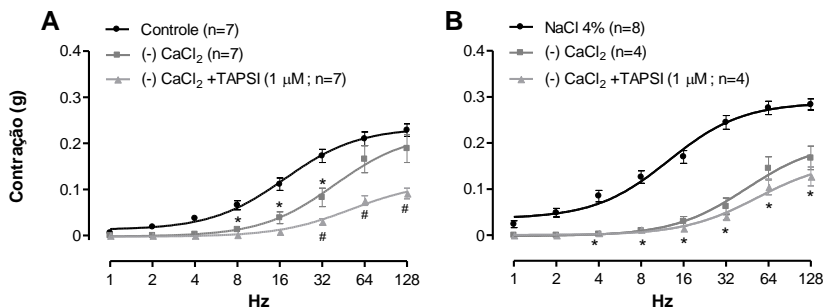


**Figura 19. Influência da ausência de cálcio sobre a contração induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos a dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.** Em A e B, CFR para as respostas contráteis do EEC (para detalhes ver item 3.4.4.3) na presença (círculos fechados) ou ausência (quadrados cinzas) de cálcio no líquido nutritivo. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica  $p < 0,05$ , quando comparado à resposta obtida no mesmo grupo na presença de cálcio (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

#### 4.5.2 Influência da inibição da SERCA sobre a contração induzida pelo estímulo elétrico de campo

A utilização de tapsigargina (1  $\mu$ M), um inibidor de SERCA, incubada durante 15 minutos nos banhos contendo líquido nominalmente sem cálcio foi capaz de inibir de modo significativo a contração induzida pelo EEC em corpos cavernosos de animais do grupo controle (Figura 20A). Entretanto, esta mesma concentração de tapsigargina não foi capaz de causar qualquer inibição na contratilidade em tecidos removidos de animais tratados com dieta hipersódica (Figura 20B).

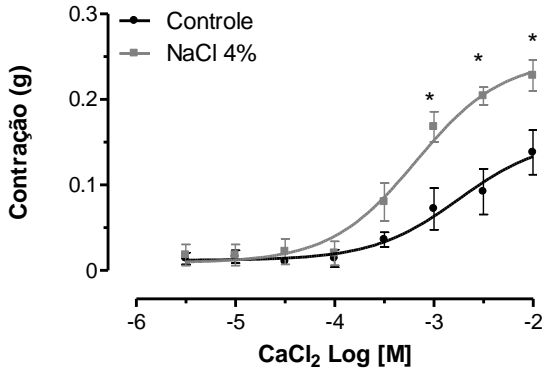




**Figura 20. Influência da inibição da SERCA na resposta contrátil induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso obtidas de animais expostos à dieta normosódica e hipersódica durante 24 semanas.** Em A e B, resposta contrátil induzida pelo EEC em tiras de corpo cavernoso mantidas em líquido nutritivo sem cálcio, na ausência (quadrados cinzas) ou presença (triângulos cinzas) de tapsigargina (1 μM). Os círculos fechados mostram respostas ao EEC quando as preparações foram mantidas em líquido nutritivo regular (PSS com cálcio) (para detalhes ver item 3.4.5). Resultados expressos como média ± erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , quando comparado à resposta obtida no mesmo grupo na presença de cálcio (círculo fechado), # indica valor de  $p < 0,05$  quando comparado às respostas obtidas em PSS sem cálcio (quadrados cinzas) (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

#### 4.5.3 Avaliação da reatividade ao CaCl<sub>2</sub>

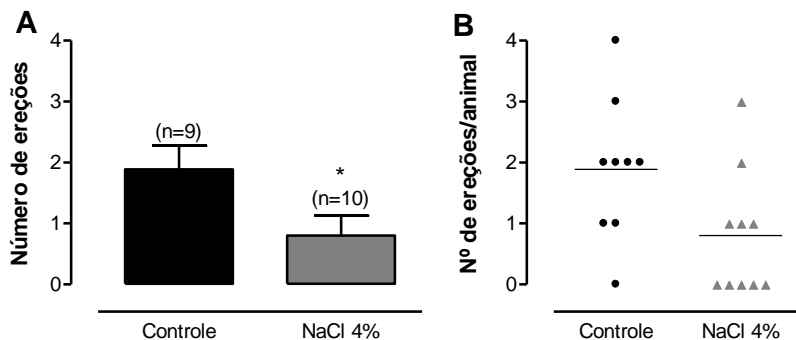
Por fim, para avaliar possíveis alterações na entrada de cálcio extracelular em corpos cavernosos de animais tratados com dieta hipersódica, os tecidos foram mantidos em líquido nutritivo sem cálcio durante 15 minutos, e em seguida, estimulados com PE (10 μM). Assim que as preparações voltaram para o tônus basal foi obtida uma curva concentração resposta para CaCl<sub>2</sub>. A figura 21 mostra que tiras obtidas de animais tratados com NaCl 4% tiveram reatividade aumentada ao CaCl<sub>2</sub> quando comparadas ao seu controle.



**Figura 21. Aumento da reatividade ao  $\text{CaCl}_2$  no corpo cavernoso de animais expostos à dieta hipersódica durante 24 semanas.** Resposta contrátil induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  em tiras de animais controle (círculos fechados) e tratados com dieta hipersódica (quadrados cinzas) mantidas em líquido nutritivo sem cálcio por 15 minutos e expostas à PE ( $10 \mu\text{M}$ ) antes da adição de concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$ . Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ ), \* indica valor de  $p<0,05$ , quando comparado ao seu respectivo controle (círculo fechado) (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

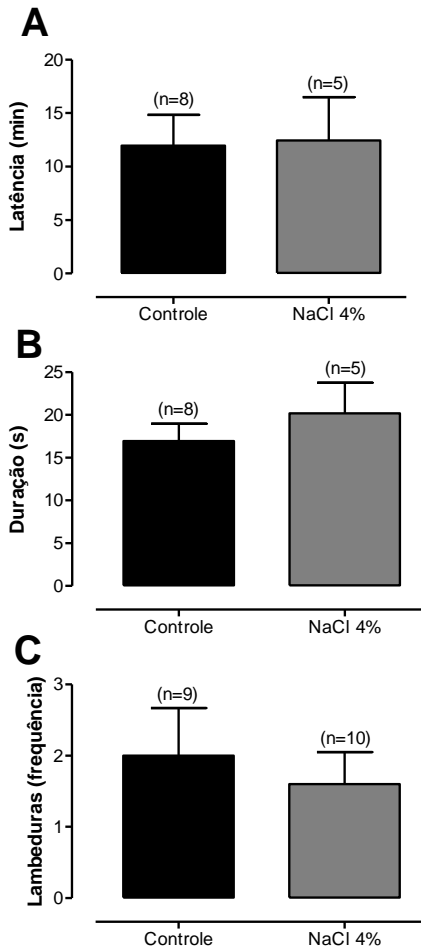
#### 4.6 Avaliação das alterações causadas pelo consumo de sal sobre a função erétil de ratos acordados

Para determinar se o consumo excessivo de sal poderia prejudicar a função erétil, experimentos utilizando apomorfina como indutor de ereção foram conduzidos em animais do grupo exposto à dieta hipersódica durante 24 semanas e em animais do grupo controle (dieta normosódica). A apomorfina na dose de  $80 \mu\text{g}/\text{kg}$  (s.c) causou ereções em animais de ambos os grupos. Entretanto, quando comparados ao controle, os animais que consumiram sal em excesso tiveram diminuição significativa no número de ereções apresentadas (Figura 22A). Enquanto que apenas um animal do grupo controle teve resposta erétil, 50% dos animais do grupo tratado não apresentaram nenhuma ereção (Figura 22B).



**Figura 22. Redução do número de ereções induzidas por apomorfina em animais expostos à dieta hipersódica.** Em A e B, número de ereções obtidas por animais controle (barra preta) e tratados com dieta hipersódica por 24 semanas (barra cinza), mensurados durante 40 min após a administração s.c. de apomorfina 80 µg/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão da média, \* indica valor de  $p < 0,05$ , quando comparado ao seu controle (barra preta) avaliado pelo teste *t* de Student para amostras não pareadas.

Além do número de ereções, foi medido o número de lambeduras realizadas por cada animal. Animais nos quais a apomorfina induziu ao menos uma ereção, foram medidos o tempo de latência para a primeira ereção (min) e a duração de cada ereção (s). Nestes parâmetros, nenhuma alteração significativa foi encontrada (Figuras 23A, B e C).



**Figura 23. Avaliação de parâmetros relacionados à ereção induzida por apomorfina.** Em A, latência em min para a primeira ereção e em B, a duração em s das ereções. Ambos os parâmetros (A e B) medidos em animais que apresentaram pelo menos uma ereção. Em C, número de lambeduras realizadas por cada animal, controle (barra preta) ou tratado (barra cinza). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* indica  $p < 0,05$  quando analisados pelo teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.

## **4. DISCUSSÃO**

---

A disfunção erétil (DE) é uma desordem que afeta milhões de homens ao redor do mundo (AYATA *et al.* 1999). Embora não seja uma condição que imponha risco à vida, pacientes que sofrem deste distúrbio veem prejudicados seu relacionamento interpessoal e sua autoestima, acarretando comprometimento do seu bem estar e da sua qualidade de vida (KRANE *et al.*, 1989). Neste estudo avaliamos os efeitos do consumo elevado de cloreto de sódio – ofertado na concentração final de 4% na ração – sobre a reatividade do corpo cavernoso (*in vitro*) e sobre a função erétil (*in vivo*) de ratos Wistar jovens e adultos. O tratamento com a dieta hipersódica (ou dieta *high salt*) foi iniciado em animais com 60 dias de vida (fase adulta jovem) e mantido por até 24 semanas (fase adulta).

A validação de nosso modelo experimental contou com a avaliação da pressão arterial (PA) dos animais. Mesmo que o consumo elevado de sal esteja diretamente relacionado à hipertensão (DENTON *et al.* 1995; ELLIOTT *et al.* 2007), após 24 semanas de tratamento com a dieta hipersódica não foram encontradas quaisquer alterações na PAS medida em ratos conscientes. Esses resultados não configuram um evento isolado, tampouco inesperado; muitos outros estudos não encontraram aumento da PA em animais expostos à dieta hipersódica (por exemplo: YATABE *et al.* 2012; WALKER *et al.* 2012). Entretanto, vale ressaltar que a hipertensão é alcançada com facilidade quando o sódio é associado com mineralocorticóides (ex.: acetato de deoxicorticosterona; modelo DOCA-sal; DEMEL *et al.* 2010; O'DONAUGHY & BROOKS, 2006), ou oferecida a animais geneticamente selecionados (modelo com animais *Dahl salt-sensitive*, ou animais Dahl sensíveis ao sal) (BOUHNİK *et al.*, 1992).

Evidências indicam que o sal pode levar a dano tecidual promovendo hipertrofia de órgãos (ANTONIOS & MAC GREGOR, 1996). Neste sentido, a hipertrofia do ventrículo esquerdo, que configura um importante fator de risco para doença cardiovascular prematura (ANTONIOS & MAC GREGOR, 1996), está bem estabelecida. Esta alteração pode ocorrer como consequência da hipertensão gerada por uma dieta rica em sódio (FROHLICH *et al.*, 1992). Porém, pesquisas anteriores mostraram que a hipertrofia ventricular esquerda pode decorrer da ingestão de dieta hipersódica sem significativa alteração na PA (YUAN & LEENEN, 1991; FROHLICH *et al.* 1993). Em ratos

espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) foi demonstrado que o antagonismo dos receptores de angiotensina (subtipo AT1) pode atenuar ou prevenir este efeito (VARAGIC *et al.* 2008). Em nossos experimentos a massa ventricular não se apresentou alterada em ratos tratados com a dieta hipersódica por até 24 semanas. Entretanto, já nas fases de padronização do modelo no nosso laboratório verificamos que, dos tecidos avaliados, o rim e o testículo direitos avaliados neste estudo apresentaram alterações no peso úmido em decorrência da ingestão de sal, sendo o peso testicular desses animais menor do que o observado no grupo controle.

Medidas de peso testicular são muito utilizadas para avaliar o grau de desenvolvimento do testículo (CURTIS & AMANN, 1981) e servem como indicador de patologias reprodutivas (DELVENTO *et al.* 1992). Há poucos dados disponíveis a respeito do consumo de sal e a reprodução em roedores. Porém, já foi observado que uma dieta rica em cloreto de sódio reduz a massa testicular e a espermatogênese em camundongos “golden spiny” (*Acomys russatus*) (WUBE *et al.* 2009).

Em nossos experimentos, além de apresentarem massa testicular alterada, os animais do grupo NaCl 4% também tiveram aumento do peso renal. Corroborando nosso estudo, uma pesquisa utilizando ração hipersódica 8% oferecida a ratos Wistar-Kyoto por oito semanas resultou em hipertrofia renal (YU *et al.* 1998). O mesmo foi verificado em ratos Wistar tratados com dieta *high salt* pelo mesmo período de tempo, sendo que a hipertrofia observada nestes animais foi acompanhada de fibrose generalizada, um processo que pode levar a insuficiência renal (WALKER *et al.* 2012). Além da hipertrofia do rim, nossos dados mostraram aumento do volume de urina produzida por animais tratados. Sabe-se que a exposição à dieta *high salt* provoca aumento do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (ANTONIOS & MAC GREGOR, 1996); aliado a isso, observamos maior ingestão de água em animais do grupo tratado, fato já documentado em estudos anteriores (MATAVELLI *et al.* 2007).

Para discorrer a respeito dos dados obtidos *in vitro*, é importante salientar o dado de maior relevância deste trabalho. Foi observado que parte dos animais tratados com dieta

hipersódica durante 24 semanas não apresentaram ereções. Mesmo que os outros parâmetros analisados (lambeduras, tempo de latência e tempo de duração das ereções) não tenham sido modificados, tal fato sugere prejuízo na função erétil de aproximadamente 50% dos animais estudados, causado pela exposição direta ao sal, sem envolvimento de uma alteração prévia na pressão arterial. Dados anteriores já demonstraram experimentalmente a correlação entre hipertensão e DE (CHITALEY *et al.* 2001b) e estudos clínicos apontaram que 30% dos pacientes hipertensos tem DE, sendo a severidade de uma desordem diretamente proporcional à outra (BURCHARDT *et al.*, 2000). Por isso, até o momento a patologia da hipertensão era o principal fator que estabelecia alguma relação entre o consumo excessivo de sal e a DE. Em adição, Carneiro e colaboradores observaram que corpos cavernosos de camundongos DOCA-sal normotensos apresentaram reatividade aumentada à estimulação simpática e  $\alpha$ -1 adrenérgica, evidenciando que estas alterações, as quais podem levar à disfunção erétil, não são decorrentes, ao menos não exclusivamente, do quadro de pressão alta ou hipertensão (CARNEIRO *et al.* 2008).

Além das modificações causadas pelo consumo de sal na função erétil observada *in vivo*, experimentos utilizando corpo cavernoso *in vitro* também revelaram alterações importantes. Faz-se necessário salientar que a apomorfina, droga utilizada para induzir ereções nos ratos do presente estudo, atua em receptores dopaminérgicos no SNC e a resposta erétil parece ocorrer principalmente pela ativação de receptores D2 no PVN (CHEN *et al.* 1999), por isso, não é possível afirmar que a disfunção erétil observada em animais tratados com dieta hipersódica foi decorrente apenas das alterações observadas em corpos cavernosos *in vitro*.

Embora a ingestão de sal esteja relacionada à resposta aumentada a vasoconstritores (SALOMONE *et al.* 1996), em nosso primeiro conjunto de experimentos *in vitro* não foram encontradas alterações expressivas na reatividade do tecido cavernoso à estimulação alfa-adrenérgica por meio do agonista fenilefrina. Corroborando nossos dados, artérias aorta e mesentérica de ratos expostos à dieta hipersódica também não apresentaram resposta aumentada à fenilefrina (CRESTANI *et al.* 2012). Ao contrário, o presente estudo demonstrou corpos cavernosos do grupo tratado por 12 semanas apresentam uma



redução da resposta contrátil a esta droga, mas esta alteração estava ausente em tecidos obtidos após 24 semanas de tratamento com dieta hipersódica.

Estando a DE associada a alterações na via RhoA/ROCK, a qual desempenha um papel sinérgico na contração do corpo cavernoso (NUNES *et al.* 2010), nossa hipótese de estudo considerava que a dieta hipersódica poderia modificar a funcionalidade desta via, mesmo sem o estabelecimento da hipertensão. Entretanto, o relaxamento de corpos cavernosos induzido pelo composto Y-27632 (inibidor da ROCK) não foi alterado no grupo NaCl 4% e, da mesma forma, a incubação desta droga inibiu de modo semelhante a contração induzida pela fenilefrina em ambos os grupos (controle e NaCl 4%). Corroborando nossos dados, um estudo recente mostrou que anéis de artéria aorta e mesentéricas isoladas de ratos expostos à dieta *high salt* não apresentaram alterações na resposta relaxante ao composto Y (CRESTANI *et al.* 2012). Uma vez que mudanças no  $Ca^{2+}$  intracelular tem papel crucial para a função do músculo liso (HILL-EUBANKS *et al.* 2011), investigamos se a contração induzida pela fenilefrina em corpos cavernosos de animais expostos à dieta hipersódica mantidos em PSS sem cálcio estaria alterada. Como dado final deste primeiro conjunto de experimentos observamos que a contração induzida pela fenilefrina em meio livre de cálcio foi similar entre os grupos, um resultado que parecia indicar que a armazenagem ou mobilização de cálcio intracelular não foi alterada em corpos cavernosos de animais expostos à dieta hipersódica.

Mesmo que o primeiro conjunto de dados não sugerisse quaisquer alterações na reatividade dos corpos cavernosos de animais tratados com dieta hipersódica à PE, prosseguimos os estudos utilizando uma metodologia que melhor se adéqua à fisiologia do tecido analisado. Considerando a rica inervação presente no corpo cavernoso (JÚNIOR *et al.* 2010), foram conduzidos ensaios utilizando estimulação elétrica de campo. Resumidamente, o mecanismo periférico da ereção peniana é coordenado por uma interação complexa entre neurotransmissores simpáticos, os quais promovem a flacidez por meio da liberação de noradrenalina, e parassimpáticos (NANC), que levam ao relaxamento por meio da liberação do óxido nítrico (MAGGI *et al.* 2000). Se por um lado nossos dados demonstram que não há comprometimento do relaxamento

mediado por ativação de terminações nervosas NANC, por outro, observamos que a estimulação elétrica promoveu efeito contrátil marcadamente aumentado em tiras de corpos cavernosos oriundos do grupo NaCl 4%.

Observações anteriores têm demonstrado que a exposição à dieta hipersódica pode sensibilizar ambas as respostas simpatoexcitatórias e simpatoinibitórias a vários estímulos fisiológicos locais em diferentes tecidos. Segundo Stocker e colaboradores, esta aparente discrepância resulta dos diferentes alvos e reguladores da inervação simpática, das diferentes abordagens metodológicas utilizadas, bem como da ausência de um entendimento melhor sobre como o sal influencia as dinâmicas simpáticas (STOCKER *et al.* 2010). Como ambas, ligação do agonista fenilefrina e liberação de NA levam à contração celular pela ativação de canais operados por IP<sub>3</sub> na membrana do retículo sarcoplasmático, é intrigante observar aumento da resposta contrátil à EEC, mas não a este agonista. Um aumento na quantidade de noradrenalina disponível nas fibras de corpos cavernosos de ratos expostos à dieta hipersódica pode ser uma possível explicação para este fenômeno, porém maiores evidências de como o sal afeta este sistema ainda não foram demonstradas.

Considerando esta hiper-responsividade pronunciada em corpos cavernosos do grupo *high salt* e o fato de que a ligação de agonistas, neste caso a noradrenalina, em receptores acoplados a proteínas G induzem contração através do aumento do cálcio citosólico e também pela atividade da ROCK (SATOH *et al.* 2011), investigamos o papel desta enzima, bem como da sua via de ativação através da estimulação elétrica de tiras na presença do inibidor de ROCK, composto Y-27632. Em nossos experimentos, a menor concentração de Y-27632 testada reduziu a contração induzida por EEC em corpos cavernosos de ratos controle, mas não alterou a contração em tecidos de animais expostos a dieta hipersódica. É possível especular que a ausência de efeito inibitório sobre a contratilidade em concentrações menores de Y-27632 desses tecidos decorra de uma maior atividade da via RhoA/ROCK, uma vez que concentrações maiores deste inibidor reduziram a contração induzida pela estimulação elétrica de forma semelhante em preparações do grupo controle e grupo NaCl 4%. Entretanto, é importante salientar que este mesmo dado pode sugerir que a

importância da via RhoA/ROCK na regulação da contratilidade, tenha sido reduzida em corpo cavernoso de animais expostos à dieta hipersódica.

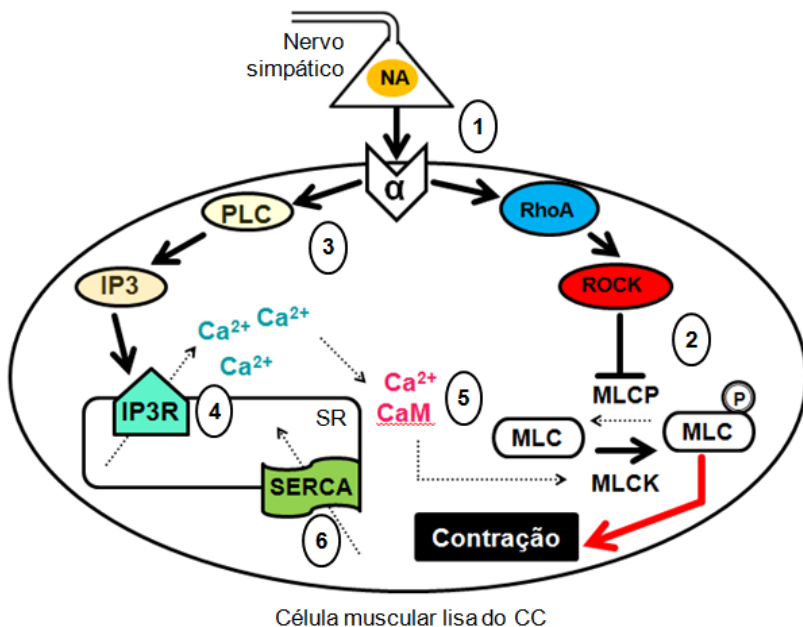
Somando-se a hiper-responsividade encontrada em tecidos de animais tratados com dieta hipersódica ao fato da via RhoA/ROCK manter a contração celular por meio da sensibilização ao cálcio, mediada pela fosforilação da MLC (SOMLYO & SOMLYO, 2003), tornou-se importante verificar se possíveis alterações no cálcio intracelular, bem como em componentes da sua via, poderiam estar envolvidos nas alterações funcionais do corpo cavernoso encontradas neste estudo.

A concentração de cálcio no citosol é a principal reguladora da contração em músculos lisos (GHISDAL *et al.* 2003). Está bem documentada a ocorrência de uma regulação anormal de cálcio intracelular, em músculo liso vascular, tanto na hipertensão humana quanto na experimental (AVIV, 1996; HERMSMEYER & ERNE, 1990). Um estudo de David e colaboradores (2002) mostrou aumento tanto de influxo quanto de liberação de cálcio de estoques intracelulares em aortas de ratos submetidos ao modelo DOCA-sal. Uma vez que a contração induzida pela EEC em PSS sem  $\text{CaCl}_2$  foi semelhante em ambos os grupos, nossos dados indicam que o cálcio intracelular manteve-se inalterado, sendo o mesmo observado quando a contração foi induzida pela fenilefrina. Em contrapartida, contrações induzidas por cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em PSS sem cálcio apresentaram-se aumentadas no grupo NaCl 4%.

Embora algumas outras organelas possam captar e liberar  $\text{Ca}^{2+}$ , o retículo sarcoplasmático é o principal estoque intracelular de cálcio no músculo liso (HILL-EUBANKS *et al.* 2012), sendo esta função mantida pela bomba de cálcio do SR, a SERCA. Em nossos experimentos bloqueamos a captação de cálcio para o SR por meio da inibição da SERCA com tapsigargina. Curiosamente, apesar de não termos encontrado evidências de alterações na mobilização de cálcio intracelular nos ensaios descritos anteriormente, a utilização da tapsigargina inibiu a contração induzida pela EEC em tecidos do grupo controle, porém não alterou essa contração em corpos cavernosos de animais do grupo NaCl 4%. Embora não tenhamos aprofundado nossa investigação acerca deste efeito, é

possível especular que existem alterações na atividade, funcionalidade ou até mesmo densidade de proteínas SERCA no corpo cavernoso de animais expostos cronicamente (24 semanas) à dieta hipersódica. Em um estudo feito em artéria aorta foi demonstrado que a *dieta high salt* reduziu a expressão das SERCAs 2 e 3, o que resultou em aumento da expressão de proteínas fosfolambam, comprometendo a recaptação do cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático (CRESTANI *et al.* 2012).

Em resumo, o conjunto de evidências do presente estudo demonstra que a exposição prolongada à dieta hipersódica causou alterações nos corpos cavernosos de animais tratados, induzindo maior responsividade à noradrenalina liberada das terminações simpáticas por meio de estímulos elétricos e modificações no influxo de cálcio para o meio intracelular. Estes efeitos foram acompanhados de um aumento na atividade da via RhoA/Rho-quinase. Essas mudanças, causadas pelo consumo excessivo de sódio, ocorreram simultaneamente ao comprometimento da função erétil dos animais e de forma independente de alterações de pressão arterial ou desenvolvimento de hipertensão nos mesmos. Esses achados podem contribuir para o entendimento de como o excesso de sal é capaz de afetar o corpo cavernoso, auxiliar no desenvolvimento de terapias e principalmente motivar a ampliação de novas estratégias que previnam ou adiem a instalação da disfunção erétil. Mais estudos são necessários para melhor compreensão deste fenômeno.



**Figura 24: Modelo hipotético das alterações causadas pela dieta hipersódica no corpo cavernoso de ratos.** Corpos cavernosos de ratos expostos à dieta hipersódica podem apresentar: 1) Maior liberação de NA de terminações simpáticas; 2) Maior atividade da via RhoA/ROCK. Estes eventos somados resultariam na hiper-responsividade à EEC 3) Aumento da atividade da via PLC/IP3 em decorrência da maior liberação de NA; 4) Diminuição da liberação de  $Ca^{2+}$  do SR através de IP3R e consequentemente 5) Diminuição da formação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$ ; 6) Menor atividade da SERCA. Estas modificações poderiam ocorrer como um mecanismo compensatório, uma vez que a liberação NA e a atividade da via RhoA/ROCK estariam aumentadas. NA: noradrenalina; PLC: fosfolipase C; IP3: inositol trifosfato; IP3R: receptor de IP3; SERCA: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; MLC: miosina de cadeia leve; MLCP: fosfatase de cadeia leve de miosina; MLCK: quinase de cadeia leve de miosina; CaM: calmodulina.



## **5. CONCLUSÃO**

---

Em resumo, os principais achados deste trabalho foram:

- O modelo de dieta hipersódica 4% por 24 semanas causou alterações no peso úmido do rim e do testículo direitos, e aumentou o volume de urina produzida pelos animais. A pressão arterial sistólica de ratos tratados, por sua vez, não foi modificada;
- A reatividade do corpo cavernoso dos animais do grupo NaCl 4% frente ao KCl e à fenilefrina não foram modificadas. Da mesma forma, o relaxamento induzido pelo composto Y-27632 e a utilização desta droga antes da exposição das tiras à PE promoveu respostas semelhantes entre os grupos estudados;
- O relaxamento neurogênico mediado pela EEC não foi alterado pelo consumo elevado de sódio, entretanto, a contração induzida por esse estímulo foi aumentada em tiras de animais tratados;
- A incubação de composto Y-27632, na menor concentração utilizada, não foi capaz de inibir a contração induzida pelo EEC em tiras de animais do grupo tratado com dieta hipersódica, mas foi eficaz em tecidos de ratos do grupo controle;
- Corpos cavernosos de ambos os grupos (controle e tratado) apresentaram respostas semelhantes quando expostos à PE em PSS sem cálcio;
- Entretanto, quando o cálcio extracelular foi removido e as tiras submetidas à EEC, a reatividade frente a este estímulo foi reduzida de modo mais acentuado em corpos cavernosos obtidos de animais grupo NaCl 4%, do que observado em tecidos de ratos controle;
- A incubação de taspigargina, em PSS livre de cálcio, reduziu a contração induzida pelo EEC em tiras de animais controle, mas não inibiu este efeito contrátil em tecidos de animais tratados;



- Tecidos de animais tratados com dieta hipersódica são mais reativos ao  $\text{CaCl}_2$  que àqueles obtidos de animais controle;
- A ingestão de sódio em excesso diminuiu o número de ereções induzidas por apomorfina em animais tratados. Os outros parâmetros referentes à ereção não foram modificados.

Nossos resultados demonstram que o consumo de sal em demasia, por um longo período de tempo, pode causar mudanças na funcionalidade de algumas vias no corpo cavernoso. A via RhoA/Rho-quinase, a mobilização de cálcio e talvez a liberação de noradrenalina estão alterados neste tecido. Estas alterações podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelo detrimento da função erétil dos ratos que consumiram a dieta *high salt* 4%.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. ALBERSEN, M., SHINDEK, A., MWAMUKONDA, K. LUE, T. **The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction.** Expert Opin Emerg Drugs, 15: 467-480, 2010.
2. AMANO, M., CHIHARA, K., KIMURA, K., FUKATA, Y., NAKAMURA, N., MATSUURA, Y., KAIBUCHI, K. **Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase.** Science, 275: 1308–1311, 1997.
3. ANDERSSON, K.E. **Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erection dysfunction.** Pharmacol Rev, 63:811-859, 2011.
4. ANDERSSON, K.E., WAGNER, G. **Physiology of erection.** Physiol Rev, 75:191–236, 1995.
5. ANTONIOS, T.F.T., MacGREGOR, A.G. **Salt - more adverse effects.** Lancet, 348: 250-251, 1996.
6. AVIV, A. **The links between cellular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the pathophysiology of essential hypertension.** Am J Hypertens, 9:703–707, 1996.
7. AWAD, A., ALSAID, B., BESSÉD, T., BENOÎT, G. **Evolution in the concept of erection anatomy.** Sur Rad Anat, 33: 301–312, 2011.
8. AYTA, I.A., MCKINLAY, J.B., KRANE, R.J. **The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences.** BJU Int, 84(1):50-6, 1999.
9. BEAULIEU, J.M., GAINETDINOV, R.R. **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.** Pharmacol Rev, 63:182–217, 2011.
10. BILLUPS, K.L. **Sexual dysfunction and cardiovascular disease: integrative concepts and strategies.** Am J Cardiol, 96:57-61, 2005.

11. BOUHNİK, J., RICHOUX, J.P., HUANG, H., SAVOIE, F., BAUSSANT, T., ALHENC-GELAS, F., CORVOL, P. **Hypertension in Dahl salt- sensitive rats: biochemical and immunohistochemical studies.** Clin Sci, 83(1): 13-22, 1992.
12. BROOKS, J.D. **Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia.** Campbell-Walsh Urol, Vol. 1. 2007.
13. BROWN I.J., TZOULAKI, I., CANDEIAS V., ELLIOTT, P. **Salt intakes around the world: implications for public health.** Int J Epidemiol, 38:791–813, 2009.
14. BURCHARDT, M., BURCHARDT, T., BAER, L., KISS, A.J., PAWAR, R.V., SHABSIGH, A., et al. **Hypertension is associated with severe erectile dysfunction.** J Urol, 164(4):1188-91, 2000.
15. CARNEIRO, F.S., GIANCHINI, F.R.C., LIMA, V.V., CARNEIRO, Z.N., NUNES, K.P., ERGUL, A., LEITE, ROMULO, TOSTES, R.C., WEBB, C. **Doca-salt treatment enhances response to endothelin-1 in murine corpus cavernosum.** Can J Physiol Pharmacol, 86: 320-328, 2008.
16. CHEN, K.K., CHAN, J.Y., CHANG, L.S. **Dopaminergic neurotransmission at the paraventricular nucleus of hypothalamus in central regulation of penile erection in the rat.** J Urol, 162:366-370, 1995.
17. CHITALEY K, WEBB RC, DORRANCE AM, MILLS TM. **Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats.** Int J Impot Res, 5:16-20, 2001b.
18. CHITALEY, K., WEBB, R.C. MILLS, T.M. **Rho-kinase as a potential target for the treatment of erectile dysfunction.** Drug News Perspect, 14:601-606, 2001a.

19. CRESTANI, S., da SILVA-SANTOS, J.E. **Efeitos do consumo elevado de sal sobre as vias renina-angiotensina-aldosterona, RhoA/ROCK e a recaptação de cálcio no sistema cardiovascular de ratos.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2012
20. CURTIS SK, AMANN RP. **Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls.** J Anim Sci, 53:1645–57, 1981.
21. de GODOY, M.A.F., RATTAN, S. **Role of Rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscle.** Trends Pharmacol Sci, 32: 384-393, 2011.
22. de TEJADA, I.S. **Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility.** Inter J Impot Res, 14:6-10, 2002.
23. DAHL, L.K. **Effects of chronic excess salt feeding: induction self-sustainig hypertension in rats.** J Exp Med, 114: 231-236, 1961.
24. DELVENTO, V.R., AMANN, R.P., TROTTER, G.W., RAO VEERAMACHANENI, D.N., SQUIRES, E.L.. **Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions.** Am J Vet Res, 53:2094–101, 1992.
25. DEMEL, S.L., DONG, H., SWAIN, G.M., WANG, X., KREULEN, D.L., GALLIGAN, J.J. **Antioxidant treatment restores prejunctional regulation of purinergic transmission in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats.** Neuroscience, 168:335-345, 2010.
26. DENTON, D., WEISINGER, R., MUNDY, N.I., WICKINGS, E.J., DIXSON, A., MOISSON, P., PINGARD, A.M., SHADE, R., CAREY, D., ARDAILLOU, R., PAILLARD, F., CHAPMAN, J., THILLET, J., MICHEL, J.P. **The effect of**

- increased salt intake on blood pressure of chimpanzees.** *Nat Med*, 1:1009–1016, 1995.
27. DERBY, C.A., MOHR, B.A., GOLDSTEIN, I., FELDMAN, H.A., JOHANNES, C.B., MCKINLAY, J.B. **Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk?** *Urology*, 56:302–6, 2000.
  28. DIAZ Jr, V.A., CLOSE, J.D. **Male sexual dysfunction.** *Prim Care Clin Office Pract.* 37: 473-489, 2010.
  29. DRENJANČEVIĆ-PERIC, I., JELAKOVIC, B., LOMBARD, J.H., KUNERT, M.P., KIBEL, A., GROSS, M. **High-salt diet and hypertension: Focus on the rennin-angiotensin system.** *Kidney Blood Press*, 34:1-11, 2011.
  30. EARDLEY, M.A.I., DONATUCCI, C., CORBIN, CORBIN, J., EL-MELIEGY, A., HATZIMOURAIDIS, K., McVARY, K., MUNARRIZ, M.D., LEE, S.W. **Pharmacotherapy for erectile dysfunction.** *J Sex Med*, 7:524-540, 2010.
  31. ELLIOTT, P., WALKER, L.L., LITTLE, M.P., BLAIR-WEST, J.R., SHADE, R.E., LEE, D.R., ROUQUET, P., LEROY, E., JEUNEMAITRE, X., ARDAILLOU, R., PAILLARD, F., MENETON, P., DENTON, D.A. **Change in salt intake affects blood pressure of chimpanzees: implications for human populations.** *Circulation*, 116:1563–1568, 2007.
  32. ETIENNE-MANNEVILLE, S., HALL, A. **Rho GTPases in cell biology.** *Nature*, 420, 629-635, 2002.
  33. ETO, M., KITAZAWA, T., BRAUTIGAN, D. L. **Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8888–8893, 2004.
  34. FELDMAN, H.A., GOLDSTEIN, I., HATZICHRISTOU, D.G., KRANE, R.J., MCKINLAY, J.B. **Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the**

- Massachusetts Male Aging Study.** J Urol, 151:54–61, 1994.
35. FOX, J.G., DANGLER, C.A., TAYLOR, N.S., KING, A., KOH, T.J., WANG, T.C. **High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice.** Cancer Res, 59:4823-4828, 1999.
  36. FRISOLI, T.M, SCHMIEDER, R.E., GRODZICKI, T., MESSERLI, F.H. **Salt and hypertension: Is salt dietary reduction worth the effort?** Am J Med, 125: 433-439 , 2012.
  37. FROHLICH, E.D., CHIEN, Y., SESOKO, S., PEGRAM, B.L. **Relationship between dietary sodium intake, hemodynamics, and cardiac mass in SHR and WKY rats.** Am J Physiol, 264:R30–R34, 1993.
  38. GHISDAL, P., VANDEBERG, G., MOREL, N. **Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries.** J Physiol, 551.3: 855-867, 2003.
  39. GRATZEK, C., ANGULO, J., CHITALEY, K., DAI, Y., KIM, N.N., PAICK, JS., SIMONSEN, U., ÜCKERT, S., WESPES, E., ANDERSSON, K.E., LUE, T.F., STIEF, C.G. **Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction.** J Sex Med, 7: 445-475, 2010.
  40. GUYTON, A.C., COLEMAN, T.G., COWLEY, A.W., SCHEEL, K.W., MANNUNG, R.D., NORMAN, R.A. **Arterial pressure regulation: overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension.** Am J Med, 52:584-594, 1972.
  41. HE, F.J., MacGREGOR, G.A. **Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation.** Prog Cardiovasc Dis, 52:363–382, 2010.



42. HERMSMEYER, K., ERNE, P. **Vascular smooth muscle electrophysiology and platelet calcium in hypertension.** Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press, 661–666, 1990.
43. HILL-EUBANKS, D.C., WERNER, M.E., HEPPNER, T.J. NELSON, M.T. Calcium signaling in smooth muscle. Cold spring Harb Perspct Biol, 27: 1-20, 201, 2011.
44. HIRATA, K., KIKUCHI, A., SASAKI, T., KURODA, S., KAIBUCHI, K., MATSUURA, Y., SEKI, H., SAIDA, K., TAKAI, Y. **Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction.** J Biol Chem, 267: 8719–8722, 1992.
45. HONG, F., HALDEMAN, B. D., JACKSON, D., CARTER, M., BAKER, J. E., CREMO, C. R. **Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase.** Arch Biochem Biophys, 510 (2):135-146, 2011.
46. HULL, E.M., MUSCHAMP, J.W., SATO, S. **Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior.** Physiol Behav, 83:291–307, 2004.
47. JAMES, H.P., RALPH, A., SANCHEZ-CASTILLO, C.P. **The dominance of salt in manufactured food in the sodium intake of affluent societies.** Lancet, 1:426-429, 1987.
48. JIN, L., YING, Z., HILGERS, R.H., YIN, J., ZHAO, X., IMIG, J.D., WEBB, R.C. **Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats.** J Pharmacol Exp Ther, 318:288–295, 2006.
49. KIMURA, K., ITO, M., AMANO, M., CHIHARA, K., FUKATA, Y., NAKAFUKU, M., YAMAMORI, B., FENG, J., NAKANO, T., OKAWA, K., IWAMATSU, A., KAIBUCHI, K. **Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).** Science, 273: 245–248, 1996.

50. KIRBY, M., JACKSON, G., SIMONSEN, U. **Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease.** *Int J Clin Pract*, 59(2):225-9, 2005.
51. KRANE, R.J., GOLDSTEIN, I., de TEJADA, S. **Impotence.** *N Engl Med*, 321:1648-1659, 1989.
52. LEV-RAN, A., PORTA, M. **Salt and hypertension: a phylogenetic perspective.** *Diabetes/meta Res Rev*, 21:118–31, 2005.
53. LUCAS, K. A., PITARI, G. M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K. P., WALDMAN, S. A. **Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.** *Pharmacol. Rev*, 52: 375–414, 2000.
54. LUE, T.F., GIULIANO, F., MONTORSI, F., ET AL. **Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in men.** *J Sex Med*, 1:6–23, 2004.
55. MacGREGOR, G.A., de WARDENER, H.E., **Salt, diet and health.** Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
56. MAGGI, M., FILIPPI, S., LEDDA, F., MAGINI, A., FORTI, G. **Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy.** *Euro J Endocri*, 143: 143-154, 2000.
57. MARTINEZ-PINEIRO, L., TRIGO-ROCHA, F., HSU, G.L., VON HEYDEN, B., LUE, T.F., TANAGHO, E.A. **Cyclic guanosine monophosphate mediates penile erection in the rat.** *Eur Urol*, 24(4):492–9, 1993.
58. MATAVELLI, L.C., ZHOU, X., VARAGIC, J., SUSIC, D., FROHLICH, E.D. **Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H814-H819, 2007.
59. MELIS, M.R., ARGIOLOS, A. **Dopamine and sexual behavior.** *Neurosci Biobehav Rev*, 19:19–38, 1995.

60. MENEELY, G.R., TUCKER, R.G., DARBY, W.J. **Chronic sodium chloride toxicity in the albino rat I: Growth on a purified diet containing various levels of sodium chloride.** J Nutr, 48: 489-498, 1952.
61. MENEELY, G.R., TUCKER, R.G., DARBY, W.J. AUERBACH, S.H. **Chronic sodium chloride toxicity: hypertension, renal failure and vascular lesions.** Ann Intern Med, 39: 991-998, 1953.
62. MIALON, A., BERCHTOLD, A., MICHAUD, P.A., GMEL, G. SURIS, J.C. **Sexual dysfunctions among young men: Prevalence and associated factors.** J Ado Health, 51:25-31, 2012.
63. MILLER, T.A. **Diagnostic evaluation of erectile dysfunction.** Am Fam Physician, 61:95–104 109–10, 2000.
64. MINER, M.M. Men's health in primary care: **An emerging paradigm of sexual function and cardiometabolic risk.** Urol Clin N Am, 39: 1-23, 2012.
65. MOREIRA Jr, E.D., ABDO, C.H.N., TORRES, E.B., LÔBO, C.F.L., FITTIPALDI, A.J. **Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the brazilian study of sexual behavior.** Urology, 58:583-588, 2001.
66. NARDOZA JR, A., ZERATI FILHO, M., REIS, R.B. **Urologia fundamental.** Ed Planmark Ltda. 2010.
67. NUNES, K.P., RIGSBY, C.S. **RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what's the link?** Cell Mol Life Sci, 67:383-3836, 2010.
68. O'DONAUGHY, T.L., BROOKS, V.L. **Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels.** Hipertension, 47:680-685, 2006.

69. PERIASAMY, M., KALYANASUNDARAM, M.S. **SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease.** Muscle Nerve, 35:430-442,2007.
70. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. **Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil.** IBGE, RJ, 2011.
71. POZZAN, T., RIZZUTO, R., VOLPE, P., MELDOLESI, J. **Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores.** Physiol Rev 74: 595–636, 1994.
72. PRINS, J., BLANKER, M.H., BOHNEN, A.M., et al. **Prevalence of erectile dysfunction: A systematic review of population-based studies.** Int J Impot Res, 14: 422–32, 2002.
73. PUETZ, S., LUBOMIROV, L. T., PFITZER, G. **Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases.** Physiology, 24, 342-356, dec. 2009.
74. RITZ, E., MEHLS, O. **Salt restriction in kidney disease- a missed therapeutic opportunity?** Pediatr Nephrol, 24:9-17, 2009.
75. SALOMONE, S., DESSY, C., MOREL, N., GODFRAIND, T. **Inhibition by bosentan, an endothelin antagonist, of the hypersensitivity to Ca<sup>2+</sup> channel activator evoked by salt-loading in basilar artery of stroke-prone spontaneously hypertensive rats.** Life Sci, 59:247–253, 1996.
76. SATOH, K., FUKUMOTO, Y., SHIMOKAWA, H. **Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 301:H287-H296, 2011.
77. SCHIFFRIN, E.L. **Vascular endothelin in hypertension.** Vascul. Pharmacol, 43: 19–29, 2005.
78. SHAKUR, Y., HOLST, L. S., LANDSTROM, T. R., MOVSESIAN, M., DEGERMAN, E., MANGANIELLO, V.

**Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* , 66,241–277, 2001.

79. SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. **Ca<sup>2+</sup> sensitive of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by proteins, kinases, and myosin Phosphatase.** *Physiol Rev*, 83:1325-1358, 2003.
80. SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. **Signal transduction through the RhoA/Rho-kinase pathway in smooth muscle,** *J. Muscle Res. Cell Motil*, 25, 613–615, 2004.
81. STOCKER, S.D., MADDEN, C.J., SVED, A.F. **Excess dietary salt intake alters excitability of central sympathetic networks.** *Physiol Behav*, 100(5): 519-524, 2010.
82. TEIXEIRA, C.E., de OLIVEIRA, J.F., ANTUNES, E., de NUCCI, G. **Aspectos farmacológicos da ereção peniana.** *Hipertensão*, 4:48-50, 2001.
83. TESTUT L, LATARJET A. **Tratado de anatomía descriptiva.** Salvat Editores, 1960.
84. THOMPSON, W.J. **Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function.** *Pharmacol Ther*, 51:13–33, 1991.
85. TIBERIO, M., FRISOLI, M.D., ROLAND, E., SCHMIEDER, M.D., TOMASZ GRODZICKI, M.D., FRANZ, H., MESSERLI, M.D. **Salt and hypertension: Is salt dietary reduction worth the effort?** *Am J Med*, 125:433-439, 2012.
86. TRAISH, A.M., KIM, N.N., GOLDSTEIN, I., MORELAND, R.B. **Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization and physiological function.** *J Androl*, 20:671–682, 1999.

87. TSERTSVADZE, A., YAZDI, F., FINK, H.A., et al. **Diagnosis and treatment of erectile dysfunction.** Evidence report/technology assessment no.171 (prepared by the University of Ottawa Evidence-based Practice Centre (UO-EPC) under contract no. 290-02-0021). AHRQ publication no. 08(09)-E016. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality; 2009.
88. UCKERT S, MAYER, M.E., STIEF, C.G., JONAS, U. **The future of the oral pharmacotherapy of male erectile dysfunction: Things to come.** Expert Opin Emerg Drugs.,12(2):219–28, 2007.
89. VARAGIC, J., FROHLICH, E.D., SUSIC, D., et al. **AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHR without affecting pressure.** Am J Physiol, 294:H853–H858, 2008.
90. WALKER, K.A., CAI, X., CARUANA, G., THOMAS, M.C., BERTRAM, J.F., KET, M.M. **High nephron endowment protects against salt-induced hypertension.** Am J Physiol Renal Physiol, 303: F253-F258, 2012.
91. WANG, H., ETO, M. STEERS, W.D., SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. **RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function.** J Bio Chem, 277: 30614-306221, 2002.
92. WANG, Y., YOSHIOKA, K., AZAM, M. A., TAKUWA, N., SAKURADA, S., KAYABA, Y., SUGIMOTO, N., INOKI, I., KIMURA, T., KUWAKI, T., TAKUWA, Y. **Class II phosphoinositide 3-kinase -isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle.** Biochem J, 394:581–592, 2006.
93. WENNERBERG, K., ROSSMAN, K.L., DER, C.J. **The Ras superfamily at a glance.** J Cell Sci, 118:843-846, 2005.
94. WIRTH, A. **Rho kinase and hypertension.** Biochim. Biophys. Acta, 1802(12):1276-84, 2010.

95. WUBE, T., HAIM A., FARES, F. **Effect of increased dietary salinity on the reproductive status and energy intake of xeric and mesic populations of the spiny mouse.** *Acomys. Physiology and Behavior* 96, 122–127, 2009.
96. YATABE, M.S., YATABE, J., TAKANO, K., MURAKAMI, Y., SAKUTA, R., ABE, S., SANADA, H., KIMURA, J., WATANABE, T. **Effects of a high-sodium diet on renal tubule Ca<sup>2+</sup> transporter and claudin expression in Wistar-Kyoto rats.** *BMC Nephrol*, 13:160, 2012.
97. YU, H.C.M., BURRELL, L.M., BLACK, J., WU, L.L., DILLEY, R.J., COOPER, M.E., JOHNTSON, C.I. **Salt induces myocardial and renalfibrosis in normotensive and hypertensive rats.** *Circulation*, 98:2621-2628, 1998.
98. YUAN, B.X., LEENEN, F.H. **Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats.** *Am J Physiol*, 261:H1397–H1401, 1991.
99. ZHOU, Q., LIAO, J.K. **Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease.** *Curr Pharm Des*, 15:3108–3115, 2009.