

Fernanda Mafra Cajú

**Avaliação dos Efeitos do Tadalafil Sobre a
Função Testicular de Camundongos**

Recife/PE

Julho 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Programa de Pós Graduação em Biociência Animal

Avaliação dos Efeitos do Tadalafil Sobre a Função Testicular de Camundongos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa De Pós-Graduação em Biociência Animal, Área de Concentração em Histologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biociência Animal**.

Orientador: Phd. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Recife/Pernambuco

Julho,2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Programa de Pós Graduação em Biociência Animal

**Avaliação dos Efeitos do Tadalafil Sobre a Função Testicular de
Camundongos**

elaborada por
Fernanda Mafra Cajú

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Biociência Animal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Leucio Câmara – Membro Titular (DMV/UFRPE)

Professor Dr. Frederico Maia – Membro Titular (DMV/UFRPE)

Pesquisador Dr. Bruno Mendes Tenório (UFRPE)

Recife/ Pernambuco
Julho, 2012.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido e companheiro Antonio Travassos, pelo carinho, amizade e amor a mim ofertados todos os dias de nossas vidas, conseguimos amor mais uma etapa vencida. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos, agradecendo aos animais que doaram a vida para que este trabalho fosse realizado.

A minha mãe Maria Inez D. Mafra Cajú, pelo exemplo de mulher e mãe que sempre me passou, sou o que sou e faço o que faço hoje por causa da senhora, te amo.

Ao meu pai que ajudou muito na minha formação profissional, apoiando durante todo o curso, mesmo longe sempre presente.

Ao meu eterno Professor e Orientador Valdemiro Amaro da Silva Junior, obrigada pelos conhecimentos e atenção a mim ofertados, saiba que lhe tenho uma admiração enorme e uma amizade verdadeira, o senhor é um exemplo de profissional para mim..

Aos colegas de mestrado Vinicius, Simone, Sandrinha e Cassia, pela ajuda oferecida a alguém que vive outro mundo que não o laboratório e vocês doaram o tempo de vocês para este trabalho, obrigada de coração. A Dr. Bruno, obrigada pela atenção nesta reta final, tudo de bom.

As meninas do CETENE: Josi, Conceição e Júlia pela atenção e amizade, meu agradecimento sincero. Agradeço também a professora Cristina Peixoto pelo auxílio.

Aos amigos Marlon Azevedo e Natália Matos, que também são colegas de profissão, pelo apoio para eu terminar esta fase de minha vida. Obrigada.

Nunca poderia deixar de fora os estagiários (Alam, Alexandre, Eduardo, João, Rodrigo e Antonio) do Hospital de Cavalos de Paudalho, que auxiliaram no projeto, vocês tem muito a crescer com todo este interesse por trabalho, seja qual for. Alem claro de Esmerina Moça, pelo apoio e amizade.

Aos meus funcionários do Hospital de Cavalos Miguel, Leo e Andersom.

Mais recentemente a DR Hélio e Dra. Carol Cerqueira pela ajuda, obrigada.

E por fim e mais importante a DEUS e a espiritualidade, centro e razão de tudo em minha vida, obrigada pela força e luz para suportar as adversidades.

RESUMO

Tadalafil é um inibidor de fosfodiesterases (PDE) do tipo 5 (PDE5) que foi formulado para tratamento de disfunção erétil, contudo, até o presente momento, as informações são conflitantes quanto aos efeitos colaterais destes inibidores sobre a função testicular. Para estudar os efeitos do tadalafil sobre a função testicular, foi realizado estudo *in vivo*, utilizando 15 camundongos *Swiss Webster (Mus musculus)*, machos, adultos. Os animais foram divididos em grupo controle (n=8) e grupo tratado (n=7). Os animais do grupo tratado receberam 25mg/kg de tadalafil diariamente durante 30 dias, pela via intraperitoneal (IP) enquanto os animais do grupo controle receberam solução para injeção estéril pela mesma via. Ao final do período experimental, os animais foram heparinizados, anestesiados com Xilazina e Ketamina e submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico. Fígado, baço, rins, próstata, vesícula seminal, epidídimos e testículos foram coletados e pesados para comparação entre grupos, fragmentos de testículo foram fixados com glutaraldeído em tampão fosfato de sódio, 0,01M e pH 7,4. Os fragmentos testiculares foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato e analisados através de Histomorfometria e Microscopia Eletrônica. A testosterona plasmática foi determinada através de teste de ELISA após punção cardíaca e obtenção de sangue total. De acordo com os resultados, o tadalafil na dosagem e período utilizados, não produziu efeitos deletérios sobre o parênquima testicular, apenas na microscopia eletrônica demonstrou-se uma maior atividade das células de Leydig no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, onde observou-se mitocôndrias degeneradas por provável hiper estimulação. Além disso, constatou-se tendência de aumento de 23% na produção espermática nos animais tratados e 12% na testosterona sérica. Portanto, os resultados demonstraram que o tadalafil não interfere negativamente sobre na função testicular quando utilizado por 30 dias em dose única de 25mg/Kg a cada 24 horas.

Palavras chave: camundongos, espermatogênese, tadalafil, testosterona.

Abstract

Tadalafil is a 5(PDE5) fosfodiesterases inhibitor type that was created for tratament of erectile dysfunction in men, however, until nowadays, the information is conflicting regarding the side effects of these inhibitors on testicular function. To study the effects of tafalafil on testicular function it was performed an *in-vivo* study, where it was used 15 male and adult *Swiss Webster* mice (*Mus musculus*). The animals were divided in control group (n=8) and treated group (n=7). The animals in treated group received 25mg/kg of tadalafil, daily for 30 days by intraperitoneal via (IP) while, control group animals received the same sterile vehicle by the same way. At the end of the experiment, the animals were heparinized, anesthetized with ketamine and xylazine and euthanized by deep anesthesia. Liver, spleen, kidney, prostate, seminal vesicles, testes and epididymides were collected and weighed to be compared between groups, testicular fragments were fixed with Glutaraldehyde in sodium phosphate buffer, 0.01 M and pH 7.4. The testicular fragments were routinely processed for embedding in plastic resin based on glycol methacrylate and analized by hystomorphometry and electronic microscopy. Plasmatic testosterone was determined by ELISA test after the cardiac puncture and obtaining of total blood. According with the results, the tadalafil dosage and period utilized does not produced negative effects on the testicular parenchyma, just at the electronic microscopy that was showed a higher activity of Leydig cells on the treated group when compared to the control group, which was observed degenerated mitochondria due, probably, the hiperstimulation. Furthermore, there was a trend towards a 23% increase in sperm production in treated animals and 12% in serum testosterone. Therefore, the results showed that tadalafil does not interfere negatively in testicular function when used for 30 days of 25mg/Kg dose every 24 hours.

Keywords: mice, spermatogenesis, tadalafil, testosterone

SUMÁRIO

RESUMO	Páginas
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Mediadores Intracelulares	12
2.2. Inibidores da Enzima Fosfodiesterase	15
2.2.1 Sildenafil	15
2.2.2 Vardenafil	16
2.2.3 Tadalafil	16
2.3. Inibidores de PDEs e a Hipertensão Pulmonar	17
2.4. Efeitos Cardiovasculares das Enzimas PDEs	18
2.5. Controle Endócrino e Função Testicular	19
2.6. Tadalafil e a Células de Leydig	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Tratamento dos animais	25
4.2. Estudo Histológico	25
4.3. Microscopia Eletrônica	27
4.4. Dosagem de Testosterona Plasmática	28
4.5. Análise Estatística	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS

PDEs	Enzimas Fosfodiesterases
AMPc	Monofosfato Ciclico de Adenosina
GMPc	Monofosfato Ciclico de Guanosina
IP3	Inositol Trifosfato
DAG	Diacilglicerol
GC	Guanilil Ciclase
GTP	Guanosina Trifosfato
GCs	Guanilil Ciclase Solúvel
NO	Oxido Nítrico
Ca ²⁺	Cálcio
PKA	Proteína Quinase dependente de AMPC
ATP	Adenosina Trifosfato
ANP	Peptideo Atrial Natriuretico
BNP	Peptideo Natriuretico Cerebral
CNP	Peptido Natriurético Tipo c
GCA-GCB	Guanilil ciclase de membrana A e B
BKca	Canais de Potássio ativados por Cálcio 2+
LH	Hormônio Luteinizante
HCG	Hormônio gonadotrófico coriônico
LHRH	Hormônio liberado de LH
GmRH	Hormônio liberado de Gonadotrofinas
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
AMH	Hormônio Anti- Mulheriano,
TGF α e B	Fator de crescimento transformado Alfa e Beta
IGF I	Fator de crescimento semelhante a insulina I
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
Star	Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese
REL	Retículo Endoplasmático liso
DMFA	Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
CT	Comprimento Total Túbulo Seminífero
D.M	Diâmetro Nuclear médio
PED	Produção Espermática Diária
μ l	Microlitros
M	Molar
Mm	Mile molar

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Molécula do Sildenafil	16
Figura 2. Molécula do Vardenafil	16
Figura 3. Molécula do Tadalafil	17
Figura 4. Espermatogênese	21
Figura 5. Controle da Esteroidogênese	22
Figura 6. Microscopia Óptica de Parênquima Testicular	34
Figura 7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (Controle)	35
Figura 8. Microscopia Eletrônica de Transmissão Grupo Tratado	36

1. INTRODUÇÃO

As fosfodiesterases (PDEs) compreendem 11 famílias distintas de enzimas (PDE1-PDE11) que inibem a atividade dos segundos mensageiros nas células por hidrolisarem a ligação fosfodiéster do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e do GMPc. Estes nucleotídeos cíclicos são importantes reguladores intracelulares de diversos processos, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos e fototransdução retinal. Os inibidores de PDEs podem elevar os níveis intracelulares do AMPc e GMPc, de acordo com a especificidade do substrato da PDE em particular que é bloqueada. Estes inibidores são referidos como agentes competitivos por assemelharem-se às estruturas moleculares do AMPc e GMPc, que são substratos naturais das PDEs (UCKERT *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2006).

Existem quatro classes principais de sistemas de segundos mensageiros: a) o sistema tirosina quinase, b) o sistema inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃)/diacilglicerol (DAG), c) os íons cálcio e d) os nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc). O sistema mensageiro compreende vários elementos, incluindo o primeiro mensageiro o receptor para este primeiro mensageiro; um segundo receptor chamado proteína G que interage com o receptor do primeiro mensageiro; uma enzima ativada pela interação do par de receptores, a guanilil ciclase (GC) e uma molécula mensageira secundária formada por esta enzima. O sinal intracelular gerado em resposta ao primeiro mensageiro é amplificado dentro da célula. O GMPc é formado a partir da guanosina trifosfato (GTP) via reação catalisada pela GC, que é expressa na forma solúvel (GCs) e particulada, isoforma ligada à membrana (GCm). O NO, um mediador crucial do relaxamento do músculo liso, interage com a GCs no citoplasma para aumentar a conversão de GTP em GMPc. Por outro lado, os peptídeos natriuréticos ativam a GCm, e também estimulam a produção de GMPc. Seu acúmulo aciona a cascata de transdução de sinal que ativa proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos, com subsequente fosforilação do sistema actina-miosina, bem como a abertura dos canais de Ca²⁺ e ativação de bombas de Ca²⁺ presentes na membrana externa do retículo endoplasmático. Esta cascata reduz os níveis deste íon no citosol e promove o relaxamento do músculo liso (UCKERT *et al.*, 2006 ; DIMITRIADIS *et al.*, 2008).

Fosfodiesterases tipo 5 (PDE5) degradam seletivamente GMPc, como consequência, PDE5 tem atividade fortemente implicada na regulação do tônus vascular, por isso, a modulação da atividade farmacológica da PDE5 representa um meio eficaz para atingir esse

controle (WALLIS ET AL., 1999; MAURICE ET AL., 2003). A importância fisiológica da PDE5 tem recebido considerável atenção por parte da utilização clínica do inibidor seletivo sildenafil (Viagra[®]) no tratamento de disfunção erétil (BOOLELL et al., 1996; ROSEN AND KOSTIS, 2003; MONTORSI et al., 2004). Mais recentemente, o desenvolvimento de outras drogas foi relatado, e estas incluem vardenafil (Levitra[®]) o tadalafil (Cialis[®]), que especificamente inibem a PDE5, mas diferem em seu perfil inibidor com relação a outras famílias de PDE (SAENZ DE TEJADA et al., 2001; EARDLEY AND CARTLEDGE, 2002).

Devido às informações conflitantes observadas na literatura (FAWCETT et al., 2000; BAXANDALE et al., 2001; JARVI et al., 2008; SARAIVA et al., 2010; ANDRIC et al., 2010) sobre os efeitos produzidos pelo uso dos inibidores de PDE-5 sobre o parênquima testicular, produção de testosterona e morfologia espermática é que novos estudos são necessários. Portanto, o presente estudo teve como proposta principal estudar a ação do tadalafil sobre parâmetros espermáticos e a produção de testosterona de animais tratados, como também uma avaliação morfométrica da influência desse fármaco na estrutura testicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MEDIADORES INTRACELULARES

Os nucleotídeos cíclicos monofosfatados, AMP e GMP, são importantes mediadores intracelulares de várias moléculas de sinalização, e regulam inúmeros processos intracelulares, tais como motilidade do músculo liso, homeostase de eletrólitos, sinais neuroendócrinos e fototransdução retinal (UCKERT *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2006). O AMPc é sintetizado a partir do ATP por uma proteína transmembrânica multipasso chamada adenilil ciclase, e é degradado rápida e continuamente por uma ou mais fosfodiesterases de AMPc, que o hidrolisa à sua forma inativa, adenosina 5' monofosfato. Este nucleotídeo cíclico exerce seus efeitos através da interação com uma proteína receptora intracelular, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que catalisa a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para serinas ou treoninas de determinadas proteínas-alvo, regulando suas atividades (ALBERTS *et al.*, 2004). A via de sinalização AMPc/PKA regula o metabolismo, a atividade gênica, o crescimento e divisão celular, a diferenciação celular, a esteroidogênese, a motilidade de espermatozoides, bem como a condutividade de canais iônicos (HANSSON *et al.*, 2000).

O GMPc, descoberto em 1963, é reconhecido como um importante segundo mensageiro de sinais extracelulares provenientes do NO e peptídeos natriuréticos. Os efeitos fisiológicos

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

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

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

O GMPc é considerado um excelente regulador do tônus do músculo liso vascular. Inúmeros relaxantes musculares, incluindo vasodilatadores contendo óxido de azoto, fatores relaxantes derivados do endotélio e peptídeos natriuréticos estimulam a produção de GMPc no músculo liso vascular. Em adição, este agente afeta os níveis de Ca^{2+} no músculo liso, que é regulado pelo aumento ou diminuição da concentração intracelular do nucleotídeo (RASHATWAR *et al.*, 1987). Na maioria das células a contração é iniciada pela formação, mediada por receptor, do inositol 1,4,5-trifosfato. Este induz a liberação de Ca^{2+} dos armazenamentos celulares, seguido pelo influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de Ca^{2+} dependentes e independentes de voltagem. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular inicia a contração através da ativação da quinase da cadeia leve da miosina dependente de Ca^{2+} - calmodulina, a qual fosforila a cadeia leve da miosina e, conseqüentemente, ativa a ATPase da miosina. A diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} inativa a quinase da cadeia leve da miosina e induz a sua desfosforilação pela miosina fosfatase. Outro mecanismo que diminui a concentração do Ca^{2+} intracelular é a fosforilação direta de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) pela isoforma I da proteína quinase, a qual estimula a abertura destes canais. A abertura dos BK_{Ca} hiperpolariza a membrana e fecha alguns canais, incluindo os de Ca^{2+} tipo L, reduzindo o influxo de Ca^{2+} . Logo, a cascata GMPc/PKG é estabelecida como um importante modulador da contração do músculo liso vascular (HOFMANN *et al.*, 2000).

O hormônio luteinizante (LH) estimula a esteroidogênese das células de Leydig através de sua ligação a receptores e ativação da via adenilil ciclase/PKA. O efeito do LH/hCG nas células de Leydig é dependente do Ca^{2+} intra e extracelular. Putney (1986) propôs um modelo sobre o influxo de Ca^{2+} na célula, sugerindo que o escoamento de Ca^{2+} dos armazenamentos intracelulares envia um sinal para a membrana plasmática para conseguinte abertura dos canais permeáveis de Ca^{2+} . A inibição de cálcio adenosina-trifosfato do retículo sarcoplasmático (SERCA-ATPase) induz modificações no potencial de membrana das células de Leydig devido ao escoamento de Ca^{2+} de armazenamentos internos e ativação de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , modulando, desta forma, o influxo de Ca^{2+} proveniente do meio externo, e a produção de testosterona (ROSSATO *et al.*, 2001). Janszen *et al.* (1976) descreveram que o Ca^{2+} participa da estimulação, mediada por LH, da biossíntese de testosterona.

A ação do LH resulta na formação do AMPc, o qual aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico derivado, em parte, do Ca^{2+} extracelular. O Ca^{2+} citosólico pode, então, atuar como um segundo mensageiro na estimulação da esteroidogênese por afetar o transporte de colesterol para mitocôndria e a atividade de uma ou mais enzimas mitocondriais, principalmente a enzima

de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450_{scc}), ou enzimas microssomais que formam, em última instância, a testosterona (MEIKLE et al., 1991).

Em adição ao LH, é bem estabelecido que o hormônio liberador do LH (LHRH) e seus agonistas também podem estimular diretamente a esteroidogênese de células de Leydig de ratos. O AMPc está envolvido na ação do LH, mas não na do LHRH. Logo, o Ca²⁺ é requerido tanto para estimulação da esteroidogênese dependente de LH quanto para a dependente de LHRH. Em baixas concentrações de LH, o Ca²⁺ intracelular é o principal modulador da esteroidogênese, mais que o AMPc; e agonistas do LHRH aumentam a concentração de Ca²⁺ intracelular e testosterona sem alterar as concentrações de AMPc. Neste caso, o Ca²⁺ por si só é suficiente para controlar a esteroidogênese, enquanto o AMPc estimularia o aumento da concentração intracelular deste íon, possivelmente via fosforilação dos canais de Ca²⁺ da membrana plasmática pela PKA (SULLIVAN; COOKE, 1986).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), exerce um efeito estimulatório sobre a esteroidogênese na presença de Ca²⁺, não apresentando ação significativa sobre a via AMPc/PKA. Isto sugere que este efeito estimulatório é cálcio dependente. Esta evidência está correlacionada com uma classe específica de fosfolípidios, o fosfatidilinositol, que pode regular processos celulares por controlar o fluxo de Ca²⁺ através da membrana celular. A interação ligante-receptor estimula a degradação do fosfatidilinositol, que altera a fluidez da membrana e aumenta o influxo do Ca²⁺ extracelular, via abertura dos canais de Ca²⁺, com subseqüentes respostas biológicas (LIN, 1984).

2.2. INIBIDORES DA ENZIMA FOSFODIESTERASE 5

2.2.1 Sildenafil

O sildenafil é um inibidor da enzima fosfodiesterases e foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 27 de março de 1998, sendo primeiramente sintetizado para tratar hipertensão e angina. Posteriormente, tornou-se a primeira linha de tratamento da disfunção erétil. E, atualmente, esta droga vem revolucionando o tratamento da hipertensão pulmonar, que é uma doença vascular agressiva e com baixa expectativa de vida. O mecanismo de ação desta droga atenua os sinais e sintomas da doença por aumentar o suprimento sanguíneo aos pulmões. A pressão sistólica, a hipertrofia ventricular e a muscularização das artérias pulmonares são reduzidas após o esquema terapêutico com Sildenafil (ZHAO *et al.*, 2001; 2003).

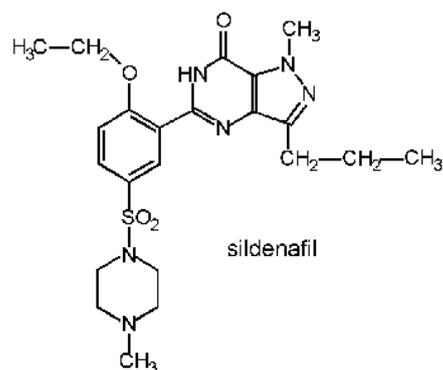


Figura 1. Estrutura Química do Sildenafil;

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5212>

2.2.2. Vardenafil

O Vardenafil é um inibidor usado também na terapêutica da disfunção erétil, Desenvolvido pelo Laboratório Farmacêutico Bayer, é comercializado sob o nome comercial **Levitra®**. O vardenafil tem um tempo de eficácia relativamente curto, quando comparado ao sildenafil e foi liberado pela FDA em 19 de agosto de 2003 (Health Canada, 2006).

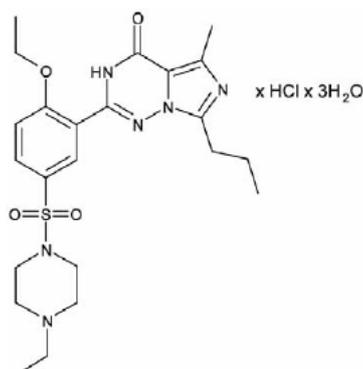


Figura 2. Estrutura Química Vardenafil

Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=110634>

2.2.3 Tadalafil

O Tadalafil recebeu a aprovação da entidade Food and Drug Administration (FDA), tornando-se disponível em Dezembro de 2003, como "a terceira pílula", sucedendo Sildenafil

(Viagra®, "a primeira pílula") e vardenafil (Levitra®, "a segunda pílula"). Uma das principais características do Tadalafil é a maior meia vida, mas existem poucos estudos a respeito da eficácia e segurança destes agentes na circulação pulmonar em pacientes com hipertensão pulmonar (WILKENS et al., 2001; GHOFrani et al., 2004).

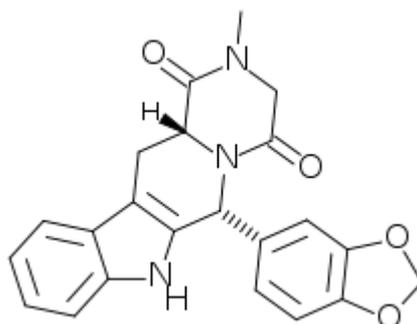


Figura 3. Estrutura química do Tadalafil;

Fonte: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=110635&loc=ec_rcs

2.3 INIBIDORES DE PDES E A HIPERTENSÃO PULMONAR

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

A vasoconstrição tem um papel importante na patogenia da doença, que é caracterizada por hipertrofia patológica da camada média das arteríolas pulmonares, diminuição da produção endotelial dos vasodilatadores, tais como prostaciclina e NO, e aumento da produção do vasoconstritor endotelina (RUNO; LOYD, 2003). Os sintomas usualmente aparecem quando a hipertensão é grave, e na ausência de tratamento para diminuir a pressão pulmonar a expectativa de vida é de 68, 48 e 34% em 1, 3 e 5 anos, respectivamente. A doença não tem cura, e o paciente necessita de tratamento por toda a vida (FARBER; LOSCALZO, 2004).

Intervenções farmacológicas têm como objetivo reduzir a pressão arterial pulmonar elevada através de tratamento vasodilatador, incluindo contínua infusão intravenosa de prostaciclina, contínua inalação de NO e prostaciclina aerosolizada, entre outros. Recentemente, o uso do Sildenafil oral como terapia adicional levou a uma melhora dos sintomas e da hemodinâmica vascular pulmonar de pacientes (HUMPL et al., 2005).

A vasodilatação pulmonar com inibidores de PDE5 tem sido demonstrada em animais com hipertensão pulmonar experimental, e em humanos com hipertensão arterial pulmonar primária e secundária (MICHELAKIS et al., 2002 ; GHOFrani et al., 2002 ; MICHELAKIS et al., 2003).

No pulmão, o NO formado endogenamente ou inalado dilata os vasos sanguíneos pulmonares através da ativação da GCs e subsequente aumento dos níveis de GMPc. Este ativa a proteína quinase dependente de GMPc, modula suas proteínas alvo, e inibe a contração. A redução da hipertensão pulmonar em modelos animais, seguida da inibição da PDE5 por seus inibidores, tal como o Sildenafil, foi atribuída a uma maior expressão da via NO-GMPc, atenuada patofisiologicamente (KIRSCH et al., 2008).

O tratamento da hipertensão pulmonar tem avançado nos últimos anos, mas infelizmente as alternativas terapêuticas disponíveis ainda são de eficácia limitada, associadas a complicações e de custo elevado (MICHELAKIS et al., 2003). O uso do inibidor da 5-fosfodiesterase (PDE5) sildenafil tem mostrado bons resultados com melhora hemodinâmica e da capacidade funcional em pacientes com hipertensão pulmonar. Entretanto, são necessárias várias administrações diárias e nas doses utilizadas apresenta um alto custo (MICHELAKIS et al., 2003; MICHELAKIS et al., 2002).

2.4. EFEITOS CARDIOVASCULARES DOS INIBIDORES DE PDE-5

Foi relatado que o sildenafil amplia o vaso relaxamento induzido por óxido nítrico (NO) em vasos (CREMERS et al., 2003) e causa dilatação das artérias coronárias epicárdicas quando administrado a pacientes com doença arterial coronariana (HALCOX et al., 2002). Isoladamente nas artérias aorta, mesentéricas e coronárias, o sildenafil aumentou os níveis de GMPc e induziu o vaso relaxamento na ausência de NO exógeno, devido provavelmente, a uma amplificação de NO/GMPc preexistente nesses vasos (BUVINIC AND HUIDOBRO-TORO, 2001; MOCHIDA et al., 2002; SAKUMA et al., 2002).

Dados experimentais recentes mostraram que tadalafil, mas não sildenafil ou vardenafil, inibiu a vasoconstrição hipóxica pulmonar através da atenuação de hipóxia-induzida pela expressão de citocina na artéria pulmonar (TSAI et al., 2006). Portanto, inibidores de PDE5 tornaram-se um ponto focal na busca de novos vasodilatadores para uso clínico. Um desses inibidores é o tadalafil, necessitando ainda de estudos no tocante dos efeitos desse fármaco nos vasos sanguíneos. No entanto, presume-se que as propriedades de vaso relaxamento do tadalafil são semelhantes aos do sildenafil em artérias isoladas, apesar das

diferenças nos seus parâmetros farmacocinéticos (SUSSMAN, 2004). Segundo Kruuse et al (2012), que avaliou os efeitos do sildenafil e tadalafil nas artérias cerebrais de ratos adultos, o sildenafil teve maior efeito na dilatação de artérias cerebrais que o tadalafil.

2.5. CONTROLE ENDÓCRINO E A FUNÇÃO TESTICULAR

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

A espermatogênese é um processo complexo e organizado que ocorre nos túbulos seminíferos com duração de 40 a 60 dias, na maioria dos mamíferos (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Este processo pode ser dividido em três fases com base em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas, (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides apresentam enormes modificações, transformando-se em células especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (RUSSELL et al., 1990).

Existem três tipos de espermatogônias: espermatogônia célula-tronco, espermatogônia proliferativa e espermatogônia de diferenciação. As espermatogônias conhecidas por serem as

células-tronco são chamadas de espermatogônias $A_{isolada}$ (A_{is}), enquanto outras espermatogônias tipo A são proliferativas ($A_{pareada}$ – A_{pr} e $A_{alinhada}$ – A_{al}) e diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , intermediária – In , e tipo B). Ao final da fase de diferenciação, a espermatogônia mais madura se divide para formar o espermatócito primário jovem. Especificamente, as células do tipo B se dividem para formar espermatócitos preleptóteno (PI). A prófase da primeira divisão meiótica é de longa duração, em torno de três semanas, e com variações morfológicas (preleptóteno – PI, 43 leptóteno – L, zigóteno – Z, paquíteno – P e diplóteno – Di). A metáfase, anáfase e telófase também fazem parte da primeira divisão meiótica ou meiose I, e formam os espermatócitos secundários. A segunda divisão meiótica ou meiose II segue rapidamente para produzir espermátides. Na fase espermiogênica, a espermátide se transforma em espermatozóide sem divisão celular (DESJARDINS; EWING, 1993).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados e, usualmente, existe somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta sequência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND e CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990; ORTAVANT et al., 1997) (Figura 4).

O processo espermatogênico é regulado por uma complexa inter-relação de sinais endócrinos e parácrinos. O principal regulador hormonal é o GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), um decapeptídeo produzido por neurônios especializados do hipotálamo. A produção de sinais pulsáteis de GnRH sobre as células gonadotróficas da adenohipófise promovem incremento na síntese e secreção de FSH e LH, os quais agem no testículo regulando o potencial espermatogênico (WALKER e CHENG, 2005) (Figura 5). Além dos hormônios gonadotróficos, outros fatores intratesticulares produzidos pelos componentes do compartimento tubular e intersticial também influenciam o processo espermatogênico, entre os quais podem ser citados testosterona, inibina, endorfina, AMH (Hormônio anti-Mülleriano) e fatores de crescimento regulatório, tais como: $TGF\alpha$ e β (Fator de crescimento transformador alfa e beta), IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina-I), FGF (Fator de crescimento fibroblástico) e EGF (Fator de crescimento epidermal) (TINAJERO et al., 1992; SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSELL, 1998; WALKER e CHENG, 2005).

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

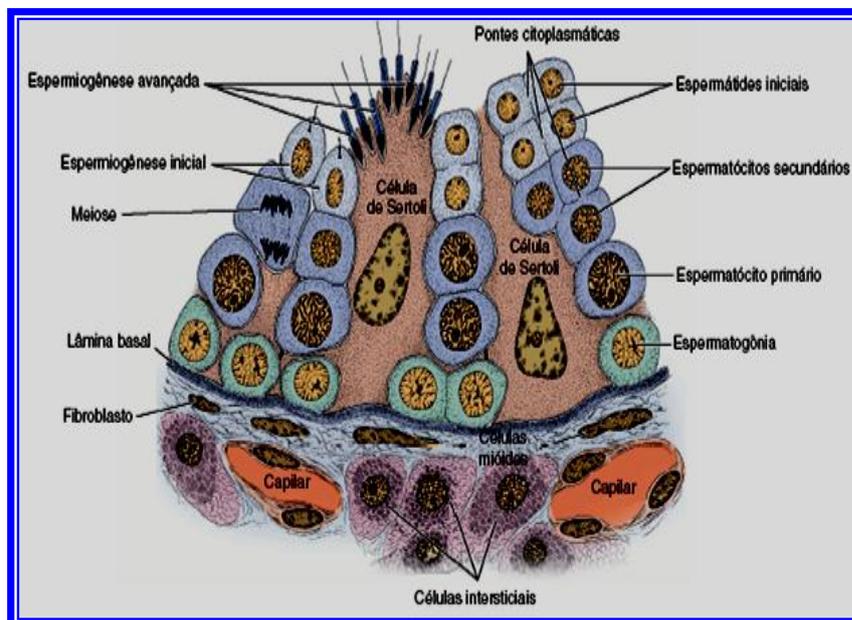


Figura 4. Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero.
Fonte: Desjardins; Ewing, (1993).

convertida em precursores de testosterona no REL antes da síntese de testosterona (CLARK; COCHRUM, 2007; YANG et al., 2007).

As células de Leydig diferenciam-se e segregam testosterona durante o início da vida fetal. No embrião, a secreção de testosterona e de outros andrógenos é essencial ao desenvolvimento normal das gônadas no feto masculino. Na puberdade, este hormônio é responsável pelo início da produção de espermatozoides, secreção das glândulas sexuais acessórias e desenvolvimento das características sexuais secundárias. No adulto, a testosterona é essencial à manutenção da espermatogênese, das características sexuais secundárias, dos ductos excretórios genitais e das glândulas sexuais acessórias (HOSS; PAWLINA, 2008).

O controle da produção de esteróide pela célula de Leydig é dependente da ação de gonadotrofina. A secreção episódica de LH suporta a função esteroidogênica da célula de Leydig através da interação com os receptores de LH na superfície da célula, e pela subsequente estimulação de eventos dependentes de AMPc. Os sítios específicos do receptor de LH ativam a adenilil ciclase dentro da membrana plasmática após a ligação do LH/hCG. A rápida estimulação da adenilil ciclase é responsável pela ação trófica e esteroidogênica do LH na célula de Leydig via ativação da proteína quinase e posterior fosforilação de proteínas regulatórias que controlam enzimas esteroidogênicas envolvidas na biossíntese de andrógeno (DUFAU, 1988).

Em adição aos esteróides, as células de Leydig sintetizam e secretam uma variedade de produtos peptídicos, tais como peptídeos derivados da proopiomelanocortina, encefalinas e dinorfinas, fator liberador de corticotropina, ocitocina, e renina-angiotensina. A função mais bem entendida das células de Leydig em mamíferos é a biossíntese e secreção de testosterona. O colesterol é um intermediário obrigatório na produção deste hormônio, e é derivado da biossíntese *de novo* nas células de Leydig a partir de armazenamentos intracelulares e das lipoproteínas mediadas por endocitose (DESJARDINS; EWING, 1993).

O LH, ao se ligar com o receptor de LH (LH-R), induz a síntese de AMPc a partir do ATP. O AMPc catalisa a síntese da PKA, a qual é necessária para o transporte de colesterol de armazenamentos no citoplasma para a mitocôndria. A proteína esteroidogênica regulatória aguda (StAR) e o receptor de benzodiazepina periférico transfere o colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, onde reside a enzima P450_{sec}. Esta enzima converte o colesterol em pregnenolona, que é transferida para o retículo endoplasmático, onde ocorre a síntese de testosterona através de uma série de reações enzimáticas (HAIDER, 2004).

Recentemente, a expressão de PDE5 foi detectada em células de Leydig e células peritubulares, identificadas como mióides, no testículo de ratos pré-púberes e adultos. Foi

demonstrado que as células de Leydig contêm GMPc e sua proteína ligante (Proteína Kinase tipo D), além de guanilil ciclase B, receptor de peptídeo natriurético tipo C, e os principais componentes da via do NO. Nas células de Sertoli a expressão de PDE5 não foi detectada, mas diferentes PDEs contribuem para o metabolismo de GMPc (SCIPIONI *et al.*, 2005). De fato, a hidrólise de GMPc nestas células é estimulada por membros da família PDE1 dependentes de cálcio-calmodulina (CONTI *et al.*, 1982; ROSSI *et al.*, 1985; CONTI *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 1997).

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

De acordo com Fawcett *et al.* (2000) e Baxendale *et al.* (2001) cães tratados diariamente com tadalafil durante 6 e 12 meses apresentaram alterações do epitélio seminífero, resultando em diminuição na espermatogênese de alguns animais. Saraiva *et al.* (2010) observou que o uso de sildenafil por 30 e 60 dias são consistentes com a estimulação da biossíntese de androgênio e mudanças espermáticas. Segundo Andric *et al.* (2010) houve aumento nos níveis de testosterona em ratos tratados cronicamente com sildenafil.

3.OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL:

- Analisar o efeito de 25mg/kg do tadalafil sobre a função testicular de camundongos *Swiss Webster* adultos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a ultra-estrutura das células de Leydig após tratamento com tadalafil.
- Avaliar possíveis alterações na produção de testosterona plasmática após o tratamento.
- Avaliar os parâmetros espermáticos após o tratamento com tadalafil.
- Avaliar morfometricamente a influência do tadalafil na estrutura testicular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tratamento dos Animais

A avaliação dos efeitos do tratamento do tadalafil sobre a função testicular foi feita por meio de ensaio *in vivo* no qual foram utilizados 15 camundongos *Swiss Webster (Mus musculus)* machos pré-púberes com 30 dias de vida, pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do DMFA/UFRPE, divididos em grupo Controle (n=8) e tratado (n=7), mantidos na temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração comercial Purina Labies[®], foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Nos animais do grupo tratado foi aplicado diariamente com 25mg/kg Tadalafil, pela via intraperitoneal. Nos animais do grupo controle foi realizada aplicação de solução para injeção estéril pela mesma via, não tendo diferenciação de manejo entre os grupos.

Após 30 dias do esquema terapêutico os animais foram heparinizados, anestesiados com ketamina (115mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e, em seguida, o sangue foi coletado via punção cardíaca e armazenado a -20°C , para análise hormonal. Seguido o sacrifício do animal por aprofundamento anestésico, foi realizada perfusão com solução de gluteraldeído a 4% tampão fosfato 0,1 M em pH 7,4. O fígado, rins, baço, próstata, vesícula seminal, epidídimos e testículos foram coletados e pesados. Fragmentos de testículos foram obtidos e processados para microscopia óptica e eletrônica de transmissão. As carcaças dos animais foram autoclavadas e descartadas em lixo biológico destinado à incineração.

4.2. Estudo Histológico

Os testículos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura e submetidos à refixação na mesma solução de perfusão. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA). Cortes histológicos de 4 μm de espessura foram corados em azul de toluidina/borato de sódio a 1% e analisados morfológicamente e morfometricamente.

No testículo, o diâmetro tubular e a altura do epitélio foram medidos em aumento de 100X usando-se retículo micrométrico linear (10mm/100 - Olympus) calibrado com um micrômetro padrão. O diâmetro tubular médio para cada camundongo foi obtido a partir da mensuração de quinze túbulos, em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, escolhidos aleatoriamente, com perfis redondos ou arredondados. A altura do epitélio foi obtida nos mesmos túbulos utilizados para determinar o diâmetro tubular. Para tal, tomaram-se duas

medidas diametralmente opostas, tendo como referência a túnica própria e o limite entre o lume e epitélio germinativo determinando-se, desta forma, a altura média do epitélio seminífero.

Os dados volumétricos da composição do parênquima testicular foram obtidos usando contagem de pontos por alocação sistemática de graticula micrométrica (Olympus) com 441 pontos de intersecção sobre a preparação histológica de testículo em aumento de 400X. Quinze campos foram contabilizados aleatoriamente somando um total de 6615 pontos para cada animal.

O testículo é dividido em dois compartimentos, tubular e intertubular ou intersticial. Do primeiro avaliou-se a túnica própria, o epitélio seminífero e o lume; enquanto no segundo foram investigados as células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. Como a densidade do testículo é em torno de 1,03 a 1,04 (FRANÇA, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada componente do testículo, expresso em μL foi estabelecido a partir do produto entre a densidade volumétrica dos constituintes testiculares (%) e o peso líquido do testículo (mg) (MENDIS-HANDAGAMA ET AL., 1990)

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo expresso em metros foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada $CT = VTS / \pi R^2$, onde VTS = Volume total de túbulos seminíferos; πR^2 = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos (R = diâmetro tubular/2) (ATTAL e COUROT, 1963; DORST e SAJONSKI 1974).

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio 7 do ciclo, classificado de acordo com o método acrossômico (RUSSELL et al., 1990) foi feita a partir de contagens dos núcleos das células germinativas e de nucléolos das células de Sertoli. Nestas contagens, foram utilizadas 5 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Os núcleos dos seguintes tipos celulares foram contados: espermatócitos I, na fase de pré-leptóteno/ leptóteno (SPT I Pl/L); espermatócitos I, na fase de paquíteno (SPT I P); espermátides arredondadas (SPD Ar); nucléolo de células de Sertoli.

Com exceção dos núcleos das células de Sertoli, as contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a seguinte fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962):

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM^2}{2}\right) - \left(\frac{DM^2}{4}\right)}}$$

O diâmetro nuclear médio (D.M.) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos do tipo celular estudado, para cada animal. Os diâmetros nucleares foram medidos com o auxílio de retículo micrométrico linear (10mm/100 - Olympus) adaptada a uma das oculares de 10x e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento final de 1000x. No caso das espermatogônias do tipo A que apresentam núcleos ovóides, o valor utilizado foi aquele obtido pela média entre diâmetro nuclear maior e menor. Os números de células de Sertoli foram corrigidos para o diâmetro nucleolar e espessura do corte histológico, em virtude disto, contabilizou-se exclusivamente células de Sertoli com nucléolo visível, o que proporcionou aplicação da mesma fórmula citada anteriormente.

A população total de células de Sertoli por testículo foi obtida a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978): Número de células de Sertoli por testículo = [Comprimento total de túbulos Seminíferos (µm) X Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal] / Espessura do corte (µm)

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com RUSSELL et al., (1990): PED = N° Total de células de Sertoli por testículo X a proporção de espermátides redondas no estágio VII x estágio VII com frequência relativa (0,0993) / duração do estágio (0,836 dias).

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA (MET)

Os fragmentos dos testículos foram lavados duas vezes em PBS pH 7.2 e fixados overnight em solução contendo glutaraldeído 4,0%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 2mM CaCl₂ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2. Novamente lavadas em tampão cacodilato e contrastadas em bloco com acetato de uranila a 2,5%. A seguir, elas foram desidratadas em série crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPINPON (Sigma Company, St Louis, MO). A polimerização foi feita a 60°C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel de 300-mesh e contrastados com 5% de acetato

de uranila e citrato de chumbo (SARAIVA et al., 2006). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D.

4.4. DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA

A dosagem de testosterona foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descritos por Brown et al. (2004).

Para este ensaio inicialmente 66,7µl do anticorpo (Polyclonal anti-testosterona R156/7, Coralie Munro, University of California, Davis, USA.) foi diluído em 5 ml de tampão (coating buffer; Na₂CO₃, NaHCO₃, H₂O ultra pura, pH ajustado para 9,6) e 50µl desta solução de anticorpo foram adicionados em cada poço da placa (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp). Posteriormente, a placa foi coberta com selador plástico e mantida a 4°C por no máximo 12 horas.

Uma vez preparada a placa, procedeu-se com a curva padrão, por meio de diluições seriadas de 250µl do padrão de concentração 600 pg/50µl de testosterona (17-hydroxy-4-androsten-3-one, Steraloids, Sigma A6950) até a concentração de 2,3 pg/50µl, em 250µl de solução de ensaio de ELISA (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; BSA - Sigma Aldrich, A7906; H₂O ultra pura, pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado com a enzima HRP (Testosterone-horseradish Peroxidase) também será diluído (33,3µl em 5 ml da solução de ensaio de ELISA).

Imediatamente antes de dar início ao ensaio, a placa foi lavada 5 vezes com a solução de lavagem (NaCl; Tween 20 – Sigma, P1379; H₂O ultra pura), sendo o excesso de solução retirada batendo-se a placa em papel toalha. A seguir, em cada um dos poços correspondentes serão pipetados 50µl dos padrões, controles, amostras e logo após 50µl da HRP, não ultrapassando mais de 10 minutos neste processo. A placa será novamente coberta com o selador e deixada incubando por exatamente 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período será repetido o procedimento de lavagem.

Finalmente, imediatamente antes do uso, foi preparada a solução de substrato para ELISA combinando 40µl 0,5M H₂O₂, 125µl 40 mM ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e 12,5 ml de solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; H₂O ultra pura, pH ajustado para 4,00). Foi adicionado 100µl em todos os poços contendo padrão, controle ou amostra. As placas foram cobertas e incubadas em temperatura ambiente e sob agitação (Multi-Pulse Vortexer; modelo 099A VB4, 50 / 60Hz – Glass-Col ®), até que a densidade óptica dos poços zero fique entre 0.9 e 1. Então, procedeu-se leitura no leitor de

microplacas (TECAN). Todas as amostras foram lidas em duplicata, com coeficiente de variação intra e inter-ensaio menor do que 10 %.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância através do Método ANOVA utilizando-se o programa InStat®, uma vez que os dados se distribuíram de forma normal na curva de normalidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 pode ser observado o desenvolvimento ponderal dos animais do grupo tratado em relação ao grupo controle, onde não se constatou diferença significativa de peso entre os animais.

Tabela 1. Desenvolvimento ponderal de camundongos Swiss controles e tratados 25mg/Kg de Tadalafil dos 30 aos 60 dias de idade (Média ± desvio padrão). p = 0,05

Grupos Experimentais			
Dias	Controle (n=8)	25mg/kg (n=7)	P
1	38,2 ± 5,63	43,09 ± 7,11	0,0989
5	40,0 ± 4,87	44,09 ± 7,93	0,2152
10	38,71 ± 4,11	43,73 ± 6,89	0,1031
15	39,14 ± 4,56	42,82 ± 6,23	0,1980
20	38,12 ± 3,04	42,18 ± 6,06	0,1016
25	39,25 ± 4,23	41,27 ± 6,99	0,4786
30	40,50 ± 4,31	42,45 ± 6,45	0,4684

Na tabela 2 pode ser observado que não houve alteração significativa no peso corporal (g), testicular (g) e dos demais órgãos de camundongos albinos Swiss controles e tratados 25mg/Kg de Tadalafil aos 60 dias de idade.

Tabela 2. Parâmetros biométricos de camundongos albinos *swiss* controles e tratados com 25mg/Kg de Tadalafil dos 30 aos 60 dias de idade (Média ± desvio padrão). p = 0,05

Grupos Experimentais			
Parâmetros	Controle	25mg/kg	P
Peso Corporal (g)	40,50 ± 4,31	42,45 ± 6,45	0,4684
Peso Testicular (g)	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,6920
Epidídimo (g)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,6488
Vesícula Seminal (g)	0,20 ± 0,08	0,21 ± 0,08	0,6673
Próstata (g)	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,07	0,9146
Fígado (g)	2,24 ± 0,49	2,07 ± 0,51	0,4833
Pulmão (mg)	0,33 ± 0,11	0,31 ± 0,07	0,6103
Rim	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,07	0,5525
IGS	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,04	0,9416

Na tabela 3 podem ser observados os resultados referentes ao peso líquido do testículo (μ l) e parâmetros volumétricos do parênquima testicular (μ l) de camundongos albinos *swiss* controles e tratados 25mg/Kg de tadalafil aos 60 dias de idade. Os parâmetros volumétricos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Entretanto, se observou uma tendência de 18% de aumento na quantidade de vasos no grupo tratado com relação ao grupo controle. Este evento pode ser explicado pelas propriedades vasodilatadoras do tadalafil. Segundo Kruuse et al (2004), que avaliou os efeitos do sildenafil e tadalafil nas artérias cerebrais de ratos adultos, o sildenafil teve maior efeito na dilatação de artérias cerebrais que o tadalafil.

Tabela 3: Peso líquido do testículo (mg) parâmetros volumétricos do parênquima testicular (μ l) de camundongos albinos *swiss* controles e tratados 25mg/Kg de tadalafil aos 60 dias de idade (Média ± desvio) padrão). p = 0,05.

Grupos Experimentais			
Parâmetros	Controle	25mg/kg	P
Peso Líquido (mg)	86,37 ± 29,34	90,84 ± 11,66	P 0,7122
Túbulo Seminífero	80,05 ± 22,06	76,95 ± 10,30	P 0,7393
Epitélio Seminífero	61,33 ± 16,90	61,46 ± 7,26	P 0,9845
Lume	13,01 ± 4,02	10,31 ± 3,17	P 0,1768
Túnica Própria	5,71 ± 1,60	5,18 ± 0,70	P 0,4264
Leydig	5,43 ± 2,50	4,65 ± 1,17	P 0,4668
Conjuntivo	0,66 ± 0,39	0,46 ± 0,21	P 0,2539
Vaso Sanguíneo	1,06 ± 0,39	1,30 ± 0,35	P 0,2261
Espaço Linfático	2,51 ± 1,56	2,19 ± 1,00	P 0,6441

Cremers et al., (2003) e Halcox et al., (2002) relataram que o sildenafil amplia o vasorelaxamento induzido por Óxido Nítrico (NO) em vasos humanos e causa dilatação das artérias coronárias epicárdicas quando administrado a pacientes com doença arterial coronariana. Isoladamente nas artérias aorta, mesentéricas e coronárias, o sildenafil aumentou os níveis de GMPc e induziu o vasorelaxamento na ausência de NO exógeno devido, provavelmente, a uma amplificação de NO/GMPc preexistente nesses vasos (BUVINIC AND HUIDOBRO-TORO, 2001; MOCHIDA et al., 2002; SAKUMA et al., 2002).

Ao contrário do que se observou com a volumetria dos vasos sanguíneos, o tecido conjuntivo dos animais tratados apresentou tendência de redução em sua volumetria em torno de 30%. Provavelmente, a estreita relação entre os componentes do compartimento intertubular podem ter estabelecido uma compensação para redistribuição volumétrica, uma vez que, um dos componentes apresentou tendência de aumento.

Os resultados referentes aos parâmetros biométricos e histomorfométricos do testículo, população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) estão registrados na tabela 4. De acordo com estes resultados foi observado que os camundongos tratados com tadalafil apresentaram uma tendência de 23% (P= 0,0848) de aumento na produção espermática diária por testículo (PED/ testículo) e tendência de aumento de 15% na PED/grama de testículo (Tabela 4). Em experimento realizado com cães tratados diariamente com tadalafil durante 6 e 12 meses, estes animais apresentaram alterações do epitélio seminífero, resultando em diminuição na espermatogênese de alguns cães (FAWCETT et al., 2000; BAXENDALE et al., 2001).

O uso prolongado de drogas inibidoras de fosfodiesterases parece ter efeito degenerativo sobre o epitélio seminífero, o qual pode estar relacionado a efeito colateral sobre a produção de testosterona, onde o excesso deste andrógeno poderia ter efeito inibitório. Outra possibilidade seria a redução dos níveis de receptores de LH em células de Leydig após períodos prolongados de GMPc intracelular devido a inibição da PDE5 pelos inibidores (SARAIVA et al, 2010). Por outro lado, de acordo com Jarvi et al. (2008) o tratamento crônico de homens por seis meses com vardenafil, sildenafil e placebo não alterou a estrutura dos espermatozoides, assim como não houve elevação nos níveis de hormônios reprodutivos.

A tendência de aumento na PED/testículo se deve provavelmente ao aumento relativo de testosterona em 12% (Tabela 6). As células de Leydig, através da produção de testosterona, regulam o desenvolvimento e a atividade do trato reprodutivo masculino, as características sexuais externas e estimula a espermatogênese (CLARK; COCHRUM, 2007; YANG et al., 2007).

De acordo com Carosa et al. (2004) homens que sofrem de disfunção erétil possuem níveis de androgênio significativamente menores que aqueles normais. E segundo o mesmo autor, o tratamento com dois tipos de inibidores de PDE5, Sildenafil (50mg) e Tadalafil (20mg) aumentou os níveis de testosterona.

A tendência de aumento dos níveis séricos de testosterona do grupo tratado corrobora com Mindderdorf et al (1997; 2000) que diz que a cascata CNP/GC-B/GMPc promove uma variedade de efeitos biológicos no testículo, tal como modulação da motilidade de espermatozoides, desenvolvimento das células germinativas testiculares e síntese de testosterona. Esse aumento provavelmente se deu pelo acúmulo de GMPc intracelular pelo bloqueio com o PDE5, que provocou uma maior produção deste hormônio pelas células de Leydig. Processos mediados por GMPc no testículo de mamíferos não somente influenciam a vasodilatação, mas também, a síntese de testosterona pelas células de Leydig (SCIPIONE et al, 2005). Saraiva et al (2010) observou que o uso de sildenafil por 30 e 60 dias são consistentes com a estimulação da biossíntese de androgênio e mudanças espermáticas.

Tabela 4: Parâmetros biométricos e histomorfométricos do testículo, população de células de Sertoli, produção espermática diária por testículo (PED) e por grama de testículo (PED/g) em camundongos albinos swiss controles e tratados com 25mg/Kg de Tadalafil aos 60 dias de idade (Média ± desvio padrão) p = 0,05

Grupos Experimentais			
Parâmetros	Controle	25mg/kg	P
Peso Líq. do Testículo (µl)	86,37 ± 29,34	90,19 ± 10,17	P 0,7122
Diâmetro Tubular	210,63 ± 22,21	206,49 ± 19,83	P 0,7118
Altura do Epitélio	64,51 ± 8,76	59,20 ± 4,25	P 0,1279
Sertoli/secção transversal de túbulo seminífero	6,51 ± 0,81	6,754 ± 1,12	P 0,6294
SPDar/secção transversal	98,54 ± 5,81	93,17 ± 10,59	P 0,3089
ICS	15,41 ± 2,64	13,99 ± 1,86	P 0,2554
Comprimento Total de Túbulo Seminífero(m)	2,25 ± 0,51	2,24 ± 0,48	P 0,9734
Pop. Cel. Sertoli (x10⁷)	3,6 ± 0,72	3,75 ± 0,78	P 0,7430
PED/Testículo (x10⁶)	6,6 ± 1,71	8,6 ± 2,49	P 0,0848
PED/g/Testículo (x10⁶)	83,53 ± 29,01	98,19 ± 34,48	P 0,3872

ICS = Índice de células de Sertoli; SPDar = espermátide arredondada por secção transversal; PED = produção espermática diária.

De acordo com a tabela 5, não foram encontradas alterações significativas na população de células do parênquima testicular por secção transversal, com exceção das espermátogônias, onde se observou tendência de redução destas células nos animais tratados com tadalafil em comparação ao grupo controle em cerca de 51% (p =0,051).

Tabela 5: População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio VII do Ciclo do Epitélio Seminífero (CES) de camundongos albinos Swiss controles e tratados com 25mg/Kg de Tadalafil aos 60 dias de idade.

Grupos Experimentais			
Parâmetros	Controle	25mg/kg	P
Espermatogônia	0,35 ± 0,18	0,17 ± 0,14	0,0510
Nucléolo Cel. Sertoli	6,51 ± 0,81	6,75 ± 1,18	0,6294
Pré-leptóteno	15,14 ± 2,28	13,76 ± 1,52	0,3911
Paquíteno	23,27 ± 2,28	23,70 ± 3,25	0,7672
Espermátide Arredondada	98,54 ± 5,81	93,17 ± 10,60	0,2372

p= 0,05.

Na tabela 6 pode ser observada uma tendência de aumento de 20% na população de células de Leydig. Embora não sendo estatisticamente significativo, este aumento provavelmente esta relacionado à tendência de elevação nos níveis de testosterona em 12% nos animais tratados.

O presente trabalho mostrou que o tratamento agudo com tadalafil apresentou uma tendência no aumento nos níveis de testosterona pelas células de Leydig. Segundo Saraiva et al. (2010) os níveis séricos de testosterona aumentaram em camundongos tratados com sildenafil. O mesmo foi observado por Andric et al. (2010) em ratos tratados cronicamente com sildenafil.

Tabela 6: Parâmetros morfométricos das células de Leydig e níveis séricos de testosterona de camundongos albinos swiss controle e tratado com 25mg/Kg de Tadalafil aos 60 dias de idade (Média ± desvio padrão). p= significância.

Grupos Experimentais			
Parâmetros	Controle	25mg/kg	P
Volume cel. Leydig (μm^3)	1837,36 ± 304,5	1484,4 ± 343,7	0,0548
Volume total de cel. Leydig/testículo (μm^3) x 10⁹	5,39 ± 2,53	5,50 ± 1,64	0,9245
População total de cel. Leydig/testículo x 10⁶	3,25 ± 1,61	4,04 ± 1,69	0,3462
Testosterona Sérica	170,18± 22,43	193,16 ± 50,94	0,2513

O volume das células de Leydig no grupo tratado apresentou tendência de redução (19%; p =0,0548) em comparação ao controle. Saraiva et al., (2010) encontrou aumento na área das células de Leydig nos animais tratados com sildenafil por 30 e 60 dias.

O tadalafil não teve efeito degenerativo no testículo de camundongos, como pode ser visto na figura 6. Nesta podemos observar túbulos seminíferos dos animais tratados em diversos estágios do ciclo do epitélio seminífero, e não se observou células em processo degenerativo, necrótico ou apoptótico nos túbulos seminíferos. No espaço intertubular não

foram evidenciadas alterações dignas de nota. Tadalafil não teve efeitos adversos sobre a fertilidade em ratos ou no aparelho reprodutor masculino de ratos e camundongos. Não foi carcinogênico para ratos e camundongos, nem mutagênico, nem genotóxico (Lilly ICOS LLC, 2003).

Na microscopia óptica nenhuma diferença morfológica foi observada entre células de Leydig do grupo controle e do grupo tratado, concordando com Saraiva et al (2010) que obteve o mesmo resultado no uso crônico do sildenafil.

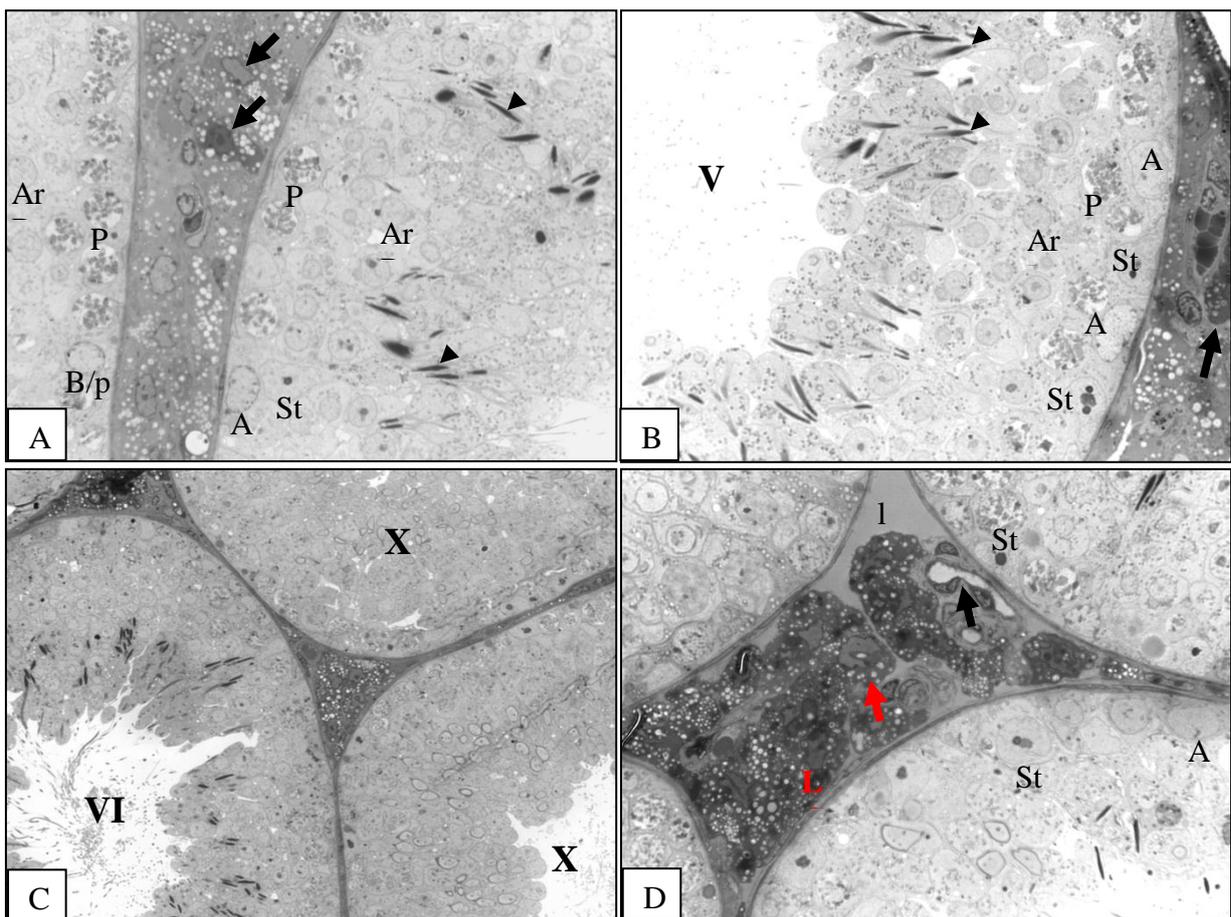


Figura 6: Fotomicrografias do parênquima testicular de camundongos Swiss adultos controle e tratados; Figura 6.a. Corte transversal do parênquima testicular de camundongos do grupo controle em estágio VI do epitélio seminífero, células de Sertoli (St); espermatogônias do tipo A (A); Espermátides Arredondadas (Ar) e espermatogônias do tipo A (A); Região intertubular com Células de Leydig (setas) com citoplasma repleto de gotículas de lípide. Figura 6.b Corte transversal de túbulo seminífero em estágio V do epitélio seminífero, notar presença de células De Sertoli (St), Paquetinos (P), espermátides arredondadas (Ar); Figura 6.c Corte Transversal de túbulos seminíferos em estágios VI e X epitélio seminífero; Figura 6.d Inter túbulo de testículo de animal tratado, notar espaço linfático (l); células de

Leydig (L), presença de vasos (seta preta) e macrófagos (seta vermelha); e no parênquima testicular presença de células de Sertoli (St) e espermatogônias do tipo A (A). Aumento de 1000x.

Na microscopia eletrônica as células de Leydig do grupo controle apresentaram formato poligonal irregular, em alguns casos, núcleos assimétricos localizados excentricamente no corpo das células com nucléolo aparente. As mitocôndrias eram numerosas e espalhadas no citoplasma com distribuição irregular, seus tamanhos eram variáveis e apresentavam cristas espessas e tubulares. Várias vesículas foram observadas na periferia dos círculos concêntricos de REL, possivelmente envolvidas na secreção de precursores hormonais (Figura 7. A). Achado que foi identificado também por Saraiva et al (2010) que encontrou vesículas na periferia dos círculos concêntricos de REL.

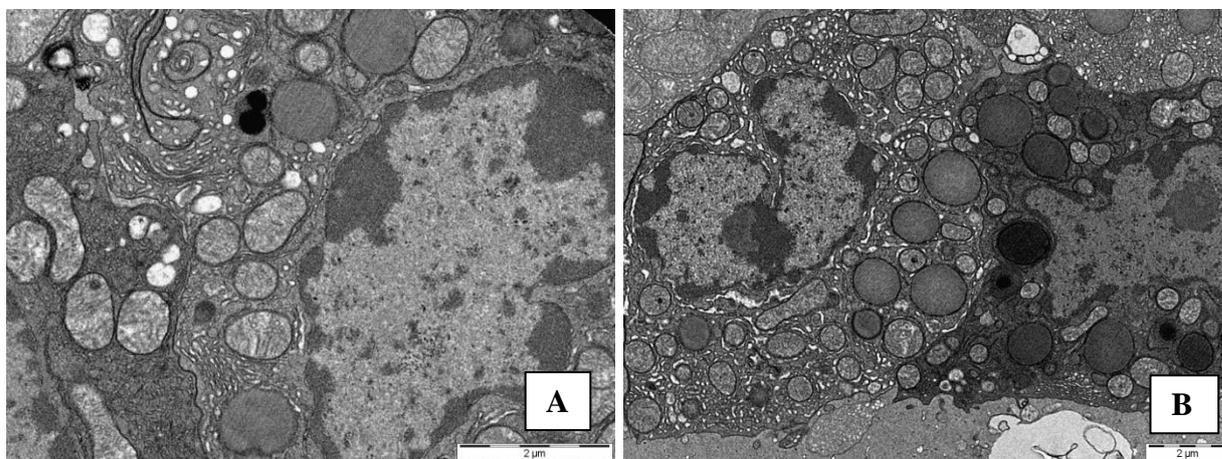


Figura 7(A) e (B): Microscopia eletrônica de células de Leydig controles, onde nota-se grande quantidade de mitocôndrias de vários tamanhos espalhadas em todo o citoplasma.

Na ultra-estrutura de células de Leydig tratadas (Figura 8) pode-se observar grande quantidade de mitocôndrias e de gotículas de lípides em seu citoplasma, além de presença de mitocôndrias em degeneração (Figuras 8 E e F) o que pode estar relacionado a uma grande atividade celular.

Nos animais tratados com tadalafil por 30 dias observou-se presença de Lamelas Aneladas, que quando presentes em uma célula estão relacionadas à autofagia celular, onde por um motivo de super estímulo celular, ela precisa englobar organelas da célula, como mitocôndrias por exemplo, em um mecanismo de autofagia (Figura 8 C). Hermo et al, (1994) notou a ocorrência de corpos multivesiculares (lamelas aneladas), com conteúdo complexo, aparentemente, suportando a ocorrência de endocitose no epidídimo de ratos, ou talvez tendo

relação com a ocorrência de processos lisossomais de digestão autofágica. A quantidade de organelas lameladas, nas células secretoras de esteróides, pode estar relacionada a um processo de adaptação ou regulação da atividade secretora, já que a intensidade da autofagia varia com a flutuação da secreção de esteróides (JING et al, 1995). Segundo Tang et al. (1988) a autofagia é mais comum em células de Leydig que em outros tipos celulares.

Saraiva et al. (2010) relata que após dois meses do esquema terapêutico, as células de Leydig apresentaram sinais de adaptação ao tratamento. Uma exposição prolongada a um estímulo pode reduzir a resposta celular pela alteração do mecanismo de sinalização, fazendo a célula retornar a uma situação desligada (ALBERTS et al., 2004). Essa hipótese poderia ter sido confirmada ou não, com o uso do tadalafil, se um experimento mais prolongado fosse realizado, e a administração da droga se fizesse por 60 ou 90 dias.

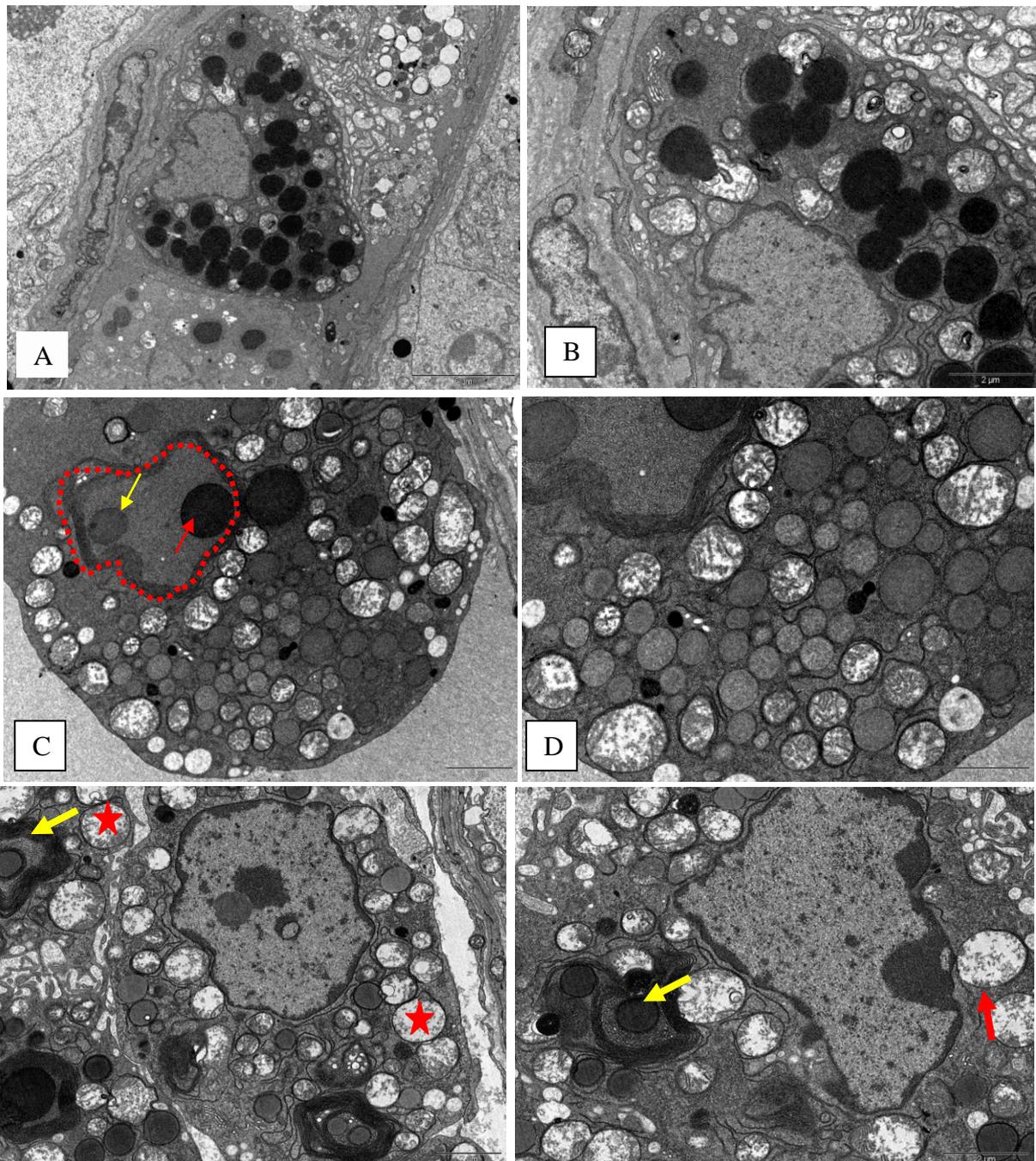


Figura 8: A. Célula de Leydig com citoplasma preenchido por gotículas de lipídios preenchendo quase totalmente o citoplasma. Observe arranjo típico de células produtoras de esteróides, onde as mitocôndrias tem aspecto oval e de tamanhos variados próximas às gotículas de lipídios. O núcleo esta deslocado para periferia celular e possui cromatina frouxa e nucléolo ausente. As células parecem estar em intensa atividade esteroidogênica. Figura 8. B. Detalhe da foto anterior, onde se tem uma interação entre as gotículas de lípidis e as mitocôndrias, com presença de gotículas no interior das mesmas. Figura 8.C. Detalhe da célula de Leydig onde podemos observar o citoplasma preenchido por mitocôndrias. Notar que existem mitocôndrias de vários tamanhos sendo que as maiores apresentam desorganização estrutural da matriz mitocondrial e das cristas mitocondriais. Notar redução da quantidade de gotículas de lípides entre as mitocôndrias. Observe a área circundada com a linha tracejada em vermelho. Esta estrutura e composta por uma série de membranas organizadas em círculo e se chama lamelas aneladas. Normalmente estas organelas aparecem em situações de autofagia de outras organelas. No centro é possível observar uma gota de lipídeo (seta vermelha), uma mitocôndria (SETA AMARELA). Entre estas o citoplasma esta repleto de reticulo endoplasmático liso. Figura 8. D. Detalhe da foto descrita anteriormente. Observar que existe um grande número de mitocôndrias, onde as maiores apresentam desorganização da matriz e das cristas mitocondriais. O espaço entre as mitocôndrias esta preenchido por reticulo endoplasmático liso. Figura 8. E. Células de Leydig com citoplasma preenchido por mitocôndrias (estrela vermelha) de diferentes tamanhos em diferentes estágios de degeneração. Algumas gotículas de lipídios são observadas entre as mitocôndrias, mas o que devemos salientar é a presença das lamelas aneladas onde encontramos no centro 2 gotículas de lipídeos circundadas por reticulo endoplasmático (seta amarela). O núcleo central possui a cromatina frouxa, nucléolo com cromatina acessória. Figura 8. F. Detalhe de Células de Leydig em maior ampliação com citoplasma preenchido por mitocôndrias (estrela vermelha) de diferentes tamanhos em diferentes estágios de degeneração. Algumas gotículas de lipídios são observados entre as mitocôndrias, mas o que devemos salientar é a presença das lamelas aneladas onde encontramos no centro 1 gotícula de lipídeo circundada por reticulo endoplasmático (seta amarela). O núcleo central possui a cromatina frouxa, nucléolo com cromatina acessória. (Prancha com 2 μm).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tadalafil não interfere negativamente sobre a função testicular quando utilizado por 30 dias em dosagem única de 25mg/Kg, pela via intraperitoneal. Em relação à ultraestrutura das células de Leydig os achados são compatíveis com uma super estimulação destas células na produção de esteróides.

7. REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **The Anatomical Records**, Birmingham, v.94, p.238-248,1946.
- ABRAMS D.; SCHULZE-NEICK I.; MAGEE A. G. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary, pulmonary hypertension. **Heart**. v. 84, p. 1-2, 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2004.
- ALVAREZ, J. D.; HANSEN, A.; ORD, T.; BEBAS, P.; CHAPPELL, P. E.; GIEBULTOWICZ, J. M.; WILLIAMS, C.; MOSS. S.; SEHGAL. A. The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice. **Journal of Biological Rhythms**, v. 23, p. 26-36, 2008.
- AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal Dairy Science**. v.45, p.774-781,1962.
- ANDRIC, A. S.; JANJIC, M. M.; STOJOKOV, N. J.; KOSTIC, T. S. Sildenafil Treatment in Vivo Stimulates Leydig Cell Steroidogenesis via the cAMP / cGMP signaling pathway. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**. v. 299p. E544 – E550, 2010.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Developpement testiculaire et etablissement de la spermatogeneses chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**.v.3, p.219-241, 1963.
- BALLARD S. A., *et al.* Sildenafil, an inhibitor of Phosphodiesterase type 5, enhances nitric oxide mediated relaxation of human corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**. v. 8, p. 103,1996.
- BAXENDALE, R. W.; BURSLEM, F. & PHILLIPS, S. C. Phosphodiesterase type 11 (PDE11) cellular localisation: progress towards defining a physiological role in testis and/or reproduction. **The Journal of Urology**, 165: 340,2001.
- BECKER, A. J.; UCKERT, S.; STIEF, C. G. The basics of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition in urology. **The Journal of Urology**. Berlin, v. 47, p. 1582-1587, 2008.
- BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S.A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G.J.; NAYLOR, A.M.; OSTERLOH, I.H.; GINGELL, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**. p. 47–52,1996.

BROCK, G. B.; MCMAHON, C. G.; CHEN, K. K.; COSTIGAN, T.; SHEN, W.; WATKINS, V. Efficacy and safety of tadalafil in the treatment of erectile dysfunction: results of integrated analyses. **The Journal of Urology**. v.168, p.1332, 2002.

BUVINIC, S.; HUIDOBRO-TORO, J. P. Basal tonic release of nitric oxide coupled to cGMP production regulates the vascular reactivity of the mesenteric bed. **European Journal of Pharmacology**. v, 424, p221–227, 2001.

CAROSA, E.; MARTINI, P.; BRANDETTI, F.; DI STASI, S. M.; LOMBARDO, F.; LENZI, A.; JANNINI, E.A. Type V phosphodiesterase inhibitor treatments for erectile dysfunction increase testosterone levels. **Clinical Endocrinology**. v.61(3): p. 382-386,2004

CHUNG K. F. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. **European Journal of Pharmacology**. v. 533, p. 110-172, 2006.

CLARK, B.J. & COCHRUM, R. K.; The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. **Drug Metabolism Review**. v. 39 (2-3) p. 353-370, 2007.

CONTI, M.; LONA, S.; CUOMO, M.; SWINNEN, J. V.; ODEH, J.; SVOBODA, M. E. Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate of a phosphodiesterase from the rat Sertoli cell. **Biochemistry**. v. 34, p. 7979-7987,1995.

CONTI, M.; TOSCANO, M. V.; PETRELLI, L.; GEREMIA, R. STEFANINI, M. Regulation of follicle-stimulating hormone and dibutyryl adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate of a phosphodiesterase isoenzyme of the Sertoli cell. **Endocrinology**. v. 110, p. 1189-1196,1982.

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

CORBIN J. D.; FRANCIS S. H. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**. v. 56, p. 453-459, 2002.

CORBIN, J. D.; BLOUNT, M. A.; WEEKS, J. L.; BEASLEY, A.; KUHN, K. P.; HO, Y. S.; SAIDJ, L. F.; HURLEY, J. H.; KOTERA, J.; FRANCIS, S. H. [³H] Sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. **Molecular Pharmacology**. v. 63, p. 1364-1372, 2003.

CREMERS, B.; SCHELER, M.; MAACK, C.; WENDLER, O.; SCHAFERS, H. J.; SUDKAMP, M.; BOHM, M. Effects of sildenafil (Viagra) on human myocardial contractility, in vitro arrhythmias and tension of internal mammary arteries and saphenous veins. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.41, p.734–743, 2003.

DESJARDINS, C.; EWING, L. L. **Cell and molecular biology of the testis**. Oxford University Press, 1993.

DIMITRIADIS, F.; GIANNAKIS, D.; PARDALIDIS, N.; ZIKOPOULOS, K.; PARASKEVAIDIS, E.; GIOTITSAS, N.; KALABOKI, V.; TSOUNAPJ, P.; BALTOGIANNIS, D.; GEORGIU, I.; SAITO, M.; WATANABE, T.; MIYAGAWA, I.; SOFIKITIS, N. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. **Asian Journal of Andrology**. v. 10, p. 115-133, 2008.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatsh Veterinary Medicine Journal** v.29, p. 650-652, 1974.

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

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

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

[ELSHAL, M. F.](#); [EL-SAYED, I. H.](#); [ELSAIED, M. A.](#); [EL-MASRY, S. A.](#); [KUMOSANI, T. A.](#) Sperm head defects and disturbances in spermatozoal Chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. **Journal of Clinical Biochemistry**,2009.

FARBER, H. W.; LOSCALZO, J. Pulmonary arterial hypertension. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1655-1665, 2004.

[FAWCETT, L.](#); [AXENDALE, R.](#); [STACEY, P.](#); [MCGROUTHER, C.](#); [HARROW, I.](#); [SODERLING, S.](#); [HETMAN, J.](#); [BEAVO, J. A.](#); [PHILLIPS, S. C.](#) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 3702, 2000.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Tese. Belo Horizonte: UFMG, ICB, p.180, 1991.

FRANÇA, L. R.; RUSSEL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill communications, cap. 16, p . 198-219. 1998.

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

[GHOFRANI, H. A.](#); [VOSWINCKEL, R.](#); [REICHENBERGER, F.](#); [OLSCHEWSKI, H.](#); [HAREDZA, P.](#); [KARADAS, B.](#); [SCHERMULY, R. T.](#); [WEISSMANN, N.](#); [SEEGER, W.](#); [GRIMMINGER, F.](#) Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. **Journal of American College of Cardiology**, v. 44, p. 1488-1496, 2004.

[GHOFRANI, H. A.](#); [WIEDEMANN, R.](#); [ROSE, F.](#); [SCHERMULY, R. T.](#); [OLSCHEWSKI, H.](#); [WEISSMANN, N.](#); [GUNTHER, A.](#); [WALMRATH, D.](#); [SEEGER, W.](#); [GRIMMINGER, F.](#) Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. **Lancet**, v. 360, p. 895-900, 2002.

GHOFRANI, H. A.; VOSWINCKEL, R.; REICHENBERGER, F.; OLSCHEWSKI, H.; HAREDZA, P.; KARADAS, B. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension. **Journal of American College of Cardiology**, v.44, p. 1488-96, 2004.

HAIDER, S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. **International Review of Cytology**, v. 233, p. 181-241, 2004.

HALCOX, J. P.; NOUR, K. R.; ZALOS, G.; MINCEMOYER, R. A.; WACLAWIW, M.; RIVERA, C. E.; WILLIE, G.; ELLAHHAM, S.; QUYYUMI, A. A. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation and myocardial ischemia. **Journal of American College of Cardiology**, v. 40, p.1232– 1240, 2002.

HANSSON, V.; SKALHEGG, B. S.; TASKÉN, K. Cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, p. 81-92, 2000.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**, v. 154, p. 105, 119, 189, 1994.

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

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; LINCOLN, G. A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. **Journal Reproduction and Fertility**, v.54, p.209-213, 1978.

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

[HUMPL, T.](#); [REYES, J. T.](#); [HOLTBY, H.](#); [STEPHENS, D.](#); [ADATIA, I.](#) Beneficial effect of oral Sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 111, p. 3274-3280, 2005.

[JANSZEN, F. H.](#); [COOKE, B. A.](#); [VAN DRIEL, M. J.](#); [VAN DER MOLEN, H. J.](#) The effect of calcium ions on testosterone production in Leydig cells from rat testis. **Biochemistry Journal**, v. 160, p. 433-437, 1976.

[JARVI, K.](#); [DULA, E.](#); [DREHOBL, M.](#); [PRYOR, J.](#); [SHAPIRO, J.](#); [SEGER, M.](#) Daily Vardenafil for 6 Months Has No Detrimental Effects on Semen Characteristics or Reproductive Hormones in Men With Normal Baseline Levels. **The Journal of Urology**, v. 179, p.1060-1065, 2008.

JING, Y.; TANG X. M. The Convergent Point of the Endocytic and Autophagic Pathways in Leydig Cells. **Department of Biophysics and Cell Biology**, Shanghai Second Medical University, 1999.

[KIRSCH, M.](#); [KEMP-HARPER, B.](#); [WEISSMANN, N.](#); [GRIMMINGER, F.](#); [SCHMIDT, H. H.](#) Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 30-40, 2008.

[KOTERA, J.](#); [GRIMES, K. A.](#); [CORBIN, J. D.](#); [FRANCIS, S. H.](#) cGMP-dependent protein kinase protects cGMP from hydrolysis by phosphodiesterase-5. **The Biochemical Journal**, v. 372, p. 419-426, 2003.

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

[KRUUSE, C.](#); [GUPTA, S.](#); [NILSSON, E.](#); [KRUSE, L.](#); [EDVINSSON, L.](#) Differential vasoactive effects of sildenafil and tadalafil on cerebral arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 674 (2-3), p.345-51, 2012.

KWAN, H.; HUANG, Y.; YAO, X. Store-operated calcium entry in vascular endothelial cells is inhibited by cGMP via a protein kinase G-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 6758-6763, 2000.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of New York Academic Science**, v. 55, p. 548-584, 1952

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

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

[LOBATO](#), E. B.; [BEAVER](#), T.; [MUEHLSCHLEGEL](#) J.; [KIRBY](#), D. S.; [KLODELL](#), C.; [SIDI](#), A. Treatment with phosphodiesterase inhibitors type III and V: milrinone and sildenafil is an effective combination during thromboxane-induced acute pulmonary hypertension. **British Journal of Anaesthesia**, v. 96, p. 317-322, 2006.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G.; DUNKERLEY, H. A.; NETHERTON, S. J.; RAYMOND, D. R.; ELBATARNY, H. S.; JIMMO, S. L. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression and targeting in cells of the cardiovascular system. **Molecular Pharmacology**, v.64 p.533–546, 2003.

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

MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; EWING, L. L. Sources of error in estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. **Journal of Microscopy**, v.159, p.73-82, 1990

MICHELAKIS, E. D. ; [TYMCHAK, W.](#); [NOGA, M.](#); [WEBSTER, L.](#); [WU, X. C.](#); [LIEN, D.](#); [WANG, S. H.](#); [MODRY, D.](#); [ARCHER, S. L.](#) Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 108, p. 2066-2069, 2003.

MICHELAKIS E. D.; [TYMCHAK, W.](#); [LIEN, D.](#); [WEBSTER, L.](#); [HASHIMOTO, K.](#); [ARCHER, S.](#) Oral Sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 105, p. 2398-2403, 2002.

MICHELAKIS, E. D.; TYMCHAK, W.; NOGA, M.; WEBSTER, L.; WU, X. C.; LIEN, D.; WANG, S. H.; MODRY, D.; ARCHER, S. L. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v.108, p.2066–9, 2003.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; KERR, J. B.; DE KRETZER, D. M. Experimental cryptorchidism in the adult mouse: Qualitative and quantitative light microscopic morphology. **Journal of Andrology**, v. 11(6), p. 539-47, 1990

MIDDENDORFF, R.; [DAVIDOFF, M. S.](#); [BEHREND, S.](#); [MEWE, M.](#); [MIETHENS, A.](#); [MÜLLER, D.](#) Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function. **Journal of Andrology**, v. 32, p. 41-64, 2000.

MIDDENDORFF R.; [MÜLLER, D.](#); [PAUST, H. J.](#); [HOLSTEIN, A. F.](#); [DAVIDOFF, M. S.](#) New aspects of Leydig cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 424, p. 125-138, 1997.

MOCHIDA, H.; INOUE, H.; TAKAGI, M.; NOTO, T.; YANO, K.; KIKKAWA, K. Sildenafil and T-1032, phosphodiesterase type 5 inhibitors, showed a different vasorelaxant property in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v.440, p.45–52, 2002.

MOLINA, P. E. **Fisiologia Endócrina**. Lange série fisiologia, 2^oed., p 181-199.2007.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **Journal of Cell Biology**, v.84, p. 340-354, 1980

MONTORSI, F.; BRIGANTI, A.; SALONIA, A.; MONTORSI, P.; RIGATTI, P. The use of phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. **Current Opinion in Urology**, v. 14 p. 357–359, 2004.

NAYLOR, A. Sildenafil (VIAGRA): an inhibitor of cyclic GMP-specific Phosphodiesterase type 5 for the treatment of male erectile dysfunction. **European Journal of Urology**, v. 30 , p. 158, 1996.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In COLE, H.H.; CUPS, P.T.(eds). **Reproduction in domestic animals**. 3 ed. New York: Academic press, cap. 8, p. 203-227, 1997.

RASHATWAR, S. S.; CORNWELL, T. L.; LINCOLN, T. M. Effects of 8-bromo-cGMP on Ca²⁺ levels in vascular smooth muscle cells : possible regulation of Ca²⁺-ATPase by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedures of the National Academic Science**, v. 84, p. 5685-5689, 1987.

ROSEN, R. C.; KOSTIS, J. B. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. **American Journal of Cardiology**, v. 92, p. 9–18, 2003.

[ROSSATO, M.](#); [NOGARA, A.](#); [MERICCO, M.](#); [FERLIN, A.](#); [GAROLLA, A.](#); [FORESTA, C.](#) Store-operated calcium influx and stimulation of steroidogenesis in rat Leydig cells : role of Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Edocrinology**, v. 142, p. 3865-3872, 2001.

[ROSSI, P.](#); [PEZZOTTI, R.](#); [CONTI, M.](#); [GEREMIA, R.](#) Cyclic nucleotide phosphodiesterases in somatic and germ cells of mouse seminiferous tubules. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 317-327, 1985.

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

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Ed. Histological and histopathological evaluation of the testis. **Bolesta: Cache River Press**, cap. 1, p. 1-40, 1990.

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

SAKUMA, I.; AKAISHI, Y; TOMIOKA, H.; SATO, A.; KITABATAKE, A.; HATTORI, Y. Interactions of sildenafil with various coronary vasodilators in isolated porcine coronary artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 437, p155–163, 2002.

Saraiva, K. L. A. Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 (Sildenafil) sobre células de Leydig e espermatozóides de camundongos – **Recife: K. L. A. Saraiva, 2010.**

[SCIPIONI, A.](#); [STEFANINI, S.](#); [SANTONE, R.](#); [GIORGI, M.](#) Immunohistochemical localization of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, p. 401-407, 2005.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil. E, Neill, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**, ed.2, New York: Raven Press, v. 1, cap. 22, p. 1363-1434, 1994.

[STOCKER, C.](#); [PENNY, D. J.](#); [BRIZARD, C. P.](#); [COCHRANE, A. D.](#); [SOTO, R.](#); [SHEKERDEMIAN, L. S.](#) Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. **Intensive Care Medicine**, v. 29, p. 1996-2003, 2003.

SULLIVAN, M. H. F.; COOKE, B.A. The role of Ca²⁺ in steroidogenesis in Leydig cells. **Biochemistry Journal**, v. 236, p. 45-51, 1986.

SUSSMAN, D. O. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of phosphodiesterase type 5 inhibitors. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, p. S11–S15, 2004.

TANG, X. M.; CLERMONT, Y.; HERMO, L. Origin and fate of autophagosomes in Leydig cells of normal adult rats. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 284-93, 1988.

TINAJERO, J.C.; FABBRI, A.; DUFAU, L. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion from Leydig cells by serotonin. **Endocrinology**, v. 130, p. 1780-1788, 1992.

TSAI, B. M.; TURRENTINE, M. W.; SHERIDAN, B. C.; WANG, M.; FIORE, A. C.; BROWN, J. W.; MELDRUM, D. R. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.81,p.272–278, 2006.

UKERT, S.; [HEDLUND, P.](#); [ANDERSSON, K. E.](#); [TRUSS, M. C.](#); [JONAS, U.](#); [STIEF, C. G.](#) Update on phosphodiesterase (PDE) isoenzymes as pharmacologic targets in urology: present and future. **European Journal of Urology**, v. 50, p. 1153-1156, 2006.

WALLIS, R. M.; CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; ELLIS, P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. **The American Journal of Cardiology**, v. 83, p.3C–12C, 1999.

WALKER, W.H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cell. **Reproduction**, v. 130 p.15-28, 2005.

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

WENG, Q. Immunolocalization of steroidogenic enzymes P450_{scc}, 3βHSD, P450_{c17}, and P450_{arom} in Gottingen Miniature Pig Testes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 299-304, 2005.

WILKENS, H.; GUTH, A.; KONIG, J.; FORESTIER, N.; CREMERS, B.; HENNEN, B. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 1218-1222, 2001.

[YANG, J.](#); [ZHANG, Y.](#); [WANG, Y.](#); [CUI, S.](#) Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. **Toxicology In Vitro**, v. 21, p. 558-565, 2007.

LAN ZHAO, P. H. D; NICOLA, A.; MASON, P. H. D.; JULIAN, W.; STRANGE, M. R. C. P.; HAMISH WALKER, M. R. C. P.; MARTIN, R.; WILKINS, M. D. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. **Circulation**, v. 107, p. 234-7, 2003.

[ZHAO, L.](#); [MASON, N. A.](#); [MORRELL, N. W.](#); [KOJONAZAROV, B.](#); [SADYKOV, A.](#); [MARIPOV, A.](#); [MIRRAKHIMOV, M. M.](#); [ALDASHEV, A.](#); [WILKINS, M. R.](#) Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 104, p. 424-8, 2001.