Fernando Silva Carneiro

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α)
NA FISIOPATOLOGIA DA DISFUNÇÃO ERÉTIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2011**

Fernando Silva Carneiro

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α)
NA FISIOPATOLOGIA DA DISFUNÇÃO ERÉTIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

Co-orientadora: Dra. Zuleica Bruno Fortes

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Carneiro, Fernando Silva.

Papel do fator de necrose tumoral alfa na fisiopatologia da
disfunção erétil / Fernando Silva Carneiro. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia. Linha de pesquisa: Papel de citocinas na função erétil.

Versão do título para o inglês: Role of tumor necrosis factor alpha in
the pathophysiology of erectile dysfunction.

Descritores: 1. Fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) 2.
Disfunção erétil 3. Corpo cavernoso 4. Sintase de óxido nítrico
endotelial (eNOS) 5. Sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) 6.
Pênis

I. Passaglia, Rita de Cássia Aleixo Tostes II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB012/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernando Silva Carneiro.

Título da Tese: Papel do fator de necrose tumoral alfa na fisiopatologia da disfunção erétil.

Orientador(a): Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.033/2006.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 007/04/CEEA, aprovo a inclusão do projeto:
"Contribuição da sinalização RHOA/RHO - cinase no músculo liso vascular de camundongos hipertensos" sob a responsabilidade de FERNANDO SILVA CARNEIRO ao protocolo intitulado: **"Reatividade microcirculatória em patologias experimentais - Papel do endotélio"** para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 25 de setembro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA- ICB/USP

Aos meus pais pelo amor, compreensão,
incentivo e o apoio incondicional.

À minha esposa maravilhosa por tornar esse
sonho possível e por fazer com que tudo valha a
pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me presenteado com o dom da vida.

Gostaria de agradecer a diversas pessoas pela inestimável ajuda, apoio, contribuição e engajamento, sem os quais tornaria a realização desse trabalho imensamente árduo. Estas são:

À minha esposa por apoiar, participar e estar 24 horas por dia ao meu lado e ter uma participação direta na concretização dos meus sonhos. Pela paciência durante as incontáveis horas que estive juntamente comigo no laboratório durante a madrugada. Pelo amor que ameniza a dor e torna com que tudo seja possível.

À minha família pelo amor e por sempre estar tão presente no meu coração e pensamento mesmo quando a distância era um abismo.

Agradeço a minha orientadora Rita Tostes por nunca escolher o caminho mais fácil ou conveniente, mas por sempre escolher o caminho certo. Por ter acreditado em mim quando eu próprio não podia. Pelo carinho e amizade dispensados a mim e à minha esposa. Por cumprir de maneira graciosa, exemplar e cabal o significado da palavra “Mentor” na sua definição mais completa. Pela sua brilhante capacidade científica. Por sua incansável dedicação no desenvolvimento da carreira de cada um de seus alunos. Pelo olhar extremamente amável, humano e generoso que ela dispensa a todos. Pelo exemplo e inspiração. Enfim, pela honra de tê-la como parte de nossas vidas.

Agradeço ao meu também mentor Clinton Webb por generosamente abrir as portas do seu laboratório e compartilhar seus recursos no desenvolvimento desse trabalho. Por ter abraçado a mim e à minha esposa como um dos seus estudantes e por não medir esforços em nos ajudar e apoiar. Por não olhar simplesmente naquilo em que se investiga, mas se preocupar de forma extremamente generosa com quem está investigando. Por ter me ensinado juntamente com a Rita a verdadeira dimensão do que é ser mentor.

Aos meus amigos Fernanda Giachini e Victor Lima por estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos. Pela honra de tê-los como meus amigos, mas muito mais pela dádiva de poder chamá-los de irmãos.

Aos meus queridos amigos Fernando Filgueira e Núbia Lobato por estarem perto quando eu mais precisei. Pelo encorajamento, aconselhamentos, e por dividirem suas idéias e recursos.

À todos os alunos, pós-docs e técnicos do laboratório do professor Clinton, estes são: Brandi Wynne, Hicham Labazi, Hyehun Choi, Katie Spitler, Kyan Allahdadi, Chris Rigsby, Stella Gouloupoulou, Theodora Szasz, Takayuiki Matsumoto, Johanna Hannan, Kênia Nunes,

Fernanda Giachini, Victor Lima, Zidonia Carneiro, Maria Alícia Carrilo-Sepulveda, José Eduardo, Saiprasad Zemse, Crystal Prior, Rômulo Leite, Fernanda Priviero e Chin-Wei Chiao.

Aos amigos do departamento de fisiologia do Medical College of Georgia, este são: Ana Quênia, Domitila Huber, Marcelo Moreno, Priscila, Vinícia Biancardi e Wagner Reis.

Ao corpo administrativo do departamento de fisiologia do Medical College of Georgia, estes são: Cathy Davidson, Bobbie Willcox, Valerie Smith, Nicholas Shaurette e Brenda Williams.

Aos docentes Maria Helena Carvalho, Zuleica Bruno Fortes e José Cippola Neto por me ensinarem que além de cérebros brilhantes havia corações generosos. Por toda a ajuda em um dos momentos mais difíceis e críticos da minha vida.

Aos colegas de laboratório do grupo de Hipertensão Arterial da Universidade de São Paulo pelo apoio e incentivo, estes são: Fernando Filgueira, Núbia Lobato, Eveline Isquierdo, Graziela Hagihara, Eliana Akamine, Maria Aparecida, Antônio Garcia, Gisele Facholi, Cynthia Echem, Simone Sartoretto, Priscila Xavier, Luciana Giaquinto, Sônia Leite, Marta Rodrigues, Manoel Rocha, Ana Rita, Rosângela Eichler, Beatriz Ponzio, Vanessa Oliveira, Selma Rigonati, Julieta Santos, Maria Alice, Graziela Ceravolo, Rossana Marangoni e Tiago Costa.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Enfim a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e que porventura tenham sido omitidas, meus sinceros agradecimentos.

“No pensamento linear, quando algo funciona, conseguir mais disso sempre é melhor. (...) entretanto, os sistemas vivos bem-sucedidos são altamente não-lineares. Eles não maximizam as suas variáveis: eles as otimizam. Quando algo é bom uma quantidade maior desse algo não será necessariamente melhor, uma vez que as coisas andam em círculos, não em linhas retas. A questão não é ser eficiente, mas ser sustentável. O que conta é a qualidade, não a quantidade. (...) Entender as relações não é fácil, especialmente para quem foi educado de acordo com os princípios da ciência ocidental, que sempre sustentou que só as coisas mensuráveis e quantificáveis podem ser expressas em modelos científicos. (...) Nem todas as relações e contextos, entretanto, podem ser colocados numa escala ou medidos com uma régua.”

Fritjof Capra

RESUMO

Carneiro FS. Papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na fisiopatologia da disfunção erétil [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O equilíbrio entre fatores contráteis e dilatadores no tecido erétil determina o tônus do músculo liso nos espaços sinusoidais do corpo cavernoso, assim como nas artérias helicoidais e arteríolas de resistência peniana, o que por sua vez, determina o influxo de sangue no pênis e o consequente aumento da pressão intra-peniana necessária para o processo de ereção. Recentemente, a disfunção erétil (DE) tem sido associada com a presença de doenças cardiovasculares (CVD), as quais se caracterizam por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α). O endotélio vascular é o alvo principal das ações do TNF- α , o qual causa comprometimento do relaxamento vascular dependente do endotélio por diminuir a liberação de óxido nítrico (NO). Considerando o exposto acima, o presente estudo testa a hipótese de que o TNF- α provoca alterações na reatividade do corpo cavernoso que favorecem a disfunção erétil: aumento das respostas contráteis e diminuição do relaxamento. Para testar a presente hipótese duas estratégias experimentais foram utilizadas: 1) Infusão sistêmica de TNF- α em camundongos (visando elevar os níveis desta citocina) e 2) camundongos nocautes do gene TNF- α . Estudos avaliando a reatividade do tecido cavernoso a diferentes agonistas contráteis e relaxantes foram conduzidos. A contração do tecido cavernoso induzida pelas terminações nervosas simpáticas foi avaliada pelo estímulo elétrico por campo (EFS). O relaxamento não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) do tecido cavernoso foi determinado. A expressão das enzimas responsáveis pelo processo erétil, as sintases de óxido nítrico endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), foi avaliada por meio da técnica de western blot assim como pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O primeiro conjunto de observações demonstra que o corpo cavernoso isolado de camundongos infundidos com TNF- α apresenta comprometimento no relaxamento mediado por nervos NANC assim como aumento das contrações mediadas por nervos simpáticos. Além disso, a expressão gênica de enzimas-chave envolvidas na resposta erétil, tais como a eNOS e a nNOS, está diminuída no tecido cavernoso de animais infundidos com TNF- α . O segundo conjunto de observações demonstra que o corpo cavernoso isolado de animais nocautes do gene TNF- α apresenta não somente aumento no relaxamento dependente do endotélio e no relaxamento mediado por nervos NANC, mas também aumento na expressão das enzimas que medeiam o processo erétil: a

eNOS e nNOS. Somado a isto, as contrações mediadas por nervos simpáticos estão diminuídas no tecido cavernoso destes animais. Considerando estes dados em conjunto, o presente trabalho fornece um grupo de evidências demonstrando que o TNF- α não somente exerce um papel em detrimento da função erétil, mas também fundamenta a ligação humoral entre doenças cardiovasculares e DE. Tratamentos que visam à redução desta citocina podem fornecer uma estratégia terapêutica alternativa ao tratamento da DE, especialmente em condições em que os níveis de TNF- α encontram-se elevados.

Palavras-chave: Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Disfunção erétil. Corpo cavernoso. Sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS). Sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS). Pênis.

ABSTRACT

Carneiro FS. Role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the pathophysiology of erectile dysfunction [Ph. D. Thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The balance between contracting and relaxing factors controls smooth muscle tone of both the penile vasculature and corpora cavernosa and, thereby, determines the flaccid or erectile state of the penis. Erectile dysfunction (ED) has been linked to cardiovascular diseases (CVD), which are associated with endothelial dysfunction and increased levels of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). The vascular endothelium is a major target for the actions of TNF- α in these diseases, in which TNF- α plasma levels are significantly elevated. Based on the above-mentioned observations and considering recent evidence that TNF- α levels are increased in serum of patients with moderate-to-severe ED, we hypothesized that TNF- α impairs corpus cavernosum (CC) reactivity, thus favoring ED. To test our hypothesis two methodological approaches were used: 1) mice were systemically infused with TNF- α (aiming to increase the levels of this cytokine) and 2) TNF- α knockout (TNF KO) mice were also used. Cavernosal reactivity was assessed to different contractile and relaxant agonists. Sympathetic-induced contractions were evaluated by electric field stimulation (EFS). Neurogenic-induced relaxation was investigated in the cavernosum tissue. The expression of eNOS and nNOS in the cavernosal tissue was determined by western blot and polymerase real chain reaction (PCR). The CC of TNF- α -infused animals displayed: 1) decreased non-adrenergic non-cholinergic (NANC)-mediated relaxation; 2) increased sympathetic nerve-mediated contraction; 3) decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene expression. On the other hand, The CC of TNF KO animals displayed increased endothelium-dependent and NANC-mediated relaxation as well as increased eNOS and nNOS expression. Contractile responses mediated by sympathetic nerves were decreased in the CC of TNF- α knockout animals. In summary, the present study shows that TNF- α plays a detrimental role in erectile function. Strategies that aim to reduce the levels of this cytokine may represent an alternative approach for ED treatment.

Key words: Tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Erectile dysfunction. Corpus cavernosum. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Penis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo do ciclo da resposta sexual de Kaplan.....	26
Figura 2. Estrutura anatômica do pênis.....	27
Figura 3. Estrutura anatômica do corpo cavernoso	28
Figura 4. Irrigação sanguínea arterial do pênis.....	29
Figura 5. Retorno sanguíneo venoso do pênis.....	30
Figura 6. Mecanismo de venoclusão ocasionado pela compressão das veias emissárias sob a túnica albugínea durante a ereção	31
Figura 7. Relaxamento das células de músculo liso do corpo cavernoso durante a ereção.	33
Figura 8. Mecanismo de contração da célula de músculo liso do corpo cavernoso que mantém o pênis no estado flácido	35
Figura 9. A Ilustração demonstra os eventos sequenciais na ativação dos receptores TNFR1 e TNFR2 pelo TNF-α	40
Figura 10. Níveis plasmáticos de TNF-α	52
Figura 11. Pressão arterial média direta.....	52
Figura 12. Reatividade do tecido cavernoso exposto à estimulação de terminações nervosas simpáticas.....	54
Figura 13. Resposta contrátil do tecido cavernoso aos agonistas fenilefrina e endotelina 1	55
Figura 14. Resposta do tecido cavernoso ao relaxamento NANC e dependente do endotélio	56
Figura 15. Expressão do RNA mensageiro para receptores TNFR1, preproET-1, e receptores ET_A	58
Figura 16. Expressão do RNA mensageiro para nNOS e eNOS.....	59
Figura 17. Medida da pressão arterial média pela técnica de radiotelemetria.....	61
Figura 18. Reatividade do tecido cavernoso submetido a estimulação de terminações nervosas simpáticas.....	63
Figura 19. Reatividade do tecido cavernoso à estimulação de receptores α_1-adrenérgicos.	64
Figura 20. Reatividade do tecido cavernoso ao cálcio.....	64
Figura 21. Resposta do tecido cavernoso ao relaxamento dependente do endotélio e NANC	65
Figura 22. Curvas concentração-efeito para nitroprussiato de sódio e isoproterenol no tecido cavernoso de camundongos controle e nocaute do gene TNF-α	66
Figura 23. Curvas concentração-efeito para tadalafil e Y-27632 no tecido cavernoso de camundongos controle e nocaute do gene TNF-α	66
Figura 24. Bandas representativas de imunoblot para eNOS e nNOS.....	68

Figura 25. Corte transversal do corpo cavernoso de animais controle e nocaute do gene TNF-α, mostrando as principais estruturas	69
Figura 26. Corte transversal do corpo cavernoso de animais controle e nocaute do gene TNF-α mostrando o conteúdo de elastina	70
Figura 27. Quantidade de células de músculo liso e propriedades mecânicas do tecido cavernoso de animais controle e nocaute de TNF-α.....	71
Figura 28. Ereções espontâneas.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre massa de órgãos e massa corporal.	61
Tabela 2 - Valores de pD_2 e resposta máxima dos agonistas em corpo cavernoso de animais controle e TNF- α KO.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AngII – Angiotensina II

ANOVA – Análise de variância

°C – Unidade de temperatura Celsius

Ca²⁺ - Cálcio

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio diidratado

CaM – Calmodulina

cDNA – DNA complementar

CEEA – Comissão de Ética em Experimentação Animal

cm – Centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CT – Número fracional de ciclos no qual o sinal detector da reação de PCR ultrapassa um limiar fixo.

ΔCT – Subtração do valor médio de CT do transcrito sob investigação do valor médio de CT do gene 18S rRNA.

D-glicose - Glicose

DE – Disfunção erétil

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DOCA - Acetato de desoxicorticosterona

EC₅₀ – Concentração de um fármaco para atingir 50% da resposta máxima

ECE-1 – Enzima conversora de endotelina-1

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EFS – Estímulo elétrico por campo

E_{max} – Efeito máximo produzido pelo agonista

e-NOS – Enzima sintase de óxido nítrico endotelial

EPM – Erro padrão da média

ET-1 – Endotelina-1

ET_A – Receptor da endotelina-1 do subtipo A

ET_B – Receptor da endotelina-1 do subtipo B

EUA - Estados Unidos da América

FADD – Proteína do domínio de morte associada a Fas
g – Unidade de medida Grama
sGC – Guanilato ciclase solúvel
cGKI - Proteína cinase I dependente de cGMP
cGMP- 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
GTP – Trifosfato de guanosina
HUVEC – Células endoteliais da veia umbilical humana
Hz - Hertz
ICAM-1 – Molécula de aderência intercelular 1
IgG – Imunoglobulina G
IκB – Proteína inibitória kappa B
IKK – Cinase I kappa B
IL-1β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IL-18 – Interleucina 18
iNOS – Enzima sintase de óxido nítrico induzível
KCl – Cloreto de potássio
Kg – Unidade de medida Kilograma
KH₂PO₄ – Fosfato monobásico de potássio
L – Unidade de medida Litro
L-NAME – Nω-nitro-L-arginina metil éster
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos
MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos 1
mg – Unidade de medida Miligrama
MgSO₄.7.H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado
min – Unidade de medida Minuto
mL – Unidade de medida Mililitro
mm – Unidade de medida Milímetro
mM – Unidade de concentração Milimolar
M - Unidade de concentração Molar
mmHg – Milímetro de mercúrio
MLC₂₀ - Cadeia leve da miosina II

MLCK - Miosina cinase de cadeia leve

MLCP – Fosfatase da cadeia leve da miosina

mN - Unidade de medida MiliNewton

ms - Unidade de medida Milisegundo

MYPT-1 – Subunidade regulatória da miosina fosfatase

n – Número de animais utilizados no experimento

NA - Noradrenalina

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NANC – Não-adrenérgico não-colinérgico

NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B

ng - Unidade de medida Nanograma

nNOS – Enzima sintase de óxido nítrico neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Enzima sintase de óxido nítrico

O₂ – Gás oxigênio

PBS – Tampão fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pD₂ – Logaritmo negativo da EC₅₀

pH – Potencial hidrogeniônico

pg - Unidade de medida Picograma

PP1 delta – Subunidade catalítica da miosina fosfatase

q.s.p. – Quantidade suficiente para

Rho – Família de genes homólogos da Ras

RhoA – Membro A da pequena proteína G da família Rho

RhoGEFs - Fatores de intercâmbio dos nucleotídeos de guanina específicos da Rho

RIP1 – Proteína de interação com o receptor 1

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

ROCK – Rho-cinase

SDS-PAGE – Gel de eletroforese de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio

TBS – Tampão de salina Tris

TBS-T – Tampão de salina Tris com Tween 20

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

TNF- β - Fator de necrose tumoral beta ou linfotoxina alfa

TNF KO – Animais nocautes de TNF- α

TNFR – Receptor de TNF- α

TNFR1 - Receptor de TNF- α do subtipo 1

TNFR2 - Receptor de TNF- α do subtipo 2

TRADD – Proteína de domínio de morte associada ao TNFR1

TRAF2 – Fator 2 associado ao receptor de TNF

μ L - Unidade de medida Microlitro

μ m – Unidade de medida Micrômetro

μ M - Unidade de concentração Micromolar

V - Unidade de medida Volts

VCAM-1 – Molécula de aderência a célula vascular 1

vWF – Fator von Willebrand

Y-27632 – Inibidor da Rho-cinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Evolução do conceito da resposta sexual humana.....	24
1.1.1	Excitação	24
1.1.2	Platô	25
1.1.3	Orgasmo	25
1.1.4	Resolução	26
1.2	Fisiologia da ereção	27
1.2.1	Estrutura do pênis	27
1.2.2	Estrutura do corpo cavernoso	27
1.2.3	Irrigação sanguínea do pênis	28
1.2.4	Retorno sanguíneo venoso do pênis	29
1.2.5	A hemodinâmica da ereção	30
1.2.5.1	<i>Fase flácida.....</i>	<i>30</i>
1.2.5.2	<i>Fase de enchimento</i>	<i>31</i>
1.2.5.3	<i>Fase de tumescência.....</i>	<i>31</i>
1.2.5.4	<i>Fase da ereção completa</i>	<i>31</i>
1.2.5.5	<i>Fase da ereção rígida.....</i>	<i>31</i>
1.2.5.6	<i>Fase inicial da detumescência</i>	<i>32</i>
1.2.5.7	<i>Fase lenta da detumescência</i>	<i>32</i>
1.2.5.8	<i>Fase rápida da detumescência.....</i>	<i>32</i>
1.2.6	Mediadores envolvidos no controle periférico da ereção: mecanismos moleculares	32
1.3	Classificação da disfunção erétil entre as disfunções sexuais	35
1.4	Epidemiologia da disfunção erétil no Brasil e no mundo	36
1.5	Associação da disfunção erétil com doenças cardiovasculares: papel dos mediadores inflamatórios	36
1.6	TNF-α: receptores e via de sinalização	38
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral.....	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	Animais.....	44
3.2	Infusão de TNF- α recombinante humano	44
3.3	Medida da pressão arterial por radiotelemetria	44
3.4	Medida da pressão arterial pelo método direto	45
3.5	Medida do TNF- α plasmático por ELISA.....	45
3.6	Estudos de reatividade do corpo cavernoso <i>in vitro</i>	45
3.7	Medidas de ereções espontâneas.....	47
3.8	Análise histológica e imunohistoquímica do corpo cavernoso.....	47
3.9	Western blot	48
3.10	Extração de RNA, síntese de cDNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	49
3.11	Análise estatística	50
4	RESULTADOS (PARTE 1).....	51
4.1	Estudos de reatividade do corpo cavernoso	53
4.2	Efeito da infusão de TNF- α sobre a expressão de receptores TNFR1, ET-1, receptores ET _A , eNOS e nNOS no corpo cavernoso.	57

5	RESULTADOS (PARTE 2).....	60
5.1	Estudos de reatividade do corpo cavernoso	62
5.2	Expressão da eNOS, nNOS, colágeno e elastina no corpo cavernoso.....	67
5.3	Ereções espontâneas.....	72
6	DISCUSSÃO	73
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO A - Artigo publicado: TNF-alpha knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation	101
	ANEXO B - Artigo publicado: Emerging role for TNF-A in erectile dysfunction.....	113
	ANEXO C - Artigo publicado: TNF-alfa infusion impairs corpora cavernosa reactivity.....	123
	ANEXO D - Curriculum vitae	136

1 INTRODUÇÃO

De um ponto de vista evolutivo, a sexualidade humana foi conduzida pelo imperativo de se reproduzir. Durante o século XX, contudo, os conceitos de reprodução e sexualidade começaram a se mover de forma independente, e hoje de diversas maneiras, eles podem ser considerados separados, se não independentes. Essa mudança entre diferentes épocas foi possível devido ao enorme progresso no entendimento do processo reprodutivo, seguida pela recém-descoberta de como modificá-lo. Para entender as mudanças nas relações entre reprodução e sexualidade é necessário ir além da biologia, uma vez que fatos antropológicos, reflexões filosóficas, normas éticas e dogmas religiosos devem ser levados em consideração.¹

Numa outra análise, a possibilidade prática de separar sexo da reprodução, por meio da contracepção, facilitou a condição que sempre existiu entre os seres humanos: sexo puramente por prazer, seja matrimonial ou adúltero. Por outro lado, inúmeros avanços tecnológicos permitiram que a reprodução fosse possível sem a necessidade de sexo.¹

Sexo importa – não somente aos indivíduos, mas para ser exato também a grupos sociais. Consequentemente, todas as sociedades definem e aplicam as “normas” de como “fazê-lo”, com quem, quando, onde, com que frequência e o porquê. Neste sentido, a sociedade estabelece as regras do “aceitável” versus o “inaceitável”, do “normal” versus o “anormal”, do “saudável” versus o “patológico”, e até mesmo, daquilo que constitui o sexo em si.²

O interesse em comportamento sexual aumentou dramaticamente nos últimos 30 anos. Primeiro, a emergência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) impactaram a sociedade, sobretudo no que diz respeito ao comportamento sexual e às implicações que o sexo representa sobre saúde. Segundo, o conhecimento e a compreensão dos mediadores fisiológicos da função sexual fundamentaram o desenvolvimento de terapias efetivas no tratamento das disfunções sexuais.³ Neste sentido, as disfunções sexuais que eram antes veladas e intocáveis agora são passíveis de tratamento. Especificamente, com relação à disfunção erétil (DE), pacientes que outrora foram chamados pejorativamente de “impotentes” (incapazes, fracos), recobram a autoestima, melhoraram a qualidade de vida e as relações intra e interpessoais. Por último, a estreita associação de disfunções sexuais com doenças cardiovasculares vem recebendo considerável atenção, uma vez que estas podem ser indicadores e preditivos de eventos cardiovasculares.

1.1 Evolução do conceito da resposta sexual humana

Como foi dito anteriormente, as definições de função e disfunção sexual são influenciadas inevitavelmente pelos costumes sociais vigentes, valores e pelo conhecimento científico. William Masters e Virginia Johnson contribuíram significativamente para o atual entendimento do funcionamento sexual. Durante as décadas de 1950 e 1960, eles conduziram uma série extensa de observações científicas da atividade sexual com voluntários humanos. Essas observações culminaram na publicação do livro *Human Sexual Response* em 1966.⁴ Baseados em milhares de horas de trabalho científico laboratorial, Masters e Johnson sugeriram que a resposta sexual no indivíduo adulto e saudável se dava basicamente em 4 estágios principais, os quais seriam: a excitação, o platô, o orgasmo e a resolução.

1.1.1 Excitação

A etapa da excitação seria caracterizada pelo começo dos sentimentos eróticos, e a obtenção da ereção em homens e a lubrificação vaginal nas mulheres. As manifestações da tensão sexual também incluiriam uma reação corporal generalizada de vasocongestão e miotonia. Em adição, tão logo o corpo se prepare para o estresse que o coito representa, a respiração torna-se profunda e ofegante com aumento concomitante na frequência cardíaca e na pressão arterial. Nos homens a etapa de excitação seria caracterizada pela ereção peniana. Além disso, o escroto torna-se mais espesso, a bolsa escrotal achata-se e torna-se espessa e os testículos começam a se elevar devido ao encurtamento das cordas espermáticas.⁴

Assim como nos homens, a fase da excitação da resposta sexual feminina seria caracterizada tanto pela vasocongestão genital local quanto pela vasocongestão da pele e miotonia. A resposta da pele na mulher (pápulas) é frequentemente mais pronunciada e, em adição, os seios incham e as aréolas tornam-se eretas.⁴ Com relação às respostas genitais locais, uma característica distinta da resposta sexual feminina durante a fase da excitação é a lubrificação vaginal. A excitação sexual na mulher causa o ingurgitamento vascular nos tecidos profundos da vagina, que por sua vez, provoca a formação do transudato que constitui a lubrificação da parede vaginal que ocorre cerca de 10 a 30 segundos após o início do estímulo sexual. Ocorre também, em menor escala, a vasocongestão do clitóris, que torna-se ereto em algumas mulheres. Durante a excitação o útero se alarga devido ao ingurgitamento vascular e eleva da sua posição basal do assoalho pélvico. Concomitantemente, a vagina alarga-se e assume a forma de balão para acomodar o pênis.⁴

1.1.2 Platô

O estágio de platô, segundo Masters e Johnson,⁴ representa essencialmente um estado mais avançado da excitação que ocorre imediatamente antes do orgasmo. Segundo este conceito, a etapa do platô representa o pico da resposta dos órgãos sexuais e da resposta vasocongestiva local em ambos os gêneros. No homem o pênis encontra-se preenchido e distendido com sangue no limite de sua capacidade. A ereção é firme e o pênis encontra-se estendido em seu tamanho máximo. Os testículos tornam-se ingurgitados com sangue e aumentam em torno de 50% do seu tamanho em relação ao estado basal. Em adição, a contração reflexa dos músculos do cremaster e das cordas espermáticas elevam os testículos que ficam em aposição em relação ao períneo.⁴

As mudanças fisiológicas que acontecem durante a fase de platô no ciclo da resposta sexual feminina podem ser atribuídas em larga escala devido a vasocongestão. Estas respostas foram descritas por Masters e Johnson como aumento do volume e mudanças da coloração dos pequenos lábios, o que foi chamado de “pele do sexo”, variando de vermelho brilhante para a cor de vinho e na formação de um tecido congestionado. Este fenômeno foi nomeado por Masters e Johnson como “plataforma orgásmica”, que se situa ao redor e na porção mais baixa da entrada da vagina. Além disso, durante esta fase o útero completa sua ascendência do assoalho pélvico. Finalmente, anterior ao orgasmo, o clitóris assume um ângulo de 180° e retrai numa posição achatada atrás da sínfise púbica.

1.1.3 Orgasmo

Durante o orgasmo, o qual é considerado a sensação sexual mais intensamente prazerosa, o sêmen é expelido do pênis ereto de 3 a 7 emissões ejaculatórias no intervalo de 0.8 segundos. Masters e Johnson descreveram os componentes do orgasmo masculino: o primeiro consiste de contrações dos órgãos internos que sinalizam a sensação de “inevitabilidade ejaculatória”. As contrações rítmicas da uretra peniana e dos músculos da base do pênis e do períneo constituem o segundo componente e são sentidos como o orgasmo propriamente dito. Após o orgasmo o homem se torna refratário à estimulação sexual. Mais especificamente, um certo período de tempo, o “período refratário”, deve acontecer antes que ele possa ejacular novamente.⁴

Independente da maneira de estimulação, o orgasmo feminino sempre consiste de contrações rítmicas reflexas dos músculos circunvaginais, do períneo e dos tecido ingurgitados que constituem a “plataforma orgásmica”. As características do orgasmo são

idênticas em todas as mulheres e evidências clínicas sugerem que o orgasmo feminino pode ser sempre produzido por meio da estimulação do clitóris;⁴

1.1.4 Resolução

Durante a resolução, a etapa final do modelo do ciclo da resposta sexual de Masters e Johnson, respostas fisiológicas locais específicas de cada sexo tomariam lugar para retornar o organismo inteiro ao seu estado basal. As respostas somáticas gerais ao estímulo sexual diminuem rapidamente. A frequência cardíaca, pressão arterial, respiração e a circulação sanguínea da pele, as quais tinham sido elevadas em razão da demanda pelo esforço durante o coito, retornam ao estado basal em minutos após o orgasmo.⁴

Desta forma, Masters e Johnson introduziram um modelo elegante e instrutivo que demonstrava as mudanças fisiológicas genitais e extragenitais que tipicamente ocorrem durante cada uma dessas fases. O modelo de Masters e Johnson foi pioneiro na criação desses conceitos da resposta sexual humana. Contudo, anos mais tarde Kaplan⁵ observou que diversos pacientes embora fossem fisiologicamente aptos para o ato sexual não sentiam vontade de praticá-lo. Dessa forma, Kaplan redefiniu e ampliou o antigo modelo adicionando o componente do desejo como um fator que deveria preceder os anteriores (Figura 1) e retirou a fase de platô, uma vez que, em sua concepção, a excitação levaria ao orgasmo, que consiste no pico máximo da excitação.⁵ Subsequentes pesquisas teóricas e empíricas têm ampliado o atual entendimento da função e das disfunções sexuais. Entretanto, muitos estudiosos dessa área concordam que a resposta sexual em um indivíduo saudável compreende pelo menos 3 etapas primárias: desejo, excitação e orgasmo. Baseado nessa definição, as disfunções sexuais, portanto, surgiriam como resultado de distúrbios em alguma dessas etapas. Contudo, antes de entender a natureza da DE é necessário a introdução aos mecanismos básicos responsáveis pela ereção.

Figura 1. Modelo do ciclo da resposta sexual de Kaplan. Segundo Kaplan o desejo iniciaria o processo sexual que levaria à excitação, e subsequentemente ao orgasmo e resolução.

1.2 Fisiologia da ereção

1.2.1 Estrutura do pênis

Do ponto de vista da anatomia descritiva, o pênis pode ser dividido em 3 partes: a base, o corpo e a glânde (Figura 2). A base encontra-se ligada ao osso da pelve e consiste de duas crura e um bulbo. As crura são estruturas cilíndricas pareadas que estão inseridas ao ramo púbico do ísquio, as quais se fundem para formar o corpo cavernoso. Elas são posteriormente cobertas pelo músculo isquiocavernoso. O bulbo, que contém a uretra, atravessa o diafragma urogenital entre as crura. Posteriormente, esta formação estreita e, então, passa a constituir o corpo esponjoso, que se projeta continuamente com o corpo cavernoso na parte inferior e ventral, sendo recoberto pelo músculo bulbocavernoso (Figura 2). Desta forma, o corpo do pênis é formado por 3 estruturas tubulares: os corpos cavernosos pareados e o corpo esponjoso situado na porção inferior dos corpos cavernosos (Figura 2). Distalmente, o corpo esponjoso se expande para formar a glânde, dentro da qual os corpos cavernosos terminam (Figura 2).⁶

Figura 2. Estrutura anatômica do pênis. As estruturas principais são representadas pela base, o corpo e a glânde.

Fonte: Eardley et al.⁶

1.2.2 Estrutura do corpo cavernoso

A túnica albugínea, camada externa do corpo cavernoso, embora seja dura e fibrosa, tem a capacidade de se expandir durante a tumescência e a ereção. A túnica albugínea é composta primariamente de colágeno e elastina, e tradicionalmente é dividida em duas: uma camada longitudinal externa ao redor de ambos os corpos cavernosos, e uma camada circular interna que recobre individualmente cada corpo cavernoso (Figura 3). Entre os dois corpos

cavernosos estas camadas se fundem para formar o septo mediano. Dentro da túnica albugínea encontra-se um tecido com característica esponjosa, que é essencialmente uma estrutura vascular também chamada de sinusóides ou trabéculas do corpo cavernoso. A interconexão dos espaços trabeculares é feita por células de músculo liso que, por sua vez, é sustentado pelo estroma composto de colágeno, elastina, vasos sanguíneos e nervos. Os espaços trabeculares são delineados internamente por células endoteliais e são irrigados pelas artérias helicoidais que são formadas por ramificações da artéria peniana profunda (Figura 3).

Figura 3. Estrutura anatômica do corpo cavernoso.

Fonte: Eardley et al.⁶

1.2.3 Irrigação sanguínea do pênis

O suprimento de sangue arterial para o pênis é derivado do sistema ilíaco interno. Após ramificar-se para o períneo, a artéria pudendal interna continua como a artéria dorsal peniana. Em seguida, esta atravessa o diafragma urogenital antes de se dividir em seus ramos terminais: a artéria dorsal peniana, a artéria do cavernoso e a artéria bulbar (Figura 4).⁷ A artéria bulbar irriga o bulbo do pênis e o corpo esponjoso antes de passar para a glândula. A artéria cavernosa, também chamada de artéria profunda peniana, fornece a maioria do suporte sanguíneo para o corpo cavernoso (Figura 4). Os ramos terminais desta artéria são de dois tipos: as artérias helicoidais que diretamente irrigam os espaços sinusoidais, e o conjunto pequeno de arteríolas que se localizam dentro das trabéculas. As artérias helicoidais são os principais vasos de resistência do pênis e controlam o fluxo sanguíneo para dentro dos sinusóides. Deste modo, quando o pênis está flácido (não-ereto) o principal fluxo arterial é por meio das artérias trabeculares, enquanto as artérias helicoidais encontram-se ocluídas.

Durante a ereção o sangue é redirecionado para as artérias helicoidais, as quais se alongam e dilatam e, portanto, preenchem os espaços sinusóides (Figura 4).

A artéria dorsal peniana projeta-se distalmente para a glândula do pênis onde ela se anastomosa com os ramos terminais da artéria bulbar. Em seu trajeto, esta se ramifica várias vezes e forma as artérias circunflexas ao redor do pênis. Frequentemente, existem comunicações entre a artéria dorsal e a artéria cavernosa, e ocasionalmente uma proporção significativa de sangue do tecido cavernoso pode ser derivado das artérias penianas superficiais.

Figura 4. Irrigação sanguínea arterial do pênis.

Fonte: Eardley et al.⁶

1.2.4 Retorno sanguíneo venoso do pênis

O sangue venoso retorna dos espaços sinusóides por um plexo subtúnico, o qual se localiza imediatamente abaixo da túnica albugínea e é mais proeminente nos dois terços distais do pênis. Este plexo retorna o sangue por meio das veias emissárias que atravessam a túnica albugínea. Distalmente, as veias emissárias coalescem para formar as veias esponjosas, e estas, por sua vez, dão origem às veias circunflexas que finalmente formam a veia dorsal profunda do pênis (Figura 5).

Figura 5. Retorno sanguíneo venoso do pênis.

Fonte: Eardley et al.⁶

1.2.5 A hemodinâmica da ereção

A ereção é essencialmente um fenômeno vascular que depende do equilíbrio entre influxo arterial e efluxo venoso. Quando o influxo arterial é baixo e o efluxo venoso o compensa, o pênis permanece no estado flácido. Por outro lado, quando o influxo arterial aumenta e o efluxo venoso cai, a tumescência ocorre.

No estado flácido, o sistema nervoso simpático mantém as arteríolas e o músculo liso do tecido cavernoso contraídos. Portanto, o fluxo sanguíneo no pênis é baixo. Contudo, durante a ereção, a ativação dos sistemas nervosos parassimpático e não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) provoca a dilatação das arteríolas e o relaxamento do músculo liso do tecido cavernoso. A sequência de eventos hemodinâmicos foi elegantemente elucidada por Lue e colaboradores⁸ (1983) em oito fases, como se segue:

1.2.5.1 Fase flácida

Nesta fase o pênis se encontra predominantemente sob o controle do tônus do sistema nervoso simpático. O influxo arterial é baixo e o músculo liso dos espaços trabeculares encontra-se contraído. Os sinusóides encontram-se vazios;

1.2.5.2 Fase de enchimento

A dilatação arteriolar causada pela estimulação parassimpática leva a um aumento massivo no influxo arterial. O relaxamento das trabéculas permite o preenchimento dos sinusóides sem qualquer aumento significativo na pressão intracavernosa;

1.2.5.3 Fase de tumescência

Nesta fase a pressão intracavernosa começa a se elevar provocando a queda relativa do influxo arterial. Tão logo a pressão intracavernosa se eleva acima da pressão arterial diastólica o fluxo no cavernoso somente continua durante a fase sistólica. A expansão dos sinusóides provoca a compressão do plexo venoso subtúnico contra a parede da túnica albugínea, causando o mecanismo de venoclusão que começa a limitar o efluxo de sangue do corpo cavernoso (Figura 6). O pênis se alonga e expande à sua capacidade máxima;

Figura 6. Mecanismo de venoclusão ocasionado pela compressão das veias emissárias sob a túnica albugínea durante a ereção.

Fonte: Eardley et al.⁶

1.2.5.4 Fase da ereção completa

A pressão intracavernosa continua a se elevar para cerca de 90% da pressão arterial sistólica. O influxo arterial cai adicionalmente, mas ainda é maior do aquele observado durante a fase flácida. Os sinusóides em expansão comprimem o plexo venoso subtúnico, levando a redução do fluxo sanguíneo para as veias emissárias;

1.2.5.5 Fase da ereção rígida

O músculo isquiocavernoso contrai sob a influência do nervo pudendo. Isso leva à compressão da crura e ao aumento da pressão intracavernosa acima da pressão arterial sistólica. O pênis torna-se totalmente rígido e ereto. O músculo isquiocavernoso pode contrair voluntariamente ou involuntariamente sob a influência do reflexo bulbocavernoso (o que

ajuda a manter a rigidez durante a penetração). O influxo arterial cessa e as veias emissárias estão completamente ocluídas, o que torna o pênis em um espaço fechado. Com a fadiga do músculo esquelético há uma queda na pressão intracavernosa para os níveis anteriormente vistos durante a fase de ereção completa, permitindo o retorno de circulação ao tecido cavernoso;

1.2.5.6 Fase inicial da detumescência

Nesta fase há um aumento transitório na pressão intracavernosa, provavelmente devido ao estímulo simpático de contração em oposição ao efluxo venoso interrompido;

1.2.5.7 Fase lenta da detumescência

O músculo liso trabecular e as arteríolas helicoidais contraem e a pressão intracavernosa cai. A queda da pressão intracavernosa reduz a compressão do plexo venoso subtúnico e aumenta o efluxo sanguíneo do cavernoso;

1.2.5.8 Fase rápida da detumescência

A estimulação simpática leva a uma queda rápida no influxo arterial e na pressão intracavernosa. Isso causa aumento do efluxo sanguíneo ocorrendo a detumescência rapidamente.

1.2.6 Mediadores envolvidos no controle periférico da ereção: mecanismos moleculares

Como foi descrito anteriormente, a ereção peniana é determinada por mudanças de pressão nos sinusóides do tecido cavernoso. Contudo, a vasculatura do tecido erétil difere de vários leitos vasculares por ser composta de arteríolas e espaços sinusoidais preenchidos por sangue, onde ambos são delineados por células de músculo liso vascular e endoteliais. Durante o estímulo sexual ou tumescência relacionada ao sono, a liberação de óxido nítrico (NO) [predominantemente pela ativação da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) em nervos NANC e células endoteliais locais] estimula o relaxamento das células de músculo liso dos vasos e do corpo cavernoso (Figura 7).⁹⁻¹¹ A dilatação das arteríolas e dos sinusóides do corpo cavernoso resulta em aumento do fluxo sanguíneo (impulsionado pela força da pressão arterial) e subsequente elevação da pressão intracavernosa. A resposta erétil segue como consequência da força da pressão elevada que provoca expansão da túnica albugínea externa, resultando em aumento do comprimento e diâmetro do pênis, característicos da ereção.

Embora vários vasodilatadores tenham sido implicados na resposta erétil, acredita-se que o NO seja o principal estimulador da vasodilatação do corpo cavernoso e da ereção

peniana.¹²⁻¹⁴ O NO é formado a partir do aminoácido precursor, L-arginina, pela ação enzimática da sintase de óxido nítrico (NOS), que existe como três isoformas principais: nNOS, NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). As três isoformas já foram detectadas no pênis, contudo, nNOS e eNOS são as principais isoformas expressas constitutivamente no tecido cavernoso.^{13, 15-17} Após liberação, o NO difunde-se localmente para as células do músculo liso adjacentes do corpo cavernoso e liga-se à guanilato ciclase solúvel (sGC), que catalisa a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) a 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Este nucleotídeo cíclico, por sua vez, ativa a proteína cinase G, também conhecida como proteína cinase I dependente de cGMP (cGKI), a qual diminui a concentração de cálcio (Ca^{2+}) citosólico. O decaimento da concentração citosólica de Ca^{2+} induz o relaxamento das células de músculo liso vascular e do corpo cavernoso, levando à dilatação dos vasos arteriais, aumento do fluxo sanguíneo nos sinusóides do corpo cavernoso, e consequente ereção peniana.^{18, 19}

Figura 7. Relaxamento das células de músculo liso do corpo cavernoso durante a ereção. Durante o estímulo sexual, a ativação do sistema nervoso parassimpático resulta na liberação de acetilcolina (ACh) pelas terminações colinérgicas, ou na produção direta de óxido nítrico (NO) pela sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) presente nas inervações não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC). A ACh se liga a receptores muscarínicos do subtipo 3 (M_3) na superfície das células endoteliais e provoca a produção de NO por meio da ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS). Uma vez produzido, o NO se difunde para as células de músculo liso e promove a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Este por sua vez, ativa ou inibe uma série de mecanismos intracelulares que resulta no relaxamento da célula de músculo liso do tecido cavernoso.

Na ausência de estímulo sexual, a contração da vasculatura e do tecido cavernoso mantém o pênis no estado flácido. A contração do tecido cavernoso é principalmente determinada em resposta à noradrenalina (NA), liberada de terminais nervosos simpáticos, e à endotelina-1 (ET-1). Essa contração estreita o lúmen arteriolar e as cavidades sinusoidais e restringe o fluxo sanguíneo para manter uma baixa pressão intracavernosa e, conseqüentemente, o pênis no estado flácido.⁹⁻¹¹ A elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} desencadeia a contração do músculo liso e provoca flacidez peniana. O aumento intracelular de Ca^{2+} desencadeia a ligação de Ca^{2+} à proteína calmodulina (CaM), levando à ativação da miosina cinase de cadeia leve (MLCK) e à fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC₂₀) da miosina II (Figura 8). A extensão da fosforilação da MLC₂₀ ou a força de contração induzida pela estimulação do agonista é normalmente maior do que o predito pela atual concentração de Ca^{2+} na célula. Este processo é conhecido como sensibilização ao Ca^{2+} . A ativação da via de sensibilização ao Ca^{2+} é regulada pela família de genes homólogos da Ras (Rho), membro A (RhoA), uma pequena proteína G da família Rho que é ativada pela ligação ao GTP. A ativação da RhoA, que é facilitada por fatores de intercâmbio dos nucleotídeos de guanina específicos da Rho (RhoGEFs), estimula efetores tais como a Rho-cinase ou ROCK. A Rho-cinase ativada induz a fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) e inibe a atividade desta, tendo como efeito final a inibição da defosforilação da MLC₂₀ e favorecendo a contração do músculo liso e conseqüente flacidez do corpo cavernoso.^{18, 19} A importância da Rho-cinase na sensibilização das células de músculo liso do corpo cavernoso ao Ca^{2+} e manutenção da flacidez peniana é bem estabelecida.¹⁹⁻²¹ Além disso, todos os componentes da via de sinalização RhoA/Rho-cinase [RhoA, inibidor da fosfatase CPI-17, as subunidades regulatória da miosina fosfatase (MYPT-1) e catalítica (PP1 delta), isoformas da ROCK] são expressos no corpo cavernoso de diversas espécies e a inibição da Rho-cinase aumenta a pressão intracavernosa em modelos experimentais *in vivo*.^{18, 19} O aumento da atividade da Rho-cinase também exerce um papel importante em vários tipos experimentais de DE.²²⁻²⁷ De outra forma, vias de sinalização dependentes da Rho são ativadas por diversos estímulos e medeiam outras funções celulares que não a contração das células de músculo liso vascular, incluindo a organização da actina no citoesqueleto, adesão celular, proliferação, migração e inflamação, as quais são associadas com remodelamento vascular.^{28, 29} Evidências recentes indicam que a RhoA/Rho-cinase está envolvida na progressão da lesão de órgãos-alvo induzida por hormônios vasoativos, tais como angiotensina II (AngII) e aldosterona.^{30, 31}

Figura 8. Mecanismo de contração da célula de músculo liso do corpo cavernoso que mantém o pênis no estado flácido. A liberação de noradrenalina (NA) pelas terminações nervosas simpáticas ativa os receptores α -adrenérgicos. Subsequentemente, a ativação específica de proteínas G provoca o aumento da atividade da fosfolipase C (PLC). A PLC, por meio de uma cascata de sinalização intracelular, eleva os níveis citoplasmáticos de cálcio (Ca^{2+}). O aumento intracelular de Ca^{2+} desencadeia a ligação de Ca^{2+} à proteína calmodulina (CaM), levando à ativação da miosina cinase de cadeia leve (MLCK) e fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC). A ativação da RhoA, que é facilitada por fatores de intercâmbio dos nucleotídeos de guanina específicos da Rho (RhoGEFs), estimula efetores tais como a Rho-cinase ou ROCK. A Rho-cinase ativada induz a fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) e inibe a atividade desta, tendo como efeito final a inibição da defosforilação da MLC e favorecendo a contração do músculo liso e consequente flacidez do corpo cavernoso.

Com base nas observações acima, pode-se postular que qualquer substância que diminua os mecanismos de relaxamento ou aumente os mecanismos de contração nas células de músculo liso do corpo cavernoso pode agir como um agente causador no desenvolvimento da DE. Neste sentido, várias citocinas, particularmente o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) aparece como um candidato proeminente na fisiopatologia da DE devido às suas ações na vasculatura.

1.3 Classificação da disfunção erétil entre as disfunções sexuais

Historicamente, diversos sistemas de classificação de disfunção sexual foram propostos. Por várias décadas, dois sistemas de classificação são amplamente utilizados: a Classificação Internacional de Doenças (ICD)-10 formulado pela Organização Mundial de Saúde, e o Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM)-IV desenvolvido pela Associação Americana de Psiquiatria.³² Ambos os sistemas de classificação utilizam 4 categorias principais de disfunção sexual: distúrbios do desejo, excitação, orgasmo e dores durante o ato sexual. Além disso, estes sistemas levam em consideração fatores psicológicos e

físicos no desenvolvimento de disfunções sexuais e preconizam que é possível separá-los.³² Considerando o modelo da resposta sexual proposto por Masters e Johnson⁴ é possível afirmar que a DE seria, dessa forma, uma desordem da excitação.

A DE é definida como a incapacidade consistente ou recorrente do homem em obter e/ou manter a ereção peniana suficientemente para a atividade sexual. A consistência é um fator importante no diagnóstico da DE. A duração de pelo menos 3 meses é aceita como diagnóstico da DE. Contudo, em casos como traumas ou DE induzida cirurgicamente (prostatectomia radical), o diagnóstico pode ser estabelecido antes de 3 meses.³³

1.4 Epidemiologia da disfunção erétil no Brasil e no mundo

A DE é uma condição de origem multifatorial. Estima-se que mais de 150 milhões de homens ao redor do mundo são afetados pela DE. Além disso, este número é previsto dobrar até o ano de 2025.^{34, 35} A prevalência de DE aumenta consistentemente com a idade e é considerada um importante problema de saúde pública que afeta a vida dos pacientes e de seus respectivos parceiros.

No Estudo da Vida Sexual do Brasileiro, realizado em 18 grandes cidades brasileiras e englobando as 5 regiões do país, Abdo e colaboradores (2006) entrevistaram 2862 homens com faixa etária entre 18 e 70 anos de idade. Neste grupo a prevalência de DE foi de 45%.³⁶ Vários outros estudos demonstram que a prevalência da DE no Brasil varia em torno de 32% a 46%.³⁶⁻⁴¹ Esses números se assemelham com dados obtidos em outros países ao redor do mundo.^{34, 42} Além disso, um estudo prospectivo na cidade de Salvador mostrou que a incidência de DE é de 65,6 casos a cada mil pessoas por ano.⁴³ Com base neste estudo, os autores estimam que a DE incide em pouco mais de 1 milhão de homens a cada ano no Brasil.⁴⁴ Estes números não apenas são altos, mas principalmente alertam para o perigo intrínseco de que a DE é um forte fator preditivo de eventos coronarianos agudos.

1.5 Associação da disfunção erétil com doenças cardiovasculares: papel dos mediadores inflamatórios

Apesar de não ser letal, a DE compromete o bem-estar e a qualidade de vida dos pacientes e seus respectivos parceiros, bem como pode indicar a existência de doenças subjacentes, sobretudo aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular. A presença de doenças crônicas (doenças cardiovasculares), tabagismo, alcoolismo, abuso de drogas e estilo de vida sedentário são considerados grande fatores de risco para o desenvolvimento da DE.^{34, 45}

Tradicionalmente, acredita-se que a DE é um desfecho tardio de doenças sistêmicas vasculares e da aterosclerose. O Resultado do estudo prospectivo *Massachusetts Male Aging Study*⁴² demonstrou que doenças coronarianas e DE compartilham fatores de risco comuns em humanos. Além disso, a prevalência de DE varia de 42% a 75% em pacientes com doença coronariana estabelecida⁴⁶⁻⁴⁹ e a severidade da doença coronariana está diretamente relacionada com a severidade da DE.⁴⁹⁻⁵¹ Corroborando estes resultados, Montorsi e colaboradores⁵² demonstraram que a carga aterosclerótica determina a prevalência de DE: é baixa em pacientes com sintomas coronarianos agudos e com apenas uma lesão no vaso, e alta em síndromes coronarianas crônicas com múltiplas lesões na coronária. Contudo, tem-se reconhecido que a DE vasculogênica resulta não somente da oclusão das artérias do tecido cavernoso como consequência da aterosclerose (DE vascular estrutural), mas também pode ser um resultado da perda da função endotelial e da inervação NANC em produzir relaxamento adequado do músculo liso (DE vascular funcional).⁵³⁻⁵⁵ Estudos clínicos recentes têm demonstrado que o leito vascular peniano pode ser de fato um indicador sensível dos estágios iniciais da disfunção endotelial sistêmica. Em outras palavras, a DE é considerada uma manifestação clínica aguda de doenças vasculares generalizadas e carrega um risco independente para eventos cardiovasculares.⁵⁶⁻⁵⁸

A natureza multifatorial da DE é clara, e estudos populacionais longitudinais demonstram que fatores de risco cardiovasculares, tais como hipertensão, dislipidemia, obesidade central e resistência à insulina são grandes fatores de risco para o desenvolvimento de DE vasculogênica.⁵⁹ Além disso, a combinação destes fatores, como ocorre em pacientes com síndrome metabólica, acrescenta um risco adicional para o desenvolvimento de DE.^{60, 61}

Evidências recentes indicam que, mesmo em pequenas quantidades, a presença de marcadores do processo inflamatório pode ser um componente fisiopatológico de doenças cardiovasculares. De fato, marcadores inflamatórios estão aumentados em pacientes com hipertensão e síndrome metabólica, e predizem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.⁶² Pacientes com doenças cardiovasculares apresentam aumento na concentração plasmática e na expressão de vários mediadores inflamatórios, os quais incluem proteína C reativa e moléculas de adesão, tais como selectinas (P-selectina, E-selectina e L-selectina), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão à célula vascular 1 (VCAM-1). Além disso, níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias como o TNF- α , interleucina-6 (IL-6), assim como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, fator von Willebrand (vWF) e proteína C reativa, têm sido demonstrados em pacientes hipertensos.⁶²

Os níveis aumentados de mediadores inflamatórios são considerados fatores de risco independentes para o desenvolvimento de hipertensão e podem estar associados com aumento no risco de diabetes, doença cardiovascular e DE. Desta forma, algumas evidências identificam a presença de mediadores inflamatórios como um mecanismo fisiopatológico ligando DE, síndrome metabólica e doença coronariana.⁶³⁻⁷¹ Pacientes com DE frequentemente apresentam aumento da expressão e concentração plasmática de marcadores e mediadores inflamatórios, incluindo proteína C reativa,^{63, 64, 66, 67, 69, 70} moléculas de adesão (P-selectina, ICAM-1, VCAM-1),^{67, 70} e citocinas (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-18).^{63, 64, 70} De forma interessante, os níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios estão aumentados em pacientes com DE quando comparados com indivíduos sem DE, mesmo após a correção de fatores como a idade e o grau de risco coronariano.⁶⁸ Em adição, os níveis de marcadores inflamatórios também estão aumentados em homens com DE, mas sem fatores de risco cardiovasculares ou lesões vasculares.⁶⁷ Finalmente, o desempenho sexual tem sido negativamente correlacionado com os níveis circulantes de fatores inflamatórios e protrombóticos endoteliais, tais como fibrinogênio, vWF, interleucina 1 beta (IL-1 β) e IL-6.⁶⁴ Portanto, a identificação de alvos terapêuticos no controle de marcadores do processo inflamatório vascular, particularmente em pacientes com DE e doenças cardiovasculares, poderia fornecer benefícios clínicos significativos.

1.6 TNF- α : receptores e via de sinalização

O TNF- α foi assim nomeado pela sua habilidade em causar rápida regressão necrótica de tumores.⁷² É o primeiro membro da superfamília TNF, o qual possui ações pleiotrópicas incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose.⁷³ O TNF- α é principalmente produzido por macrófagos, linfócitos, neutrófilos, queratinócitos, e fibroblastos durante reações inflamatórias agudas.⁷⁴ Contudo, tem sido demonstrado que o TNF- α também é produzido em miócitos cardíacos, células de músculo liso e células endoteliais em resposta à endotoxina, independente da presença de células inflamatórias, *ex vivo* e *in vitro*.^{75, 76} A síntese do TNF- α é iniciada pela ativação transcricional do gene TNF- α , o qual é largamente regulado pelos elementos responsivos do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B) na região promotora 5'.⁷⁷

Atualmente, duas isoformas de TNF têm sido identificadas e compartilham atividades inflamatórias similares.⁷⁸ TNF- α é o menor e mais abundante dos dois peptídeos, e TNF- β (primeiramente descrito como linfotoxina- α)⁷⁹ é menos abundante e acredita-se que seja produzido principalmente por células T. Os receptores do TNF- α (TNFRs) sinalizam como

homotrímeros, e podem existir ligados à membrana plasmática ou como formas solúveis truncadas.⁸⁰ Pelo menos dois receptores distintos medeiam os efeitos do TNF- α : TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75), ambos os subtipos de receptores são encontrados em células endoteliais,⁸¹ célula de músculo liso⁸² e em miócitos cardíacos de ratos e humanos.^{83, 84} O amplo repertório de sinalização intracelular induzido pelo TNF- α resulta de sua habilidade em recrutar para o receptor uma variedade de proteínas adaptadoras. Tanto os receptores quanto as proteínas adaptadoras associadas contêm várias regiões definidas ou sítios que induzem eventos de sinalização específicos (Figura 9). Usualmente, a primeira proteína recrutada pela ativação do receptor TNFR-1 é a TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), a qual funciona como uma plataforma para recrutar pelo menos três mediadores adicionais: a proteína de interação com o receptor 1 (RIP1), a FADD (*Fas-associated death domain protein*) e o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2).⁸⁵⁻⁸⁸ O TRAF2 exerce um papel central nos eventos agudos, sendo compartilhado pelos receptores TNFR-1 e TNFR-2, que levam à ativação da cinase I κ B (IKK) e das proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPK). Análises bioquímicas e estruturais do complexo TRADD-TRAF2 revelaram que o TRAF2 possui uma maior afinidade pela proteína TRADD do que pelos receptores TNFR-1 ou TNFR-2.^{87, 89} Isto pode explicar porque o TNF- α é o melhor ativador do receptor TNFR-1, o qual utiliza TRADD como uma proteína adaptadora, quando comparado com o TNFR-2 que não interage com a TRADD.

A ativação do NF κ B representa uma das respostas pró-inflamatórias centrais induzidas pelo TNF- α , particularmente em células endoteliais.⁹⁰ O NF κ B é regulado principalmente pela fosforilação da I κ B que funciona como proteína inibitória e retém o NF κ B no citoplasma de células na ausência de estímulo inflamatório.⁹¹ Em resposta ao TNF- α e a outros agonistas, a I κ B é fosforilada pelo complexo IKK, que posteriormente sofre ubiquitinação e degradação. Desta forma, o então livre NF κ B transloca-se para o núcleo celular.⁹¹ Uma vez no núcleo, a atividade transcricional do NF κ B pode ser adicionalmente modulada pela fosforilação de várias proteínas cinases que são responsivas ao TNF- α , tais como a p38 do subgrupo de MAPK, fornecendo um ponto central para a interação com outras vias de sinalização.

Figura 9. A Ilustração demonstra os eventos sequenciais na ativação dos receptores TNFR1 e TNFR2 pelo TNF- α . A TRADD usualmente é a primeira proteína recrutada após ativação do receptor TNFR1, a qual funciona como uma plataforma ancoradora de pelo menos três mediadores adicionais: a proteína de interação com o receptor 1 (RIP1) e o TRAF2, os quais estimulam vias que resultam em efeitos anti-apoptóticos e inflamatórios, e a FADD que estimula caspases induzindo efeitos apoptóticos e anti-inflamatórios. A proteína TRAF2 também é recrutada pelo receptor TNFR2 juntamente com a TRAF1 produzindo efeitos inflamatórios e anti-apoptóticos. TRADD (TNFR1-associated death domain protein); RIP1 (proteína de interação com o receptor 1); TRAF2 (fator 2 associado ao receptor de TNF); FADD (Fas-associated death domain protein); TRAF1 (fator 1 associado ao receptor de TNF).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo testa a hipótese geral de que o TNF- α fisiológico exerce uma modulação negativa nas respostas de relaxamento do tecido cavernoso e que o aumento dos seus níveis, como acontece em diversos estados patológicos cardiovasculares, provoca alterações na reatividade do corpo cavernoso que favorecem a disfunção erétil: aumento das respostas contráteis e diminuição do relaxamento.

2.2 Objetivos específicos

- avaliar se a infusão sistêmica de TNF- α provoca mudanças na reatividade do tecido cavernoso;
- avaliar se a infusão sistêmica de TNF- α causa diminuição das enzimas responsáveis para o processo de ereção;
- avaliar a reatividade do tecido cavernoso em camundongos nocaute do TNF- α (TNF KO);
- avaliar a expressão das enzimas eNOS e nNOS, responsáveis pela produção de NO e consequente ereção, no tecido cavernoso de camundongos TNF KO;
- avaliar se o camundongo nocaute do TNF- α desenvolve mudanças estruturais do corpo cavernoso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos controle (B6; 129SF2/J) machos e TNF KO (B6; 129S6-*Tnf*^{tm1Gkl}/J) de 16 semanas de idade foram utilizados neste estudo (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EUA). Camundongos (C57BL/6) machos de 12 semanas de idade (Jackson Laboratories) foram utilizados para a infusão de TNF- α . Todos os procedimentos estão em acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Além disso, os procedimentos realizados neste estudo também seguiram as normas do guia de princípios adotados para o uso de animais, adotados pelo comitê de uso de animais para a pesquisa e educação do Medical College of Georgia, Augusta, Georgia, Estados Unidos. Os animais foram acondicionados num máximo de 4 animais por gaiola em ciclo claro/escuro de 12 horas, e foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

3.2 Infusão de TNF- α recombinante humano

Após anestesia com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (2.9 mg/Kg), bombas osmóticas foram implantadas na região posterior média do dorso dos animais para infusão subcutânea de TNF- α recombinante humano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na razão de 220 ng.Kg⁻¹.min⁻¹ durante 14 dias.

3.3 Medida da pressão arterial por radiotelemetria

A cirurgia foi realizada em animais controle e TNF KO para implantar transmissores de radiotelemetria (Data Science PA-C20, International, Roseville, MN, EUA) para a medida da pressão arterial. Sucintamente, após anestesia com isoflurana 4% e oxigênio 10%, o transmissor foi implantado dentro da artéria carótida via incisão na região média ventral do pescoço, e o corpo do transmissor foi colocado na região média do dorso dos animais. Esta incisão foi infundida com bupivacaína e fechada com sutura oftálmica estéril. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob condições de assepsia. Após a recuperação da anestesia, os camundongos foram acondicionados em gaiolas individuais e enviados à sala de medidas de radiotelemetria, onde tiveram ração padrão e água *ad libitum*. A aquisição dos valores da pressão arterial média foi iniciada 3 dias após a cirurgia, afim de que qualquer mudança nos valores da pressão dos animais após a cirurgia fosse normalizada. A pressão arterial média dos animais foi analisada por um período contínuo de 18 horas por dia (16:00 até 10:00 do dia seguinte), durante 3 dias.

3.4 Medida da pressão arterial pelo método direto

Após 14 dias de infusão de TNF- α humano, camundongos controle e infundidos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (2.9 mg/Kg). Após a anestesia um catéter foi introduzido na artéria carótida esquerda. O catéter foi redirecionado subcutaneamente para o dorso do animal e exteriorizado na região posterior média do pescoço. Em seguida, a incisão foi fechada com sutura oftálmica Ethicon 6-0 (Cornelia, GA, EUA). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob condições assépticas. Após a recuperação da anestesia, o catéter foi conectado a um transdutor de pressão e a pressão arterial média foi analisada por um período de 3 a 4 horas. Subsequentemente, os animais foram sacrificados e o tecido cavernoso foi isolado para os estudos moleculares.

3.5 Medida do TNF- α plasmático por ELISA

O sangue de animais anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (2.9 mg/Kg) foi coletado por punção cardíaca com seringas heparinizadas. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e o plasma coletado e armazenado a -80 °C. O ensaio para determinação do TNF- α plasmático foi realizado pela técnica de ELISA seguindo-se as instruções do fabricante do kit utilizado (R&D Systems, Mineápolis, MN, EUA).

3.6 Estudos de reatividade do corpo cavernoso *in vitro*

Protocolos experimentais específicos foram determinados para cada grupo de animais. Em seguida, os animais foram sacrificados em dióxido de carbono (CO₂) e o pênis foi extirpado e transferido para uma solução refrigerada de Krebs com a seguinte composição: NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, MgSO₄.7H₂O 1,17 mM, NaHCO₃ 14,9 mM, EDTA 0,026 mM, CaCl₂.2H₂O 1,6 mM, e D-glicose 5,55 mM. O tecido cavernoso foi dissecado e as artérias dorsais juntamente com o tecido esponjoso foram removidos. Duas preparações de tira do corpo cavernoso (1x1x10 mm) foram obtidas de cada pênis. Em seguida, as tiras do tecido cavernoso foram colocadas em câmaras de miógrafos de 4 mL (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca) contendo solução de Krebs aquecida a 37 °C, pH 7,4 e continuamente aeradas com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂).

Os tecidos foram submetidos à tensão basal de 2,5 mN. Esta tensão foi ajustada a cada 20 minutos, durante o período de estabilização de 60 minutos. Mudanças na tensão isométrica foram registradas usando um sistema de aquisição de dados PowerLab/8SP (Chart software, versão 5.0; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Para verificar a integridade das preparações do tecido cavernoso, depois de finalizado o período de estabilização, estas foram

estimuladas com KCl (120 mM) durante 5 minutos. Após este período, cada preparação foi lavada com Krebs em intervalos de 10 minutos, durante o período de 30 minutos.

Para avaliar as respostas de relaxamento, as tiras de tecido cavernoso foram pré-contraídas com fenilefrina (10^{-5} M) durante 10 minutos e, em seguida, curvas concentração-resposta cumulativas foram realizadas para vários agonistas: acetilcolina (ACh) (10^{-9} M- 3×10^{-6} M; relaxamento endotélio-dependente); nitroprussiato de sódio (10^{-8} M- 3×10^{-4} M; doador de NO); isoproteronol (10^{-10} M- 10^{-5} M; agonista beta-adrenérgico); tadalafil (10^{-10} M- 10^{-4} M; inibidor da fosfodiesterase-5) e Y-27632 (10^{-9} M- 10^{-4} M; inibidor da Rho-cinase). Para avaliar o relaxamento NANC, as tiras de corpo cavernoso foram pré-incubadas com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M) durante 45 minutos e, após a incubação, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-5} M) e submetidos ao estímulo por campo elétrico (*electric field stimulation*, EFS).

O EFS foi aplicado às tiras de tecido cavernoso colocadas entre eletrodos de platina, os quais estavam acoplados a uma unidade distribuidora de estímulo elétrico (Stimu-Splitter II) que, por sua vez, encontrava-se conectada à um estimulador elétrico Grass S88 (Astro-Med, West Warwick, RI, EUA). Pulsos elétricos foram aplicados a 20V, com duração de pulso de 1 ms e variadas frequências (1-64 Hz). A duração total de cada estímulo foi de 10s. Condições semelhantes de EFS foram utilizadas para avaliar as respostas contráteis mediadas pela ativação das terminações nervosas simpáticas. Tiras de tecido cavernoso foram estimuladas no tônus basal e após pré-incubação, durante 45 minutos, com L-NAME (10^{-4} M) e atropina (10^{-6} M). As respostas contráteis do tecido cavernoso foram avaliadas por meio de curvas concentração-resposta cumulativas aos seguintes agonistas: fenilefrina (10^{-9} M- 10^{-4} M) na presença e ausência de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (10^{-4} M), ET-1 (10^{-10} M- 10^{-6} M) e Ca^{+2} (10^{-4} M- 10^{-2} M). Solução de Krebs sem adição de Ca^{+2} foi utilizada para a curva de concentração-resposta ao Ca^{+2} . Neste experimento a fenilefrina (10^{-5}) foi adicionada previamente à adição de Ca^{+2} . Para avaliar as propriedades de complacência e elasticidade do tecido cavernoso, os estudos de distensão mecânica foram realizados na presença de L-NAME (10^{-4}) e em solução de Krebs sem a adição de Ca^{+2} , afim de que se evitassem efeitos de relaxamento e/ou contração. A tensão do corpo cavernoso foi ajustada inicialmente de 3 para 5 mN e, em seguida, incrementos de tensão 1 mN foram adicionados em intervalos de 3 minutos até o máximo de 10 mN. O valor do registro logo após o ajuste da tensão, subtraído da tensão após o período de 3 minutos foi utilizado pra calcular o Δ relaxamento.

3.7 Medidas de ereções espontâneas

Estudos para avaliar o número de ereções espontâneas foram conduzidos em animais controles e TNF KO. Os camundongos foram aclimatados à sala e à câmara de testes durante 1 semana. Câmaras de vidro (25 x 20 x 20 cm) foram utilizadas com uma câmera filmadora embaixo para facilitar a visualização do pênis. Dois animais, em câmaras de testes separadas, sem contato físico ou visual, foram observados simultaneamente. As observações começaram logo após colocar os animais dentro das câmaras. As imagens foram registradas por um período de 30 minutos. De acordo com estudos anteriores,⁹² as ereções foram observadas, distinguidas e contadas quando o animal se apoiava nas patas traseiras e inclinava o corpo para frente, dobrava a cabeça para baixo na área genital, lambia o pênis segurando-o com as patas dianteiras e exercia movimentos com a pelve. O pênis ereto foi sempre observado, entretanto, a ereção dura por um breve período de tempo. Foram consideradas respostas similares a ereção quando o animal se apoiava nas patas traseiras e inclinava o corpo para frente, dobrava a cabeça para baixo na área genital, lambia o abdômen ao invés do pênis e exercia movimentos com a pelve. Portanto, dois critérios distinguiram ereções de respostas similares a ereção: no caso da ereção, o animal lambia e segurava o pênis. No presente estudo somente as respostas eréteis foram analisadas.

3.8 Análise histológica e imunohistoquímica do corpo cavernoso

Animais controle e TNF KO foram sacrificados e os tecidos cavernosos foram isolados e fixados em metacarn (60% metanol; 30% clorofórmio; 10% ácido acético) por 3 horas a temperatura de 4 °C. Após lavagem, os tecidos foram desidratados e emblocados em parafina (Oxford, St. Louis, MO, EUA) à 60 °C. Cortes transversais (5 µm) foram obtidos e, em seguida, as amostras foram coradas por tricrômico de Masson (Sigma). Esta técnica identifica colágeno como azul e músculo liso como vermelho. Para identificar a expressão de elastina, amostras foram coradas pela técnica de Verhoeff-van Gieson que identifica elastina na coloração preta.

Os tecidos cavernosos de cada pênis foram analisados usando-se o microscópio Zeiss Axioskop nas objetivas de 2X e 40X. As imagens foram obtidas por meio de uma câmera digital Canon Power Shot G5 (Canon USA, Lake Success, NY, EUA) e o software KS 100 3.0 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA). A área completa do corpo cavernoso, os espaços vasculares juntamente com o músculo liso e o colágeno foram medidos usando-se o software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). A expressão de colágeno foi

avaliada pela medida da razão da área marcada para colágeno (azul) pela área total dos espaços vasculares e músculo liso (branco e vermelho).

Outros cortes foram utilizados para marcação por imunohistoquímica. Sucintamente, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti- α -actina (1:200) (Sigma, seguindo-se instruções do fabricante) por um período de 20 horas à temperatura de 4 °C. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão fosfato (PBS) e incubados com anticorpo secundário, anticorpo imunoglobulina G (IgG) conjugados à biotina, por 30 minutos. Anticorpos ligados ao antígeno foram detectados com o complexo peroxidase-estreptavidina usando-se 0.2 mg/mL de 3, 3'- diaminobenzidina tetrahidrocloreto em PBS contendo 0.003% de peróxido de hidrogênio. Em seguida, os cortes foram contra-corados por hematoxilina. O número de células positivas foi determinado e expresso como o número de células positivas por campo em aumento de 20X. Pelo menos 3 campos por corte foram analisados e o valor médio foi considerado para análise. Cortes incubados somente com o anticorpo secundário, para verificar a especificidade do anticorpo, foram considerados como controle negativo. Em todos os casos, 3 cortes por amostra de tecido de 4 animais por grupo foram utilizados para calcular a média e o erro padrão da média.

3.9 Western blot

Tecidos cavernosos foram dissecados e homogeneizados em um coquetel de inibidores de proteases [4-(2-aminoetil) fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma Aldrich) usando-se um homogeneizador mecânico de tecidos. O ensaio de Bradford foi utilizado para medir a concentração de proteína. Um total de 40 μ g de proteínas foi aplicado em gel SDS-PAGE 10% e, em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio dos sítios inespecíficos com leite 5%, as membranas foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-eNOS (Cell signaling Technology, Inc. Danvers, MA, EUA), na diluição de 1:500, ou com anticorpo primário monoclonal anti-nNOS (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, EUA), na diluição de 1:2000. Esta incubação foi realizada por um período de 20 horas à temperatura de 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes, por dez minutos, com TBS-T (100 mL de TBS 10X; 1 mL de Tween 20 e água destilada q.s.p. 1 L) e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho ou anti-camundongo, respectivamente, marcado com peroxidase (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA) durante 1 hora, na diluição de 1:2000, sob agitação e à temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas 3 vezes por dez minutos com TBS-T e a detecção foi realizada com kit de quimioluminescência (PIERCE, Rockford, IL,

EUA). Por fim, as membranas foram expostas a uma chapa de filme fotográfico para verificação da presença de bandas. A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica utilizando o software Scion Image (Bethesda, MD, EUA).

3.10 Extração de RNA, síntese de cDNA, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA total foi extraído do corpo cavernoso usando-se RNeasy comercial kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, EUA). A quantidade, integridade e pureza das amostras de RNA foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). 1 µg de RNA total foi utilizado para a transcrição reversa num volume final de 50µL, usando-se o kit de alta capacidade de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em seguida, o produto de cDNA foi armazenado em temperatura de -20 °C. Sondas para o RNAm da prepro-endotelina-1 (preproET-1) (Nº Mn00438656_m1), receptor ET_A (Nº Rn00561137_m1), eNOS (Nº Mn01164908_m1), nNOS (Nº Mn00435175) e o receptor TNFR-1 (Nº Rn01492348_m1) foram obtidas da Applied Biosystems. A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada usando-se o sistema de PCR em tempo real rápido 7,500 (Applied Biosystems) num volume total de 20µL seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante e usando-se o reagente TaqMan[®] para PCR universal rápido (2X) (Applied Biosystems) e 0,1 µM de cada primer. Para verificar a especificidade dos primers, amostras controle negativas contendo água ao invés de cDNA foram utilizadas para todas as sondas utilizadas. Cada amostra foi normalizada com base no RNA ribossômico 18S. A quantificação de RNA ribossômico 18S foi realizada com o reagente de RNA ribossômico TaqMan[®] (Applied Biosystems), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante. A expressão gênica relativa foi normalizada por um calibrador escolhido como sendo a condição basal (grupo controle) para cada ponto de tempo. Os resultados foram calculados pelo método $\Delta\Delta CT$ e expressos como vezes de mudança (*X-mudança*) na expressão gênica relativa ao RNA ribossômico 18S e ao calibrador da seguinte forma: $X\text{-mudança} = 2^{-(\Delta CT \text{ da amostra} - \Delta CT \text{ do calibrador})}$, onde o parâmetro CT (limiar) é definido como o número fracional de ciclos no qual o sinal detector da reação de PCR ultrapassa um limiar fixo. Os valores de ΔCT das amostras e do calibrador foram determinados por subtrair o valor médio de CT do transcrito sob investigação do valor médio de CT do gene 18S rRNA de cada amostra.

3.11 Análise estatística

As respostas contráteis estão representadas como a força desenvolvida (mN) a partir do tônus basal. Por outro lado, as respostas de relaxamento estão expressas como a porcentagem de relaxamento em relação aos níveis de pré-contração induzidos pela fenilefrina. Curvas concentração-efeito foram submetidas à análise de regressão não-linear usando-se o programa Prisma (Graph Pad Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A potência dos agonistas e a resposta máxima estão expressas como pD_2 (logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima) e E_{max} (efeito máximo produzido pelo agonista), respectivamente. O compartilhamento forçado de parâmetros da curva foi utilizado para traçar curvas sigmoidais e determinar o valor de pD_2 para as drogas tadalafil e Y-27632. Análises estatísticas dos valores de E_{max} e pD_2 foram realizadas usando-se a regressão não linear seguida pelo teste F ou teste “t” de Student. Os resultados do western blot e PCR foram normalizados pelo grupo controle e analisados pelo teste “t” de uma amostra e o valor de P foi calculado pela razão “t” e pelos graus de liberdade. Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS (Parte 1)

A massa corporal dos animais infundidos com TNF- α ($27,6 \pm 1,4$ g; n=13) não foi estatisticamente diferente dos animais controles ($27,5 \pm 1,0$ g; n=11). A infusão contínua de TNF- α na razão de $220 \text{ ng.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ causou a elevação plasmática de TNF- α após 14 dias (Figura 10). Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de pressão arterial média entre os grupos (Figura 11).

Figura 10. Níveis plasmáticos de TNF- α . As barras dos gráficos representam a medida plasmática de TNF- α em animais controle (n=5) e infundidos com TNF- α (n=5) ($220 \text{ ng.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, durante 14 dias). Os valores representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como pg/mL. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 11. Pressão arterial média direta. As barras dos gráficos representam a medida da pressão arterial média direta durante o período de 1 hora em animais controle (n=4) e infundidos com TNF- α (n=5) ($220 \text{ ng.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, durante 14 dias). Os valores representam a média $\pm$ EPM e foram expressos em mmHg. n representa o número de animais em cada grupo.

4.1 Estudos de reatividade do corpo cavernoso

Para avaliar a presença de mudanças na contratilidade do corpo cavernoso em resposta à atividade simpática, tiras do corpo cavernoso foram estimuladas por EFS. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada na resposta contrátil com o tecido cavernoso no estado basal (Figura 12A). Entretanto, a resposta contrátil produzida nesta situação é o resultado final da liberação não somente de noradrenalina de terminações nervosas simpáticas, mas também do neurotransmissor ACh de terminações parassimpáticas, o qual estimula receptores muscarínicos nas células endoteliais levando à produção de NO. Além disso, o EFS estimula terminações nitrérgicas que por si só liberam NO. Considerando isto, as tiras do corpo cavernoso foram incubadas com atropina (10^{-6} M) e L-NAME (10^{-4} M) para avaliar somente a atividade adrenérgica simpática. Nestas condições, tiras cavernosas de animais infundidos com TNF- α apresentaram aumento da resposta contrátil ao EFS (1-32Hz) (Figuras 12B e 12C). A resposta contrátil foi completamente abolida na presença do agente bloqueador de nervo simpático tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) ou do antagonista α -adrenérgico terazosina (10^{-6} M), confirmando que estas respostas são de origem neuronal e de natureza adrenérgica (dado não demonstrado). De maneira similar, segmentos do corpo cavernoso de animais infundidos com TNF- α demonstraram aumento na resposta contrátil à fenilefrina (Figura 13A) e à ET-1 (Figura 13B) em comparação com animais do grupo controle. A adição do antagonista de receptores ET_A (atrasentan) praticamente aboliu a resposta contrátil à ET-1 em todos os grupos (dado não demonstrado).

Enquanto que a geração de NO produzido pela ativação da eNOS parece contribuir para o relaxamento causado pela ACh, o relaxamento NANC do corpo cavernoso é mediado pelo NO proveniente da nNOS. Neste sentido, o relaxamento induzido pela ACh é completamente bloqueado na presença de atropina e/ou L-NAME. Contudo, o relaxamento NANC é minimamente alterado na presença de atropina, mas é completamente bloqueado na presença de L-NAME. Para avaliar os efeitos da estimulação dos nervos NANC, tiras de corpo cavernoso foram incubadas com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M). Após 45 minutos de incubação as tiras foram pré-contraídas com fenilefrina (10^{-5} M) e curvas de frequência-resposta foram obtidas por meio de EFS (1-32Hz). Tiras cavernosas de animais infundidos com TNF- α tiveram diminuição do relaxamento ao EFS em comparação com animais controles (Figuras 14A e 14B).

A adição cumulativa de ACh produziu relaxamento dependente da concentração em segmentos de corpo cavernoso pré-contraídos com fenilefrina (Figura 14C). Contudo, não

houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 12. Reatividade do tecido cavernoso exposto à estimulação de terminações nervosas simpáticas. (A) Curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico por campo (EFS) (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e infundidos com TNF- α (n=8) (220 ng.Kg⁻¹.min⁻¹, durante 14 dias). (B) Curvas-frequência resposta ao EFS (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e infundidos com TNF- α (n=6) (220 ng.Kg⁻¹.min⁻¹, durante 14 dias) na presença de L-NAME (10⁻⁴M) e atropina (10⁻⁶M). (C) Registro representativo de curvas frequência-resposta ao EFS (1-64 Hz) no corpo cavernoso de animais do grupo controle e animais infundidos com TNF- α , após incubação com L-NAME (10⁻⁴M) e atropina (10⁻⁶M). Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em mN. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 13. Resposta contrátil do tecido cavernoso aos agonistas fenilefrina e endotelina 1. (A) Curvas concentração-efeito para fenilefrina no tecido cavernoso de camundongos controle (n=7) e infundidos com TNF- α (n=15) (220 ng.Kg-1.min-1, durante 14 dias). (B) Curvas concentração-efeito para ET-1 no tecido cavernoso de camundongos controle (n=7) e infundidos com TNF- α (220 ng.Kg-1.min-1, durante 14 dias) (n=8). Os valores representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em mN. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 14. Resposta do tecido cavernoso ao relaxamento NANC e dependente do endotélio. (A) Registro representativo de curvas frequência-resposta ao EFS (1-64 Hz) no corpo cavernoso de animais do grupo controle e animais infundidos com TNF- α , após incubação com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M). (B) Curvas frequência-resposta ao EFS (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=9) e infundidos com TNF- α (n=10) ($220 \text{ ng.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, durante 14 dias), após incubação com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M). (C) Curvas concentração-efeito para acetilcolina no tecido cavernoso de camundongos controle (n=6) e infundidos com TNF- α (n=18) ($220 \text{ ng.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, durante 14 dias). Os valores representam a média $\pm$ EPM e foram calculados como a percentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (10^{-5} M). *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

4.2 Efeito da infusão de TNF- α sobre a expressão de receptores TNFR1, ET-1, receptores ET_A, eNOS e nNOS no corpo cavernoso.

Considerando que o receptor TNFR1 é o principal receptor de TNF- α , experimentos foram conduzidos para avaliar se a infusão de TNF- α provoca mudanças na expressão deste receptor no corpo cavernoso. Embora não tenha havido mudanças estatisticamente significativas na expressão deste receptor, houve uma clara tendência ($p=0,0638$) de redução na expressão do TNFR1 após a infusão de TNF- α (Figura 15A).

A infusão de TNF- α não provocou mudanças na expressão de prépróET-1 (Figura 15B). Em contraste, houve um aumento de 4 vezes na expressão gênica do receptor ET_A após infusão de TNF- α (Figura 15C). Consistente com as mudanças observadas nos dados funcionais *in vitro*, a infusão de TNF- α diminuiu a expressão gênica da nNOS (Figura 16A). Embora a infusão de TNF- α não tenha provocado mudanças no relaxamento endotélio-dependente, a expressão da eNOS diminuiu significativamente no corpo cavernoso após a infusão de TNF- α (Figura 16B).

Figura 15. Expressão do RNA mensageiro para (A) receptores TNFR1, (B) preproET-1, e (C) receptores ET_A. A expressão foi determinada pela reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando-se RNA total extraído do corpo cavernoso de animais controle (n=6) e infundidos com TNF- α (n=7). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM de mudança na expressão gênica em relação ao grupo controle. Os valores foram normalizados pelo correspondente RNA ribossômico de cada amostra. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 16. Expressão do RNA mensageiro para (A) nNOS e (B) eNOS. A expressão foi determinada pela reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando-se RNA total extraído do corpo cavernoso de animais controle (n=6) e infundidos com TNF- α (n=7). Os valores das barras representam a média $\pm$ EPM de mudança na expressão gênica em relação ao grupo controle. Os valores foram normalizados pelo correspondente RNA ribossômico de cada amostra. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

5 RESULTADOS (Parte 2)

Os animais nocaute do gene TNF- α apresentaram massa corporal reduzida ($28 \pm 0,8$ g, $n=22$) em comparação com animais controle ($31,3 \pm 0,6$ g, $n=22$). Contudo não foram observadas diferenças na razão entre peso de órgãos (coração e rim) pelo peso corporal entre os grupos (Tabela 1). Nenhuma diferença foi observada nos valores da pressão arterial média entre animais controle e nocaute (Figura 17).

Tabela 1 - Relação entre massa de órgãos e massa corporal.

Massa do órgão/massa corporal (mg/g)	Controle	TNF- α KO
1 rim	$7,21 \pm 0,05$	$7,43 \pm 0,9$
2 rins	$14,89 \pm 0,3$	$14,90 \pm 0,7$
Coração	$5,63 \pm 0,7$	$6,27 \pm 0,6$

Os valores representam a média $\pm$ EPM expressos como a massa do órgão (mg)/massa corporal (g). TNF- α KO= camundongos nocaute do gene TNF- α .

Figura 17. Medida da pressão arterial média pela técnica de radiotelemetria. As curvas do gráfico representam os valores de pressão arterial média de animais controle ($n=4$) e nocaute do gene TNF- α ($n=4$). A aquisição dos dados da pressão arterial média dos animais foi realizada por um período contínuo de 18 horas por dia (16:00 até 10:00 do dia seguinte). Os valores representam a média $\pm$ EPM da pressão arterial média. n representa o número de animais em cada grupo.

5.1 Estudos de reatividade do corpo cavernoso

Para avaliar a resposta contrátil do tecido cavernoso à estimulação simpática, EFS foi aplicado em tiras cavernosas de animais controle e TNF- α KO. Segmentos do corpo cavernoso de animais TNF- α KO demonstraram resposta contrátil reduzida ao EFS sob condições basais (Figura 18A) e após incubação com atropina (10^{-6} M) e L-NAME (10^{-4} M) (Figura 18B). De maneira similar, tiras de músculo liso do corpo cavernoso de animais TNF- α KO demonstraram contração reduzida ao agonista α_1 -adrenérgico (fenilefrina) em condições basais (Figura 19A) e após a incubação com L-NAME (10^{-4} M) (Figura 19B). Embora as tiras de corpo cavernoso dos animais TNF- α KO tenham menor resposta máxima a fenilefrina, é interessante observar que, após a incubação com L-NAME as tiras cavernosas dos camundongos TNF- α KO demonstraram aumento da sensibilidade a esta droga (Observar valor de pD_2 na Tabela 2). De forma similar ao EFS e a contração induzida pela fenilefrina, o tecido cavernoso de animais TNF- α KO apresentou diminuição da contração induzida pela adição cumulativa de cálcio (Figura 20).

A adição cumulativa de ACh causou relaxamento dependente da concentração no corpo cavernoso pré-contraído com fenilefrina (Figura 21A). Embora não tenha havido diferença no valor da pD_2 entre os grupos (Tabela 2), aumento significativo na resposta máxima produzida pela ACh no corpo cavernoso de animais TNF- α KO ($97,4 \pm 5,3$; % de relaxamento) foi observado em comparação com animais controle ($76,3 \pm 6,3$ % de relaxamento) (Figura 21B e Tabela 2). O relaxamento induzido pela ACh foi completamente bloqueado na presença de atropina (10^{-6} M) (ACh: 76 ± 6 vs atropina: 8 ± 2 ; % de relaxamento) ou L-NAME (10^{-4} M) (L-NAME: 4 ± 1 ; % de relaxamento). Diferentemente, o relaxamento induzido por EFS foi minimamente alterado na presença de atropina (veículo: 66 ± 5 vs atropina: 70 ± 4 ; % de relaxamento em 32Hz), mas completamente bloqueado na presença de L-NAME (L-NAME: $1 \pm 0,5$; % de relaxamento em 32Hz).

Para avaliar os efeitos da estimulação dos nervos NANC, tiras de corpo cavernoso foram incubadas com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M). Após 45 minutos de incubação as tiras foram pré-contraídas com fenilefrina (10^{-5} M) e curvas de frequência-resposta foram avaliadas por meio do EFS (1-32Hz). Tiras cavernosas dos animais TNF- α KO tiveram maior relaxamento NANC (Figura 21C) em comparação com tiras de animais controle.

Não foram observadas diferenças no relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (Figura 22A), isoproterenol (Figura 22B), tadalafil (Figura 23A) ou pelo composto Y-

27632 (Figura 23B) entre os grupos. Os valores de pD_2 e resposta máxima aos agonistas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de pD_2 e resposta máxima dos agonistas em corpo cavernoso de animais controle e TNF- α KO.

Agonist	Controle	TNF- α KO	Controle	TNF- α KO
	pD_2		E_{max}	
Acetilcolina	$6,99 \pm 0,13$	$7,11 \pm 0,07$	$76,3 \pm 6,3$	$97,4 \pm 5,3$ *
Nitroprussiato de sódio	$6,13 \pm 0,16$	$5,84 \pm 0,07$	$75,6 \pm 4,2$	$76,6 \pm 2,4$
Isoproterenol	$7,47 \pm 0,17$	$7,12 \pm 0,13$	$65,9 \pm 4,4$	$63,5 \pm 3,9$
Tadalafil	$6,61 \pm 0,16$	$6,26 \pm 0,24$	$99,2 \pm 4,1$	$96,4 \pm 3,9$
Y-27632	$5,03 \pm 0,07$	$5,36 \pm 0,10$	$94,4 \pm 6,3$	$95,7 \pm 11,7$
Fenilefrina	$5,66 \pm 0,12$	$5,94 \pm 0,23$	$2,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$ *
Fenilefrina+L-NAME	$5,73 \pm 0,12$	$6,34 \pm 0,19$ *	$2,2 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$ *

Os valores representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em (mN) para os agonistas constritores e calculados como a percentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (10^{-5} M) para os agonistas dilatadores. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. pD_2 = logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% da resposta máxima; E_{max} = efeito máximo produzido pelo agonista; L-NAME= N ω -nitro-L-arginina metil éster; Y-27632= inibidor da enzima Rho-cinase; TNF- α KO= camundongos nocaute do gene TNF- α .

Figura 18. Reatividade do tecido cavernoso submetido a estimulação de terminações nervosas simpáticas. (A) Curvas frequência-resposta ao EFS (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e nocaute do gene TNF- α (n=6). (B) Curvas frequência-resposta ao EFS (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e nocaute do gene TNF- α (n=6) na presença de L-NAME (10^{-4} M) e atropina (10^{-6} M). Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em mN. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 19. Reatividade do tecido cavernoso à estimulação de receptores α_1 -adrenérgicos. (A) Curvas concentração-efeito para fenilefrina no tecido cavernoso de camundongos controle (n=6) e nocaute do gene TNF- α (n=7). (B) Curvas concentração-efeito para fenilefrina no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e nocaute do gene TNF- α (n=5) na presença de L-NAME (10^{-4} M) e atropina (10^{-6} M). Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em mN. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 20. Reatividade do tecido cavernoso ao cálcio. Experimento realizado com adição prévia de fenilefrina 10^{-5} M em tampão de Krebs sem a presença de cálcio. Curvas concentração-efeito para cálcio no tecido cavernoso de camundongos controle (n=4) e nocaute do gene TNF- α (n=4). Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram expressos como a força isométrica desenvolvida pelo tecido cavernoso em mN. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 21. Resposta do tecido cavernoso ao relaxamento dependente do endotélio e NANC. (A) Registro representativo de curvas concentração-efeito para acetilcolina no corpo cavernoso de animais do grupo controle e nocaute do gene TNF- α . (B) Curvas concentração-efeito para acetilcolina no tecido cavernoso de camundongos controle (n=6) e nocaute do gene TNF- α (n=8). (C) Curvas frequência-resposta ao EFS (1-32 Hz) no tecido cavernoso de camundongos controle (n=5) e nocaute do gene TNF- α (n=5), após incubação com tosilato de bretílio (3×10^{-5} M) e atropina (10^{-6} M). Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram calculados como a porcentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (10^{-5} M). *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 22. Curvas concentração-efeito para (A) nitroprussiato de sódio e (B) isoproterenol no tecido cavernoso de camundongos controle e nocaute do gene $\text{TNF-}\alpha$. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram calculados como a porcentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (10^{-5}M), $n=5-7$ por grupo. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 23. Curvas concentração-efeito para (A) tadalafil e (B) Y-27632 no tecido cavernoso de camundongos controle e nocaute do gene $\text{TNF-}\alpha$. Os valores dos gráficos representam a média $\pm$ EPM e foram calculados como a porcentagem de relaxamento produzido em relação a pré-contracção produzida pela fenilefrina (10^{-5}M), $n=5-7$ por grupo. n representa o número de animais em cada grupo.

5.2 Expressão da eNOS, nNOS, colágeno e elastina no corpo cavernoso

Para avaliar se o aumento das respostas de relaxamento induzido pela ACh e pela estimulação dos nervos NANC estava associado com aumento na expressão de isoformas da NOS, a expressão de eNOS e nNOS foi avaliada por western blot no corpo cavernoso de animais controle e TNF- α KO. Como pode ser observado nas figuras 24A e 24B, aumento na expressão de eNOS e nNOS foi detectado no corpo cavernoso dos animais TNF- α KO.

Adicionalmente, a estrutura do corpo cavernoso foi avaliada. Análises histológicas demonstraram que o corpo cavernoso de animais TNF- α KO possui aumento na razão entre o conteúdo de colágeno e células de músculo liso (Figuras 25A e 25B) e de elastina (Figuras 26A e 26B). Contudo, o número de células de músculo liso no corpo cavernoso não foi diferente entre os grupos (Figura 27A; número de células positivas observadas por campo em objetivas de 20X de aumento). De modo similar, não foram observadas diferenças na área ocupada por células de músculo liso em relação à área total do corpo cavernoso (Figura 27B). A capacidade do tecido cavernoso de relaxar espontaneamente em resposta ao estiramento mecânico foi avaliada. Como pode ser observado na figura 27C, o tecido cavernoso de animais TNF- α KO apresentou maior capacidade de relaxamento ao estiramento mecânico. Contudo, diferença estatística significativa só foi observada nas tensões de 5 e 6 mN (Figura 27C).

Figura 24. Bandas representativas de imunoblot para (A) eNOS e (B) nNOS. As proteínas foram extraídas do corpo cavernoso de animais controle (n=5) e nocaute do gene TNF- α (n=8). As barras mostram valores de densidade óptica nos diferentes grupos. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 25. (A) Corte transversal do corpo cavernoso de animais controle e nocaute do gene TNF- α , mostrando as principais estruturas: (CS) corpo esponjoso; (U) uretra; (DA) artéria dorsal e (CA) artéria cavernosa. **(B)** As barras dos gráficos representam a razão entre o conteúdo de colágeno e músculo liso no corpo cavernoso de animais controle (n=4) e nocaute do gene TNF- α (n=4). As setas pontilhadas indicam o conteúdo de colágeno no corpo cavernoso. As figuras foram fotografadas em objetivas de 4x de aumento. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 26. (A) Corte transversal do corpo cavernoso de animais controle e nocaute do gene $\text{TNF-}\alpha$ mostrando o conteúdo de elastina. (B) As barras dos gráficos representam a razão entre o conteúdo de elastina e músculo liso no corpo cavernoso de animais controle ($n=4$) e nocaute do gene $\text{TNF-}\alpha$ ($n=4$). As setas pontilhadas indicam o conteúdo de elastina no corpo cavernoso. As figuras foram fotografadas em objetivas de 4x de aumento. Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

Figura 27. Quantidade de células de músculo liso e propriedades mecânicas do tecido cavernoso de animais controle e nocaute de TNF- α . (A) As barras dos gráficos representam o número de células de músculo liso marcadas positivamente por alfa-actina e observado na objetiva de aumento de 20X. n=3 em ambos os grupos. (B) Porcentagem da área de músculo liso e dos espaços vasculares ocupados em relação à área total do tecido cavernoso. n=3 em ambos os grupos. (C) Curvas representam o delta do relaxamento espontâneo do tecido cavernoso após incrementos na tensão basal. n=5 em ambos os grupos. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

5.3 Ereções espontâneas

Estudos avaliando o número de ereções espontâneas foram conduzidos para verificar se o aumento das respostas de relaxamento e diminuição das respostas contráteis observadas no corpo cavernoso de animais TNF- α KO seriam traduzidas em maior facilidade de obter respostas eréteis penianas. De fato, os animais TNF- α KO demonstraram um maior número de ereções espontâneas (Figura 28).

Figura 28. Ereções espontâneas. As barras representam o número de ereções espontâneas em animais controle (n=4) e nocaute do gene TNF- α (n=5). Os animais foram monitorados por um período de 30 minutos. Os valores representam a média $\pm$ EPM. *p<0,05 em relação ao grupo controle. n representa o número de animais em cada grupo.

6 Discussão

O primeiro conjunto de observações do presente estudo demonstra que o corpo cavernoso isolado de camundongos infundidos com TNF- α apresenta comprometimento no relaxamento mediado por nervos NANC assim como aumento das contrações mediadas por nervos simpáticos. Além disso, a expressão gênica de enzimas-chave envolvidas na resposta erétil, tais como a eNOS e a nNOS, está diminuída no tecido cavernoso de animais infundidos com TNF- α .

Adicionalmente, o segundo conjunto de observações demonstra que o corpo cavernoso isolado de animais nocaute do gene TNF- α apresenta não somente aumento no relaxamento dependente do endotélio e no relaxamento mediado por nervos NANC, mas também aumento na expressão das enzimas que medeiam o processo erétil: eNOS e nNOS. Somado a isto, as contrações mediadas por nervos simpáticos estão diminuídas no tecido cavernoso destes animais. Considerando estes dados em conjunto, o presente trabalho fornece um grupo de evidências demonstrando que o TNF- α exerce um papel em detrimento da função erétil.

Considerando a miríade de efeitos que o TNF- α exerce na vasculatura, é extremamente difícil determinar com o conhecimento atual se os efeitos deletérios do TNF- α na função erétil representam uma ação direta no corpo cavernoso ou apenas a consequência da disfunção endotelial sistêmica. Em adição, pode-se argumentar se os efeitos observados com a infusão no presente estudo, ou o aumento nos níveis de TNF- α observado em diversas condições clínicas são efeitos periféricos ou centrais.

Com relação às ações diretas do TNF- α , a expressão do receptor TNFR1 e do próprio TNF- α no corpo cavernoso sugere ações diretas deste agonista neste tecido. Além disso, o TNF- α é um fator importante associado a várias doenças cardiovasculares, tais como isquemia-reperfusão do miocárdio, insuficiência cardíaca crônica, aterosclerose e distúrbios cardiovasculares associadas à sepsis.⁹³⁻⁹⁵ Estas condições onde os níveis de TNF- α encontram-se elevados, com certeza favorecem a maior exposição do tecido cavernoso a esta citocina, e portanto contribuem para os efeitos do TNF- α diretamente no corpo cavernoso. O endotélio vascular é o alvo principal das ações do TNF- α nestas doenças, nas quais os níveis plasmáticos de TNF- α estão significativamente elevados. A administração *in vivo* de TNF- α induz o comprometimento do relaxamento vascular dependente do endotélio numa variedade de territórios vasculares e diminui a liberação de NO.⁹⁶ De acordo, os animais infundidos com TNF- α no presente estudo demonstraram diminuição na expressão da eNOS no tecido cavernoso. Estudos independentes demonstraram que o mecanismo pelo qual o TNF- α suprime a expressão da eNOS é por inibir a atividade promotora gênica,^{97, 98} e predominantemente por desestabilizar o RNAm nas células endoteliais.⁹⁹ É intrigante

observar que apesar da diminuição na expressão da eNOS causada pelo TNF- α no corpo cavernoso, nenhuma diferença significativa no relaxamento dependente do endotélio foi encontrada em relação ao grupo controle. Embora mecanismos compensatórios possam estar envolvidos nesta resposta, mudanças relacionadas com o tempo de exposição aos níveis elevados de TNF- α parecem ser mais plausíveis para explicar essa aparente discrepância. Zemse e colaboradores,¹⁰⁰ no entanto, demonstraram que a incubação de anéis aórticos com TNF- α *in vitro* bem como a infusão de TNF- α *in vivo* na mesma dose utilizada no presente estudo, provoca diminuição do relaxamento dependente do endotélio. Em adição, este efeito foi associado com a diminuição da expressão da eNOS.¹⁰⁰ De maior importância, a ação direta que o TNF- α exerce em células de músculo liso do tecido cavernoso é o aumento na expressão da fosfodiesterase 5, o que por sua vez, diminui os níveis de cGMP e favorece o fenótipo de DE.¹⁰¹ Embora isto não tenha sido diretamente demonstrado no presente estudo, esta possibilidade não deve ser excluída como um dos fatores que contribuem para a diminuição do relaxamento do tecido cavernoso.

Várias linhas de evidências sugerem que o TNF- α exerce um papel importante na indução da disfunção endotelial. Primeiro, pacientes com transplante cardíaco clinicamente estáveis exibem uma forte relação positiva entre o TNF- α plasmático e a resposta vascular diminuída para a ACh.¹⁰² Segundo, a infusão de TNF- α diminui a função endotelial em indivíduos saudáveis.¹⁰³ De maior importância para o presente estudo, os níveis de TNF- α estão aumentados no soro de pacientes com DE moderada ou severa,^{64, 71, 104} e os níveis de TNF- α e dos parâmetros pró-trombóticos endoteliais estão inversamente associados com o desempenho sexual.⁶⁴

Em células endoteliais, o TNF- α não somente induz a transcrição de genes inflamatórios, mas também a ativação de RhoA e Rho-cinase.¹⁰⁵ A ativação da Rho-cinase exerce um papel no aumento da permeabilidade das junções celulares induzido pelo TNF- α ,^{106, 107} assim como no rearranjo da actomiosina e apoptose.¹⁰⁸ De acordo, a inibição farmacológica da Rho-cinase assim como a superexpressão de um dominante negativo da RhoA, reduziram dramaticamente a permeabilidade e a apoptose das células endoteliais induzidas por TNF- α .^{106, 108} A degradação do I κ B seguido pela translocação do NF κ B para o núcleo e a ativação gênica, são eventos essenciais na sinalização induzida pelo TNF- α . A inibição da RhoA impede a ligação do NF κ B ao DNA, devido ao bloqueio da translocação do NF κ B para o núcleo, em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas pelo TNF- α .¹⁰⁹ Inibidores da Rho-cinase também bloqueiam a produção de TNF- α em monócitos estimulados por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS)¹¹⁰ e em cardiomiócitos

lesionados por queimadura.¹¹¹ Além disso, inibidores da Rho-cinase atenuam a infiltração leucocitária induzida pelo TNF- α através da inibição do rearranjo do citoesqueleto das células endoteliais¹¹² e de um efeito supressor das funções dos leucócitos polimorfonucleares e da expressão de citocinas inflamatórias.^{110, 113-115} Baseado nesse conjunto de observações os inibidores da Rho-cinase podem exercer atividade anti-inflamatória através do bloqueio das ações do TNF- α . Finalmente, TNF- α leva ao aumento da sensibilidade ao Ca^{2+} , pela ativação da via de sinalização RhoA/Rho-cinase, um mecanismo que potencialmente contribui para o aumento da reatividade das vias aéreas induzido pelo TNF- α .^{116, 117} O aumento das respostas contráteis induzido pelo TNF- α no presente estudo potencialmente pode ter sido mediado pelo aumento da via de sinalização da Rho-cinase. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi encontrada com o inibidor da Rho-cinase em animais nocautes do gene TNF- α .

Embora haja várias evidências na literatura demonstrando que o TNF- α diminui a expressão da eNOS, ainda pouco se sabe das ações do TNF- α sobre a regulação da nNOS. Contudo, tem sido demonstrado que a infusão de TNF- α induz aumento da pressão arterial média e redução na expressão da nNOS no córtex e medula renal de ratas prenhes.¹¹⁸ Do mesmo modo, a diminuição na expressão da nNOS no núcleo paraventricular de ratos com insuficiência cardíaca foi associada com o aumento dos níveis do TNF- α e de outras citocinas.¹¹⁹ Se por um lado o TNF- α parece modular a expressão da nNOS, por outro lado a nNOS diminui a expressão do TNF- α induzida pelo LPS em miócitos cardíacos de camundongos.¹²⁰ Estes resultados em conjunto fornecem uma explicação para o aumento da expressão da nNOS no corpo cavernoso de animais TNF KO, provavelmente devido a ausência da modulação negativa do TNF- α , assim como para a diminuição da expressão da nNOS observada em animais infundidos com TNF- α .

Além de exercer efeito sobre a eNOS e a nNOS o TNF- α estimula a geração vascular de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais provavelmente contribuem para a redução dos níveis de NO. As EROs são produzidas nas células por meio de várias fontes celulares: a mitocôndria é considerada a maior fonte da geração de EROs;¹²¹ em segundo a enzima NADPH oxidase.¹²² Por último existem diversas outras enzimas que geram EROs, porém, usualmente numa escala menor em relação a NADPH oxidase, tais como: lipoxigenases; ciclooxygenases; mieloperoxidases; xantina oxidase; heme oxigenase; monoamina oxidase; aldeído oxidase e enzimas relacionadas do citocromo P450.¹²³ É importante salientar que as EROs são utilizadas pelo TNF- α no processo de sinalização intracelular em condições fisiológicas.¹²³ Entretanto, em várias situações patológicas o aumento da geração de EROs engatilhado pelo TNF- α contribui para a disfunção endotelial. Em ratos, a administração de

TNF- α causa disfunção mitocondrial, principalmente, por depletar os antioxidantes mitocondriais e citosólicos de miócitos cardíacos.¹²⁴ Além disso, o aumento da expressão do TNF- α causa diminuição da vasodilatação coronariana dependente do endotélio em camundongos diabéticos. O mecanismo pelo qual isso ocorre, é devido ao aumento da geração de ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase. Contrariamente, quando os animais foram tratados com anticorpos anti-TNF- α essas alterações foram corrigidas.¹²⁵ Do mesmo modo, Zhang e colaboradores demonstraram que o TNF- α aumenta a geração de ânion superóxido pela enzima xantina oxidase, resultando na diminuição do relaxamento mediado pelo NO em artérias coronárias de suínos.¹²⁶ Especificamente, em células do músculo liso do tecido cavernoso o TNF- α não somente aumenta a geração de ânion superóxido, mas também a expressão da fosfodiesterase 5,¹⁰¹ a qual adicionalmente pode contribuir para o fenótipo de DE. Tomadas em conjunto, estas evidências sugerem a possibilidade de que o TNF- α diminui o relaxamento do corpo cavernoso por meio do aumento da geração de EROs.

Outra forma pela qual o TNF- α diminui o relaxamento é por meio da diminuição da expressão da enzima guanilato ciclase em células de músculo liso.¹²⁷ De forma intrigante, este efeito é mediado pelo aumento da expressão da enzima iNOS, e consequente geração de NO. Os autores sugerem que o aumento exacerbado de NO e do estresse oxidativo ocasionado pelo TNF- α contribui para a formação de peroxinitrito,¹²⁸ resultando na diminuição da expressão da guanilato ciclase. Browner e colaboradores demonstraram que o TNF- α diminui a expressão da PKG dependente de cGMP em células de músculo liso vascular.¹²⁹ Similarmente, a iNOS pode ser responsável pela diminuição da expressão da PKG por meio da via de sinalização NO/cGMP.¹²⁹

Enfim, considerando este conjunto de evidências é possível dizer que existem diversos mecanismos potenciais para as ações diretas do TNF- α no corpo cavernoso que agem em conjunto para diminuir o relaxamento, e portanto em detrimento da função erétil. Primeiramente, o TNF- α causa a diminuição das enzimas eNOS e nNOS responsáveis pela produção do principal mediador da ereção: o NO. Segundo, o TNF- α aumenta a geração de EROs por diversos mecanismos, o que resulta na diminuição da biodisponibilidade do NO devido ao sequestro de NO pelas EROs. Terceiro, o TNF- α não somente diminui o NO e sua biodisponibilidade, mas também provoca a redução dos efetores moleculares do NO como a guanilato ciclase e a PKG dependente de cGMP. Por último o TNF- α aumenta a expressão da fosfodiesterase 5 no corpo cavernoso, a qual adicionalmente diminui os níveis de cGMP.

Além dos efeitos do TNF- α em reduzir o relaxamento, o presente estudo também demonstra que animais infundidos com TNF- α humano apresentam aumento da contração do

tecido cavernoso. O TNF- α humano liga-se ao receptor TNFR1 e possui afinidade muito baixa ao receptor TNFR2 em camundongos.¹³⁰ Portanto, o aumento da resposta contrátil do tecido cavernoso observado no presente estudo é provavelmente mediado pelo receptor TNFR1. O aumento da sensibilidade ao Ca^{+2} no coração de animais que superexpressam o TNF- α causou melhora do desempenho contrátil cardíaco.¹³¹ Dependendo do tecido, a ligação do TNF- α no receptor TNFR1 ativa vias de sinalização que medeiam o aumento da sensibilidade ao Ca^{+2} , estas incluem a fosfolipase A_2 , MAPK, Rho-cinase, c-Jun e esfingosina-ceramida.¹³² Em células de músculo liso das vias aéreas, por exemplo, o TNF- α aumenta a sensibilidade ao Ca^{+2} por aumentar a fosforilação da cadeia leve da miosina via fosfolipase A_2 ou MAPK.¹³³ Do mesmo modo, demonstrou-se que a via de sinalização RhoA/Rho-cinase contribui para o aumento na sensibilidade ao Ca^{+2} no músculo liso das vias aéreas de cobaias e de humanos.¹¹⁶ Além disso, a enzima NADPH oxidase também parece contribuir para o aumento induzido pelo TNF- α na sensibilidade do músculo liso ao Ca^{+2} .¹³⁴ Em cultura de neurônios sensoriais o TNF- α causa ondas transitórias de Ca^{+2} e ativa a p38 e a c-Jun.¹³⁵ Por fim, a ativação do TNFR1 no coração leva a ativação da via de sinalização ceramida/esfingosina-1-fosfato, a qual provoca o aumento intracelular de Ca^{+2} devido a ativação dos receptores da rianodina.¹³⁶ Em suma, estes estudos em conjunto demonstram que o TNF- α exerce um papel importante em aumentar a sensibilidade do músculo liso ao Ca^{+2} e, portanto, para o processo de contração do músculo liso.

Diversos estudos demonstram que este aumento na sensibilidade ao Ca^{+2} , provocado pelo TNF- α , é acompanhado de aumento da contratilidade do tecido do músculo liso.¹³⁷⁻¹³⁹ Além disso, estudos conduzidos em macacos demonstraram que a infusão intra-amniótica de TNF- α provoca contrações uterinas e induz o parto prematuramente.¹⁴⁰ Com relação a vasculatura, vários estudos demonstram que a ação direta do TNF- α causa contração. Em artéria mamária interna de humanos, concentrações elevadas do TNF- α causaram contração.¹⁴¹ A infusão do TNF- α diminuiu inicialmente a resistência vascular em artérias bronquiolares de resistência em ovelhas. Contudo, a resistência aumentou e permaneceu elevada por 3 horas após o início da infusão.¹⁴² Em contraste, o TNF- α não causou nenhum efeito direto em artérias de resistência de humanos,¹⁴³ ou em arteríolas da musculatura esquelética de ratos.¹⁴⁴ Independente dos efeitos diretos sobre a vasculatura, o TNF- α também pode modular a resposta de outros agonistas vasoconstritores. No presente estudo, animais infundidos com que o TNF- α demonstraram aumento da contração para fenilefrina no tecido cavernoso. Em consonância, foi demonstrado que a infusão de TNF- α provocou o aumento da resposta contrátil de anéis aórticos à fenilefrina.¹⁰⁰

Além do aumento contrátil à fenilefrina, o corpo cavernoso dos animais infundidos com TNF- α apresentou aumento na resposta contrátil mediada por nervos simpáticos. De acordo com os dados do presente estudo, outros trabalhos demonstram que o TNF- α aumenta a ativação simpática renal e cardiovascular.¹⁴⁵ Este efeito parece ser mediado pela liberação de noradrenalina no núcleo paraventricular, no sistema nervoso central, provocado pelo TNF- α .¹⁴⁶ Além disso, o TNF- α aumentou a responsividade das vias aéreas de humanos por meio do aumento da atividade de neurônios pré-sinápticos parassimpáticos.¹⁴⁷

É interessante observar que a vasculatura peniana não somente pode ser um alvo de amplo alcance de processos inflamatórios gerados em outras regiões, mas também pode participar de forma ativa contribuindo para o processo inteiro. Neste sentido, o corpo cavernoso humano possui um sistema renina-angiotensina local.¹⁴⁸ AngII, um dos produtos finais e principal mediador desse sistema, induz lesões vasculares por diversos mecanismos, incluindo vasoconstrição, crescimento celular, produção de estresse oxidativo e inflamação.¹⁴⁹ De maneira similar, as células do músculo liso peniano não somente respondem, mas também sintetizam ET-1, a enzima conversora (ECE-1) e ambos os subtipos de receptores ET_A e ET_B.¹⁵⁰ ET-1 induz vasoconstrição, estimula a expressão de moléculas de adesão e ativa fatores de transcrição responsáveis pelo aumento coordenado na expressão de várias citocinas e enzimas, as quais podem por sua vez levar à produção de mediadores inflamatórios.^{151, 152} Ambos peptídeos aumentam os níveis de TNF- α , que por sua vez, também regula positivamente a liberação desses peptídeos vasoativos.¹⁵³⁻¹⁵⁶ No presente estudo foi observado que o TNF- α aumenta a resposta contrátil do tecido cavernoso à ET-1 e a expressão de receptores ET_A. De fato, a incubação de células endoteliais com TNF- α aumenta a transcrição¹⁵³ e a secreção de ET-1.¹⁵⁷ Em adição, após a infusão de TNF- α foi observado aumento dos níveis e da vasoconstrição à ET-1 na artéria coronária de ratos.¹⁵⁸ Este efeito foi corrigido pela administração de um antagonista do receptor ET_A.¹⁵⁸

Este conjunto de evidências sugere que o TNF- α age diretamente na musculatura lisa do tecido cavernoso e determina o aumento das respostas contráteis deste tecido a outros agonistas.

Além das ações diretas que o TNF- α pode exercer no corpo cavernoso, esta citocina também é capaz de provocar mudanças humorais que favorecem o aparecimento da DE. A população de macrófagos residentes no testículo ocupa cerca de 20% da população celular total dos espaços intersticiais.¹⁵⁹ Estes macrófagos encontram-se em associação íntima com as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, e influenciam diretamente as suas funções.¹⁶⁰ Os macrófagos intersticiais do testículo podem secretar diversos fatores que

regulam a esteroidogênese das células de Leydig. Quase todos estes fatores são inibitórios, incluindo o NO, a IL-1 e o TNF- α .¹⁶¹ Inúmeros estudos *in vitro* com células de Leydig demonstraram que o TNF- α diminui a síntese de testosterona.¹⁶²⁻¹⁶⁶ Além disso, Morales e colaboradores demonstraram que a aplicação do TNF- α intratesticular previne a produção de testosterona tanto no estado basal quanto após a estimulação com a gonadotrofina coriônica humana e identificaram a proteína regulatória da esteroidogênese aguda (StAR) como o alvo de ação inibitória desta citocina sob condições *in vivo*.¹⁶⁷ Portanto, a produção exacerbada do TNF- α por macrófagos intratesticulares em condições patológicas poderia levar à diminuição de testosterona causando hipogonadismo e consequentemente a DE. De fato, evidências demonstram que o hipogonadismo secundário a hiperprolactinemia é devido a supressão da produção de testosterona pelo TNF- α .¹⁶⁸ Portanto, estes dados ilustram que o TNF- α provoca a alteração de mecanismos humorais, e que estes, potencialmente contribuem para os efeitos deletérios sobre a função erétil observados no presente estudo.

Stalder e colaboradores¹⁶⁹ desenvolveram um modelo de camundongo transgênico que superexpressa o TNF- α apenas em astrócitos no cérebro. Estes autores descreveram o desfecho crônico da resposta inflamatória no cérebro destes animais. Aos 4 meses de idade os animais começaram a exibir paraparesia, a qual progrediu para paralisia total dos membros inferiores e morte após 2 meses do início dos sinais de paraparesia. Similarmente, Hayward e colaboradores,¹⁷⁰ desenvolveram um modelo de camundongo transgênico que superexpressa TNF- α . Neste animais eles realizaram o teste de Irwin, o qual descreve observações divididas em 4 categorias: características físicas, respostas autonômicas, respostas comportamentais e respostas neurológicas. Entre 45 observações conduzidas apenas 5 delas foram diferentes entre os animais transgênicos e o grupo controle. Os animais transgênicos apresentaram redução do peso corporal, redução na força de segurar um dado objeto, foram incapazes de agarrar um fio e a posição da cauda era menos elevada do que em animais controle.¹⁷⁰ Neste sentido, considerando que no atual estudo os animais foram infundidos com TNF- α por 14 dias é improvável que as alterações funcionais no tecido cavernoso sejam devido as ações centrais do TNF- α . Além disso, é importante enfatizar que os níveis de TNF- α se elevaram apenas levemente, o que dificultaria a hipótese de ações centrais do TNF- α no presente estudo. Juntamente, o peso corporal dos animais infundidos não foi diferente do grupo controle, fato crucial dada a importância do TNF- α como agente causador de caquexia. Suporte adicional a esta idéia é o fato de que embora o TNF- α cruze a barreira hematoencefálica, o sistema de transporte é saturável.¹⁷¹

Tradicionalmente, acredita-se que a DE seja o desfecho de doenças vasculares sistêmicas que ocorre como uma consequência tardia da aterosclerose. Pesquisas recentes e dados clínicos que estão emergindo demonstram que o território vascular peniano pode ser um indicador sensível e agudo da disfunção endotelial sistêmica e disfunção do músculo liso. A associação entre a presença de mediadores inflamatórios e um estado pró-trombótico endotelial de um lado e a DE do outro, em pacientes com ou sem doença coronariana tem sido revisada.⁷¹ Inúmeros estudos epidemiológicos demonstram que a DE é altamente prevalente em homens com fatores de risco cardiovascular como o diabetes,^{172, 173} hipertensão,¹⁷⁴ dislipidemia,^{175, 176} tabagismo,¹⁷⁷ obesidade e estilo de vida sedentário.^{34, 125, 178} Estas condições estão todas associadas com o aumento na incidência de DE e nos níveis de citocinas. Recentemente, Zhang e colaboradores demonstraram o papel pró-aterogênico substancial do TNF- α ,¹⁷⁹ onde a presença do receptor TNFR-1 na parede vascular contribui para o desenvolvimento de aterosclerose.¹⁷⁹

Neste sentido, acredita-se que a deposição excessiva de componentes da matriz extracelular produzidos pelo fenótipo sintético das células de músculo liso na camada íntima dos vasos seja um dos fatores patológicos mais importantes na aterosclerose. No presente estudo foi demonstrado que o tecido cavernoso de animais TNF KO apresenta aumento na expressão de colágeno. Este resultado está em acordo com os resultados de Hiraga e colaboradores,¹⁸⁰ os quais demonstraram que o TNF- α diminui a síntese de colágeno em células de músculo liso, especialmente o colágeno do tipo IV e V. Embora acredite-se que a célula de músculo liso seja um dos tipos de células na qual a síntese de colágeno é fortemente inibida pelo TNF- α ,¹⁸⁰ efeitos indiretos, inespecíficos ou de mecanismo compensatório produzidos pelo nocaute de TNF- α não podem ser descartados no presente estudo.

Considerando que mudanças na composição de fibras elásticas e no tipo de colágeno alteram as propriedades mecânicas do pênis, o aumento do conteúdo de colágeno observado no corpo cavernoso dos animais TNF KO poderia indicar um estado fibrótico com redução na elasticidade e complacência do tecido, a qual por sua vez, levaria a diminuição da função erétil. Considerando isto, experimentos foram conduzidos para avaliar as propriedades de relaxamento espontâneo do tecido cavernoso após a distensão mecânica. De forma intrigante, o tecido cavernoso dos animais TNF KO apresentou maior relaxamento que o de animais do grupo controle. Embora seja difícil conciliar esta aparente discrepância, deve-se observar que os colágenos tipo I, III e IV são as isoformas predominantes no corpo cavernoso.¹⁸¹ O colágeno tipo I, o qual forma bandas fibrilares rígidas, é menos complacente do que o colágeno III, que se encontra predominantemente em tecidos elásticos e distensíveis e é

essencial para a força de tensão normal.¹⁸¹ Baseado nessas informações, pode-se especular que a discrepância observada no presente estudo pode ser em função de mudanças entre a razão da expressão de colágeno tipo I e III, as quais diminuiriam o impacto causado pelo aumento na expressão de colágeno sobre a contratilidade do tecido cavernoso.

Outro fator que deve ser levado em consideração é que o tecido cavernoso de animais TNF KO apresentou aumento no conteúdo de elastina, o qual pode contribuir para o aumento de elasticidade do tecido cavernoso, e desta forma, contrapor o aumento de rigidez provocado pelo maior conteúdo de colágeno. A importância da elastina no tecido cavernoso pode ser ilustrada pelo fato de que a sua expressão encontra-se diminuída no corpo cavernoso de pacientes com DE.¹⁸²

Se por um lado a expressão de elastina e colágeno é importante para manter a complacência e a distensibilidade do corpo cavernoso, do outro, a expressão de células do músculo liso é crucial para o mecanismo de venoclusão durante a ereção.¹⁸³ Em geral, a disfunção venoclusiva é correlacionada com a diminuição no percentual de células de músculo liso no corpo cavernoso de pacientes humanos, o que resulta em DE.¹⁸³ Considerando os resultados de aumento no relaxamento e na deposição de colágeno no tecido cavernoso de animais TNF KO, alguém poderia questionar se estes resultados são apenas uma consequência da perda de células de músculo liso no tecido cavernoso. Contudo, os resultados do presente estudo demonstram que não existe diferença entre a expressão de células de músculo liso nem no percentual da área total ocupada pelas células de músculo liso no corpo cavernoso de animais TNF KO e controle. Portanto, estes resultados sugerem que o aumento no relaxamento do corpo cavernoso de animais TNF KO se deve não somente ao conjunto de mudanças nas propriedades mecânicas do tecido, mas principalmente nos mecanismos intracelulares responsáveis pelo controle do tônus do músculo liso e que são influenciados pelas ações do TNF- α .

O conjunto de resultados *in vitro* do presente estudo sugere que o TNF- α favorece a detumescência. Por outro lado, a sua ausência seria acompanhada de facilitação e/ou aumento na tumescência. De fato, animais nocautes do gene TNF- α apresentaram aumento do número de ereções espontâneas, confirmando que os resultados observados *in vitro* são traduzidos em melhora da função erétil *in vivo*. De acordo com os resultados do presente estudo, Hayward e colaboradores¹⁷⁰ demonstraram que camundongos que superexpressam o TNF- α humano apresentam diminuição do número de ereções induzidas, do número de intromissões e do comportamento copulatório.¹⁷⁰

Se a hipótese do presente estudo estiver correta um dos seus corolários é de que a DE estaria presente em situações clínicas onde os níveis de TNF- α encontram-se elevados. De fato, diversas situações clínicas que se manifestam com níveis aumentados de TNF- α têm sido associadas com a DE em homens e disfunção sexual em mulheres, tais como: psoríase,¹⁸⁴ artrite psoriática,¹⁸⁵ artrite reumatoide,¹⁸⁶ espondilite anquilosante¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ e doença pulmonar obstrutiva crônica.¹⁰⁴ Pacientes com estas condições, em geral, apresentam diminuição da libido, frequência de coito, mudanças negativas no desempenho sexual e insatisfação geral relacionada com a função sexual.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Além dessas alterações, diversos outros fatores orgânicos e psíquicos também contribuem para DE e para as disfunções sexuais de uma forma geral em condições reumatológicas, entre estes incluem: a depressão, a diminuição da autoestima, dores articulares e o medo antecipatório relacionado ao desempenho sexual.¹⁹⁰⁻¹⁹³ A diminuição da tolerância ao exercício físico é listada como uma das principais limitações em pacientes com doenças reumáticas para a prática sexual, contribuindo para a DE e a insatisfação no desempenho sexual. Contudo, não existem evidências que claramente demonstrem que esta limitação seja o agente causal da DE nestas condições. Embora estas evidências sugiram que o TNF- α pode exercer um papel crucial para o desenvolvimento da DE e de outras disfunções sexuais em humanos, por outro lado, é importante observar que o TNF- α não está sozinho na lista de citocinas que estão alteradas nestas condições e, provavelmente uma miríade de efeitos deve coexistir contribuindo para DE.

Outro corolário que surge da hipótese do presente estudo é a de que drogas que normalizem os níveis de TNF- α seriam eficazes no tratamento de pacientes com DE que tenham os níveis elevados de TNF- α . Até o presente momento, apenas um estudo avaliou os efeitos da terapia com inibidores do TNF- α sobre a função erétil.¹⁹⁴ Neste estudo pacientes com espondilite anquilosante (entre 29 e 48 anos) foram tratados durante 3 meses com bloqueadores do TNF- α . Pelo menos cinco fatores pertinentes à disfunção erétil foram avaliados por meio do questionário denominado de Índice Internacional da Função Erétil (*International Index of Erectile Function, IIEF*) antes e após o tratamento, sendo eles: 1) função erétil; 2) satisfação durante o intercuro; 3) função orgásmica; 4) desejo sexual e a 5) satisfação geral. Entre os pacientes com DE o tratamento com bloqueadores do TNF- α melhorou a função erétil, a satisfação durante o intercuro e o desejo sexual.¹⁹⁴ Outros estudos experimentais presentes na literatura sugerem diversos benefícios dos bloqueadores de TNF- α no sistema cardiovascular em animais com hipertensão. Como exemplo, a inibição do TNF- α diminui a progressão da hipertensão e dos danos renais na hipertensão induzida pela AngII¹⁹⁵

assim como na hipertensão mineralocorticóide,¹⁹⁶ um modelo onde ET-1 exerce um papel primordial nas lesões de órgãos-alvo.^{151, 152} Nos animais hipertensos DOCA-sal, o bloqueio das ações do TNF- α pelo tratamento com etanercept reduz vários índices do processo inflamatório renal independente de quaisquer efeitos na pressão arterial. Além disso, a inibição do TNF- α reduziu a excreção da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), diminuiu a atividade do NF κ B e a expressão de ICAM-1 no córtex renal, assim como os níveis de ET-1 excretados na urina. Por fim, ratas com deficiência de estrógeno tratadas com receptor solúvel de TNF- α tiveram aumento da modulação vascular do NO, da eNOS e diminuição da NADPH oxidase em artérias mesentéricas.¹⁹⁷

Em resumo, o conjunto de evidências do presente estudo demonstra o papel importante que o TNF- α exerce em várias doenças cardiovasculares, provavelmente como um fator ativo em determinar a disfunção endotelial e induzir o aumento de várias outras substâncias que também exercem controle direto sobre o endotélio e o tônus do músculo liso vascular e do corpo cavernoso. Considerando isto, neste caso o desenvolvimento da DE não seria meramente a consequência das ações sistêmicas do TNF- α , mas o conjunto orquestrado de ações diretas e indiretas no corpo cavernoso, humorais, sistêmicas, e no sistema nervoso central. Além de apontar o TNF- α como um possível agente causador da DE, o presente estudo corrobora os dados recentes da literatura que mostram a associação da DE com doenças cardiovasculares. Mais importante é o fato que a DE representa um quadro de alerta, uma vez que esta é um forte preditor de eventos cardíacos. Portanto, identificar o papel do TNF- α como um agente causal na DE é de extrema importância não só por fornecer uma ligação humoral entre doenças cardiovasculares e DE, mas também porque terapias que visam à redução desta citocina encontram-se atualmente disponíveis.

REFERÊNCIAS*

- [1] Benagiano G, Carrara S, Filippi V. Sex and reproduction: an evolving relationship. Hum Reprod Update. 2010;16:96-107.
- [2] Seidman S, Fischer N, Meeks C. Introducing the new sexuality studies : original essays and interviews. London ; New York: Routledge; 2007.
- [3] Wincze JP, Carey MP. Sexual dysfunction : a guide for assessment and treatment. 2nd ed. New York: Guilford Press; 2001.
- [4] Masters WH, Johnson VE, Reproductive Biology Research Foundation (U.S.). Human sexual response. Boston: Little, Brown; 1966.
- [5] Kaplan H. The new sex therapy active treatment of sexual dysfunctions. New York: Brunner/Mazel 1974.
- [6] Eardley I. Erectile dysfunction : current investigation and management. 2nd ed. London: Mosby; 2003.
- [7] Breza J, Aboseif SR, Orvis BR, Lue TF, Tanagho EA. Detailed anatomy of penile neurovascular structures: surgical significance. J Urol. 1989;141:437-43.
- [8] Lue TF, Takamura T, Schmidt RA, Palubinskas AJ, Tanagho EA. Hemodynamics of erection in the monkey. J Urol. 1983;130:1237-41.
- [9] Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. Biol Reprod. 1995;52:485-9.
- [10] Andersson KE. Pharmacology of penile erection. Pharmacol Rev. 2001;53:417-50.
- [11] Andersson KE, Stief CG. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. World J Urol. 1997;15:14-20.
- [12] Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. Biochem Biophys Res Commun. 1990;170:843-50.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 may 22].

- [13] Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*. 1992;326:90-4.
- [14] Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, et al. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med*. 1996;2:288-96.
- [15] Alm P, Larsson B, Ekblad E, Sundler F, Andersson KE. Immunohistochemical localization of peripheral nitric oxide synthase-containing nerves using antibodies raised against synthesized C- and N-terminal fragments of a cloned enzyme from rat brain. *Acta Physiol Scand*. 1993;148:421-9.
- [16] Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol*. 1993;150:73-6.
- [17] Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*. 1995;282:109-16.
- [18] Leite R, Giachini FR, Carneiro FS, Nunes KP, Tostes RC, Webb RC. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*. 2007;2:119-32.
- [19] Priviero FB, Leite R, Webb RC, Teixeira CE. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28:751-5.
- [20] Chitaley K, Webb RC, Dorrance AM, Mills TM. Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res*. 2001;13 Suppl 5:S16-20.
- [21] Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV. RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem*. 2002;277:30614-21.
- [22] Chitaley K, Webb RC, Mills TM. Rho-kinase as a potential target for the treatment of erectile dysfunction. *Drug News Perspect*. 2001;14:601-6.
- [23] Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9121-6.
- [24] Rajasekaran M, White S, Baquir A, Wilkes N. Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male Brown-Norway rats. *J Androl*. 2005;26:182-8.
- [25] Seftel A. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *J Urol*. 2005;173:928-9.

- [26] Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction. *FASEB J*. 2006;20:536-8.
- [27] Park K, Kim SW, Rhu KS, Paick JS. Chronic administration of an oral Rho kinase inhibitor prevents the development of vasculogenic erectile dysfunction in a rat model. *J Sex Med*. 2006;3:996-1003.
- [28] Kobayashi N, Nakano S, Mita S, et al. Involvement of Rho-kinase pathway for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and cardiovascular remodeling in hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:459-66.
- [29] Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P. RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1051-6.
- [30] Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2005;28:925-36.
- [31] Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, et al. Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1831-6.
- [32] Hatzimouratidis K, Hatzichristou D. Sexual dysfunctions: classifications and definitions. *J Sex Med*. 2007;4:241-50.
- [33] NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA*. 1993;270:83-90.
- [34] Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*. 1994;151:54-61.
- [35] Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*. 1999;84:50-6.
- [36] Abdo CH, Oliveira WM, Jr., Scanavino Mde T, Martins FG. [Erectile dysfunction: results of the Brazilian Sexual Life Study]. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52:424-9.
- [37] Martins FG, Abdo CH. Erectile dysfunction and correlated factors in Brazilian men aged 18-40 years. *J Sex Med*. 2010;7:2166-73.

- [38] Moreira ED, Jr., Lisboa Lobo CF, Villa M, Nicolosi A, Glasser DB. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. *Int J Impot Res*. 2002;14 Suppl 2:S3-9.
- [39] Moreira ED, Jr., Abdo CH, Torres EB, Lobo CF, Fittipaldi JA. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. *Urology*. 2001;58:583-8.
- [40] Moreira ED, Jr., Bestane WJ, Bartolo EB, Fittipaldi JA. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2002;120:49-54.
- [41] Reis MM, Abdo CH. Prevalence of erectile dysfunction as defined by the International Index of Erectile Function (IIEF) and self-reported erectile dysfunction in a sample of Brazilian men who consider themselves healthy. *J Sex Marital Ther*. 2010;36:87-100.
- [42] Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, et al. Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med*. 2000;30:328-38.
- [43] Moreira ED, Jr., Lbo CF, Diament A, Nicolosi A, Glasser DB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. *Urology*. 2003;61:431-6.
- [44] Min JK, Williams KA, Okwuosa TM, Bell GW, Panutich MS, Ward RP. Prediction of coronary heart disease by erectile dysfunction in men referred for nuclear stress testing. *Arch Intern Med*. 2006;166:201-6.
- [45] Shabsigh R, Fishman IJ, Schum C, Dunn JK. Cigarette smoking and other vascular risk factors in vasculogenic impotence. *Urology*. 1991;38:227-31.
- [46] Hodges LD, Kirby M, Solanki J, O'Donnell J, Brodie DA. The temporal relationship between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Int J Clin Pract*. 2007;61:2019-25.
- [47] Montorsi F, Briganti A, Salonia A, et al. Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol*. 2003;44:360-4; discussion 64-5.
- [48] Kloner RA, Mullin SH, Shook T, et al. Erectile dysfunction in the cardiac patient: how common and should we treat? *J Urol*. 2003;170:S46-50; discussion S50.
- [49] Solomon H, Man JW, Wierzbicki AS, Jackson G. Relation of erectile dysfunction to angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2003;91:230-1.
- [50] Akilli H, Gok H, Soyulu A, Kayrak M. Severity of coronary artery disease and symptoms of erectile dysfunction in males with a positive exercise treadmill test. *Int J Urol*. 2007;14:733-7.

- [51] Greenstein A, Chen J, Miller H, Matzkin H, Villa Y, Braf Z. Does severity of ischemic coronary disease correlate with erectile function? *Int J Impot Res*. 1997;9:123-6.
- [52] Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, et al. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. *Eur Heart J*. 2006;27:2632-9.
- [53] Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, et al. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res*. 1999;43:658-65.
- [54] Montorsi P, Montorsi F, Schulman CC. Is erectile dysfunction the "tip of the iceberg" of a systemic vascular disorder? *Eur Urol*. 2003;44:352-4.
- [55] Kirby M, Jackson G, Simonsen U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int J Clin Pract*. 2005;59:225-9.
- [56] Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moinpour CM, Coltman CA. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. *JAMA*. 2005;294:2996-3002.
- [57] Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the minority health institute expert advisory panel. *J Sex Med*. 2005;2:40-50; discussion 50-2.
- [58] Ponholzer A, Temml C, Obermayr R, Wehrberger C, Madersbacher S. Is erectile dysfunction an indicator for increased risk of coronary heart disease and stroke? *Eur Urol*. 2005;48:512-8; discussion 17-8.
- [59] Grover SA, Lowensteyn I, Kaouache M, et al. The prevalence of erectile dysfunction in the primary care setting: importance of risk factors for diabetes and vascular disease. *Arch Intern Med*. 2006;166:213-9.
- [60] Jackson G. The metabolic syndrome and erectile dysfunction: multiple vascular risk factors and hypogonadism. *Eur Urol*. 2006;50:426-7.
- [61] Heidler S, Temml C, Broessner C, et al. Is the metabolic syndrome an independent risk factor for erectile dysfunction? *J Urol*. 2007;177:651-4.
- [62] Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112:375-84.
- [63] Giugliano F, Esposito K, Di Palo C, et al. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J Endocrinol Invest*. 2004;27:665-9.

- [64] Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, et al. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2006;27:2640-8.
- [65] Sullivan ME, Miller MA, Bell CR, et al. Fibrinogen, lipoprotein (a) and lipids in patients with erectile dysfunction. A preliminary study. *Int Angiol*. 2001;20:195-9.
- [66] Billups KL, Kaiser DR, Kelly AS, et al. Relation of C-reactive protein and other cardiovascular risk factors to penile vascular disease in men with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2003;15:231-6.
- [67] Bocchio M, Desideri G, Scarpelli P, et al. Endothelial cell activation in men with erectile dysfunction without cardiovascular risk factors and overt vascular damage. *J Urol*. 2004;171:1601-4.
- [68] Chiurlia E, D'Amico R, Ratti C, Granata AR, Romagnoli R, Modena MG. Subclinical coronary artery atherosclerosis in patients with erectile dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1503-6.
- [69] Esposito K, Giugliano F, Martedì E, et al. High proportions of erectile dysfunction in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2005;28:1201-3.
- [70] Eaton CB, Liu YL, Mittleman MA, Miner M, Glasser DB, Rimm EB. A retrospective study of the relationship between biomarkers of atherosclerosis and erectile dysfunction in 988 men. *Int J Impot Res*. 2007;19:218-25.
- [71] Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: common links. *Eur Urol*. 2007;52:1590-600.
- [72] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:3666-70.
- [73] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487-501.
- [74] Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11:372-7.
- [75] Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest*. 1992;90:693-8.
- [76] Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995;96:1042-52.

- [77] Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med*. 1990;171:35-47.
- [78] Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996;334:1717-25.
- [79] Ruddle NH, Waksman BH. Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity. *Science*. 1967;157:1060-2.
- [80] Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*. 1996;12:1-9.
- [81] Gaeta ML, Johnson DR, Kluger MS, Pober JS. The death domain of tumor necrosis factor receptor 1 is necessary but not sufficient for Golgi retention of the receptor and mediates receptor desensitization. *Lab Invest*. 2000;80:1185-94.
- [82] Amrani Y, Ammit AJ, Panettieri RA, Jr. Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol*. 2001;60:646-55.
- [83] Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, et al. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients. *FEBS Lett*. 1995;376:24-30.
- [84] Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation*. 1995;92:1487-93.
- [85] Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;84:299-308.
- [86] Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*. 1995;269:1424-7.
- [87] Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*. 2001;20:6482-91.
- [88] Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*. 1995;81:513-23.
- [89] Park YC, Ye H, Hsia C, et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell*. 2000;101:777-87.

- [90] Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol*. 2001;70:317-25.
- [91] Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.
- [92] Rampin O, Jerome N, Suaudeau C. Proerectile effects of apomorphine in mice. *Life Sci*. 2003;72:2329-36.
- [93] Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: a double facet cytokine. *Cardiovasc Res*. 1998;37:554-9.
- [94] Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, et al. Human myocardial tissue TNFalpha expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:1683-9.
- [95] Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:93-109; discussion 09-11.
- [96] Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:695-701.
- [97] Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279:963-9.
- [98] Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:L452-9.
- [99] Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*. 1993;73:205-9.
- [100] Zemse SM, Chiao CW, Hilgers RH, Webb RC. Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF-alpha on the endothelium of murine aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1160-7.
- [101] Hotston MR, Jeremy JY, Bloor J, Koupparis A, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the up-regulation of phosphodiesterase type 5 elicited with nicotine and tumour necrosis factor-alpha in cavernosal vascular smooth muscle cells: mediation by superoxide. *BJU Int*. 2007;99:612-8.
- [102] Holm T, Aukrust P, Andreassen AK, et al. Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: possible role of proinflammatory cytokines. *Clin Transplant*. 2000;14:218-25.

- [103] Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*. 1997;96:3042-7.
- [104] Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Ceylan E, Cildag O. Correlates of erectile dysfunction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respirology*. 2007;12:248-53.
- [105] Mong PY, Petruccio C, Kaufman HL, Wang Q. Activation of Rho kinase by TNF- α is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2008;180:550-8.
- [106] Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, Garcia JG, Verin AD. The role of the microtubules in tumor necrosis factor- α -induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:574-81.
- [107] McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- α -induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol*. 2007;213:221-8.
- [108] Petrache I, Crow MT, Neuss M, Garcia JG. Central involvement of Rho family GTPases in TNF- α -mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:244-9.
- [109] Hippenstiel S, Schmeck B, Seybold J, Krull M, Eichel-Streiber C, Suttorp N. Reduction of tumor necrosis factor- α (TNF- α) related nuclear factor- κ B (NF- κ B) translocation but not inhibitor κ -B ($\text{I}\kappa$ B)-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:971-7.
- [110] Doe C, Bentley R, Behm DJ, et al. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320:89-98.
- [111] Horton JW, Maass DL, Ballard-Croft C. Rho-associated kinase modulates myocardial inflammatory cytokine responses. *Shock*. 2005;24:53-8.
- [112] Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, et al. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol*. 2006;79:923-31.
- [113] Kawaguchi A, Ohmori M, Fujimura A. Partial protective effect of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;493:167-71.
- [114] Shiotani S, Shimada M, Suehiro T, et al. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transplantation*. 2004;78:375-82.
- [115] Tasaka S, Koh H, Yamada W, et al. Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32:504-10.

- [116] Hunter I, Cobban HJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumor necrosis factor- α -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca^{2+} -sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 2003;63:714-21.
- [117] Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. EET displays anti-inflammatory effects in TNF- α stimulated human bronchi: putative role of CPI-17. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:192-201.
- [118] Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens*. 2002;15:170-5.
- [119] Guggilam A, Patel KP, Haque M, Ebenezer PJ, Kapusta DR, Francis J. Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:625-34.
- [120] Geoghegan-Morphet N, Burger D, Lu X, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2007;75:408-16.
- [121] Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*. 1975;54:311-4.
- [122] Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:1239-53.
- [123] Morgan MJ, Liu ZG. Reactive oxygen species in TNF α -induced signaling and cell death. *Mol Cells*. 2010;30:1-12.
- [124] Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF- α -induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2726-37.
- [125] Gao X, Belmadani S, Picchi A, et al. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. *Circulation*. 2007;115:245-54.
- [126] Zhang C, Hein TW, Wang W, Ren Y, Shipley RD, Kuo L. Activation of JNK and xanthine oxidase by TNF- α impairs nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40:247-57.
- [127] Wu BN, Chen CW, Liou SF, Yeh JL, Chung HH, Chen IJ. Inhibition of proinflammatory tumor necrosis factor- α -induced inducible nitric-oxide synthase by xanthine-based 7-[2-[4-(2-chlorobenzene)piperazinyl]ethyl]-1,3-dimethylxanthine (KMUP-1) and 7-[2-[4-(4-nitrobenzene)piperazinyl]ethyl]-1, 3-dimethylxanthine (KMUP-3) in rat trachea: The involvement of soluble guanylate cyclase and protein kinase G. *Mol Pharmacol*. 2006;70:977-85.

- [128] Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:1360-7.
- [129] Browner NC, Sellak H, Lincoln TM. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase expression by inflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C88-96.
- [130] Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, et al. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2830-4.
- [131] Pinz I, Wax SD, Anderson P, Ingwall JS. Low over-expression of TNFalpha in the mouse heart increases contractile performance via TNFR1. *J Cell Biochem*. 2008;105:99-107.
- [132] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296:1634-5.
- [133] Parris JR, Cobban HJ, Littlejohn AF, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumour necrosis factor-alpha activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. *J Physiol*. 1999;518(Pt 2):561-9.
- [134] Thabut G, El-Benna J, Samb A, et al. Tumor necrosis factor-alpha increases airway smooth muscle oxidants production through a NADPH oxidase-like system to enhance myosin light chain phosphorylation and contractility. *J Biol Chem*. 2002;277:22814-21.
- [135] Pollock J, McFarlane SM, Connell MC, et al. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology*. 2002;42:93-106.
- [136] Scott RH, Pollock J, Ayar A, Thatcher NM, Zehavi U. Synthesis and use of caged sphingolipids. *Methods Enzymol*. 2000;312:387-400.
- [137] Morin C, Rousseau E. Enhanced Ca²⁺ sensitivity in hyperresponsive cultured bronchi is mediated by TNFalpha and NF-kappaB. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:1029-41.
- [138] Pennings HJ, Kramer K, Bast A, Buurman WA, Wouters EF. Tumour necrosis factor-alpha induces hyperreactivity in tracheal smooth muscle of the guinea-pig in vitro. *Eur Respir J*. 1998;12:45-9.
- [139] Murray DR, Freeman GL. Tumor necrosis factor-alpha induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res*. 1996;78:154-60.
- [140] Sadowsky DW, Adams KM, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Preterm labor is induced by intraamniotic infusions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha but not by interleukin-6 or interleukin-8 in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:1578-89.

- [141] Iversen PO, Nicolaysen A, Kvernebo K, Benestad HB, Nicolaysen G. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflugers Arch.* 1999;439:93-100.
- [142] Wagner EM. TNF-alpha induced bronchial vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H946-51.
- [143] Pickkers P, Netea MG, van der Meer JW, Smits P. TNFalpha and IL-1beta exert no direct vasoactivity in human isolated resistance arteries. *Cytokine.* 2002;20:244-6.
- [144] Glembot TM, Britt LD, Hill MA. Endotoxin interacts with tumor necrosis factor-alpha to induce vasodilation of isolated rat skeletal muscle arterioles. *Shock.* 1996;5:251-7.
- [145] Zhang ZH, Wei SG, Francis J, Felder RB. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R916-27.
- [146] Zhang ZH, Felder RB. Hypothalamic corticotrophin-releasing factor and norepinephrine mediate sympathetic and cardiovascular responses to acute intracarotid injection of tumour necrosis factor-alpha in the rat. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:978-87.
- [147] Anticevich SZ, Hughes JM, Black JL, Armour CL. Induction of human airway hyperresponsiveness by tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Pharmacol.* 1995;284:221-5.
- [148] Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG. Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol.* 1997;157:1920-5.
- [149] Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H435-46.
- [150] Granchi S, Vannelli GB, Vignozzi L, et al. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:1053-64.
- [151] Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005;43:19-29.
- [152] Tostes RC, Muscara MN. Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5:287-301.
- [153] Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol.* 1992;262:C854-61.
- [154] Ferreri NR, Zhao Y, Takizawa H, McGiff JC. Tumor necrosis factor-alpha-angiotensin interactions and regulation of blood pressure. *J Hypertens.* 1997;15:1481-4.

- [155] Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Ling Y, Fallon MB. ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G294-303.
- [156] Kagawa T, Takao T, Horino T, et al. Angiotensin II receptor blocker inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton)*. 2008;13:309-15.
- [157] Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26 Suppl 3:S56-8.
- [158] Klemm P, Warner TD, Hohlfeld T, Corder R, Vane JR. Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2691-5.
- [159] Hutson JC. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol*. 1994;149:99-143.
- [160] Hutson JC. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:1-7.
- [161] Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol*. 2002;57:3-18.
- [162] Mauduit C, Hartmann DJ, Chauvin MA, Revol A, Morera AM, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin action in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Endocrinology*. 1991;129:2933-40.
- [163] Xiong Y, Hales DB. The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 1993;132:2438-44.
- [164] Li X, Youngblood GL, Payne AH, Hales DB. Tumor necrosis factor-alpha inhibition of 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase gene (Cyp17) expression. *Endocrinology*. 1995;136:3519-26.
- [165] Mauduit C, Gasnier F, Rey C, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology*. 1998;139:2863-8.
- [166] Budnik LT, Jahner D, Mukhopadhyay AK. Inhibitory effects of TNF alpha on mouse tumor Leydig cells: possible role of ceramide in the mechanism of action. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;150:39-46.
- [167] Morales V, Santana P, Diaz R, et al. Intratesticular delivery of tumor necrosis factor-alpha and ceramide directly abrogates steroidogenic acute regulatory protein expression and Leydig cell steroidogenesis in adult rats. *Endocrinology*. 2003;144:4763-72.

- [168] Huang WJ, Yang LY, Pu HF, Tsai YT, Wang PS. The Effects of Anti-TNF-alpha Antibody on Hyperprolactinemia-Related Suppression of hCG-Induced Testosterone Release in Male Rats. *J Sex Med.* 2010.
- [169] Stalder AK, Carson MJ, Pagenstecher A, et al. Late-onset chronic inflammatory encephalopathy in immune-competent and severe combined immune-deficient (SCID) mice with astrocyte-targeted expression of tumor necrosis factor. *Am J Pathol.* 1998;153:767-83.
- [170] Hayward MD, Jones BK, Saparov A, et al. An extensive phenotypic characterization of the hTNFalpha transgenic mice. *BMC Physiol.* 2007;7:13.
- [171] Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol.* 1993;47:169-76.
- [172] Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB. Sexual function in men older than 50 years of age: results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med.* 2003;139:161-8.
- [173] Moulik PK, Hardy KJ. Hypertension, anti-hypertensive drug therapy and erectile dysfunction in diabetes. *Diabet Med.* 2003;20:290-3.
- [174] Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens.* 1999;12:271-5.
- [175] Wei M, Macera CA, Davis DR, Hornung CA, Nankin HR, Blair SN. Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol as important predictors of erectile dysfunction. *Am J Epidemiol.* 1994;140:930-7.
- [176] Musicki B, Liu T, Strong T, et al. Low-fat diet and exercise preserve eNOS regulation and endothelial function in the penis of early atherosclerotic pigs: a molecular analysis. *J Sex Med.* 2008;5:552-61.
- [177] Tostes RC, Carneiro FS, Lee AJ, et al. Cigarette smoking and erectile dysfunction: focus on NO bioavailability and ROS generation. *J Sex Med.* 2008;5:1284-95.
- [178] Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB. Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology.* 2000;56:302-6.
- [179] Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, et al. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1087-94.
- [180] Hiraga S, Kaji T, Ueda Y, et al. Modulation of collagen synthesis by tumor necrosis factor alpha in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 2000;66:235-44.

- [181] Luangkhot R, Rutchik S, Agarwal V, Puglia K, Bhargava G, Melman A. Collagen alterations in the corpus cavernosum of men with sexual dysfunction. *J Urol*. 1992;148:467-71.
- [182] Akkus E, Carrier S, Baba K, et al. Structural alterations in the tunica albuginea of the penis: impact of Peyronie's disease, ageing and impotence. *Br J Urol*. 1997;79:47-53.
- [183] Nehra A, Goldstein I, Pabby A, et al. Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. *J Urol*. 1996;156:1320-9.
- [184] Ermertcan AT. Sexual dysfunction in dermatological diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23:999-1007.
- [185] Aguirre MA, Velez A, Romero M, Collantes E. Gynecomastia and sexual impotence associated with methotrexate treatment. *J Rheumatol*. 2002;29:1793-4.
- [186] Blake DJ, Maisiak R, Koplan A, Alarcon GS, Brown S. Sexual dysfunction among patients with arthritis. *Clin Rheumatol*. 1988;7:50-60.
- [187] Dincer U, Cakar E, Kiralp MZ, Dursun H. Assessment of sexual dysfunction in male patients with Ankylosing Spondylitis. *Rheumatol Int*. 2007;27:561-6.
- [188] Cakar E, Dincer U, Kiralp MZ, et al. Sexual problems in male ankylosing spondylitis patients: relationship with functionality, disease activity, quality of life, and emotional status. *Clin Rheumatol*. 2007;26:1607-13.
- [189] Pirildar T, Muezzinoglu T, Pirildar S. Sexual function in ankylosing spondylitis: a study of 65 men. *J Urol*. 2004;171:1598-600.
- [190] Araujo DB, Borba EF, Abdo CH, et al. [Sexual function in rheumatic diseases]. *Acta Reumatol Port*. 2010;35:16-23.
- [191] Tristano AG. The impact of rheumatic diseases on sexual function. *Rheumatol Int*. 2009;29:853-60.
- [192] Hill J. The impact of rheumatoid arthritis on patients' sex lives. *Nurs Times*. 2004;100:34-5.
- [193] Hill J, Bird H, Thorpe R. Effects of rheumatoid arthritis on sexual activity and relationships. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42:280-6.
- [194] Oh JS, Heo HM, Kim YG, Lee SG, Lee CK, Yoo B. The effect of anti-tumor necrosis factor agents on sexual dysfunction in male patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *Int J Impot Res*. 2009;21:372-5.

- [195] Elmarakby AA, Quigley JE, Pollock DM, Imig JD. Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*. 2006;47:557-62.
- [196] Elmarakby AA, Quigley JE, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM. TNF-alpha inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R76-83.
- [197] Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. *Hypertension*. 2005;46:76-81.

ANEXO A – Artigo publicado: TNF-alpha knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation.

Carneiro FS, Sturgis LC, Giachini FR, Carneiro ZN, Lima VV, Wynne BM, San Martin S, Brands MW, Tostes RC, Webb RC. TNF-alpha knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation. J Sex Med. 2009;6:115-25.

TNF- α Knockout Mice Have Increased Corpora Cavernosa Relaxation

Fernando S. Carneiro, MSc,^{*,†} Lashon C. Sturgis, PhD,[†] Fernanda R.C. Giachini, MSc,^{*,†} Zidonia N. Carneiro,[†] Victor V. Lima, BSc,[†] Brandi M. Wynne, MS,[†] Sebastian San Martin, PhD,[†] Michael W. Brands, PhD,[†] Rita C. Tostes, PhD,^{*,†} and R. Clinton Webb, PhD[†]

^{*}Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; Sao Paulo, SP, Brazil; [†]Medical College of Georgia, Department of Physiology; Augusta, GA, USA; [‡]Reproductive Biology Research Centre, School of Medicine, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

DOI: 10.1111/j.1743-6109.2008.01029.x

ABSTRACT

Introduction. Erectile dysfunction is considered an early clinical manifestation of vascular disease and an independent risk factor for cardiovascular events associated with endothelial dysfunction and increased levels of pro-inflammatory cytokines. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine, suppresses endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression.

Aim. Considering that nitric oxide (NO) is of critical importance in penile erection, we hypothesized that blockade of TNF- α actions would increase cavernosal smooth muscle relaxation.

Methods. In vitro organ bath studies were used to measure cavernosal reactivity in wild type and TNF- α knockout (TNF- α KO) mice and NOS expression was evaluated by western blot. In addition, spontaneous erections (in vivo) were evaluated by videomonitoring the animals (30 minutes). Collagen and elastin expression were evaluated by Masson trichrome and Verhoeff-van Gieson stain reaction, respectively.

Main Outcome Measures. Corpora cavernosa from TNF- α KO mice exhibited increased NO-dependent relaxation, which was associated with increased eNOS and neuronal NOS (nNOS) cavernosal expression.

Results. Cavernosal strips from TNF- α KO mice displayed increased endothelium-dependent (97.4 ± 5.3 vs. Control: 76.3 ± 6.3 , %) and nonadrenergic-noncholinergic (93.3 ± 3.0 vs. Control: 67.5 ± 16.0 ; 16 Hz) relaxation compared to control animals. These responses were associated with increased protein expression of eNOS and nNOS ($P < 0.05$). Sympathetic-mediated (0.69 ± 0.16 vs. Control: 1.22 ± 0.22 ; 16 Hz) as well as phenylephrine-induced contractile responses (1.6 ± 0.1 vs. Control: 2.5 ± 0.1 , mN) were attenuated in cavernosal strips from TNF- α KO mice. Additionally, corpora cavernosa from TNF- α KO mice displayed increased collagen and elastin expression. In vivo experiments demonstrated that TNF- α KO mice display increased number of spontaneous erections.

Conclusion. Corpora cavernosa from TNF- α KO mice display alterations that favor penile tumescence, indicating that TNF- α plays a detrimental role in erectile function. A key role for TNF- α in mediating endothelial dysfunction in ED is markedly relevant since we now have access to anti-TNF- α therapies. **Carneiro FS, Sturgis LC, Giachini FRC, Carneiro ZN, Lima VV, Wynne BM, Martin SS, Brands MW, Tostes RC, and Webb RC. TNF- α knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation. J Sex Med 2009;6:115–125.**

Key Words. Tumor Necrosis Factor Alpha; Corpus Cavernosum; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Neuronal Nitric Oxide Synthase; Mouse

Introduction

Erectile dysfunction (ED), defined as the consistent inability to achieve and maintain penile erection sufficient for adequate sexual relations, is a prevalent condition affecting more than 150 million men worldwide [1]. ED, which is

considered the early clinical manifestation of generalized vascular disease and an independent risk factor for cardiovascular events, is associated with endothelial dysfunction and increased levels of pro-inflammatory cytokines [2–4]. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine originally defined by its antitumoral activity, is

an important contributor to many cardiovascular diseases, such as myocardial ischemia-reperfusion injury, chronic heart failure, atherosclerosis, and sepsis-associated cardiovascular disorders [5–7]. The vascular endothelium is a major target for the actions of TNF- α in these diseases, in which TNF- α plasma levels are significantly elevated. Administration of TNF- α in vivo induces impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in a variety of vascular beds and decreases the release of nitric oxide (NO) [8]. TNF- α has the ability to increase arterial reactive oxygen species generation, which likely accounts for some of the reduction in NO levels. In addition, TNF- α suppresses endothelial NO synthase (eNOS) expression by inhibiting gene promoter activity [9,10], predominantly through destabilization of eNOS mRNA in endothelial cells [11]. While penile erection is a complex neurovascular process where nerves, endothelium of sinusoids and blood vessels, and smooth muscle cells produce transmitters and modulators that control the erect vs. flaccid state of the penis, it is evident that the NO pathway is of critical physiological importance in the induction and maintenance of erections [12]. The constitutive eNOS and neuronal NOS (nNOS) isoforms are tightly regulated and produce physiologically relevant levels of NO in endothelial cells and autonomic nerve endings of the penis, respectively. Recent advances in the field of penile vascular biology indicate that the regulation of eNOS in the penis involves multiple molecular mechanisms that act in concert to both positively and negatively affect the function of this enzyme [12].

Based on the above-mentioned observations and considering recent evidence that TNF- α levels are increased in serum of patients with moderate-to-severe ED [13,14], we hypothesized that TNF- α knockout (TNF- α KO) mice have increased cavernosal smooth muscle relaxation. To test our hypothesis we have used various pharmacological tools to evaluate relaxant and contractile responses of cavernosal segments from wild-type (control) and TNF- α KO mice. In addition, corporal NOS expression, elastin, and collagen deposition, as well as number of spontaneous erections were determined in these animals.

Methods

Animals

Male control (B6; 129SF2/J) and TNF- α KO (B6; 129S6-Tnf^{tm1Gkl}/J) (16 weeks-old, from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used in these

studies. All procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education. The animals were housed four per cage on a 12-hour light/dark cycle and fed a standard chow diet with water ad libitum.

Arterial Blood Pressure Measurement by Telemetry

Surgery was performed on control and TNF- α KO mice to implant blood pressure radiotelemetry transmitters (Data Sciences PA-C20, International, Roseville, MN). Briefly, after isoflurane anesthesia, the transmitter was implanted into the carotid artery via a mid-ventral neck incision under aseptic conditions, and the transmitter body was routed to a subcutaneous pocket in the mid-back region. The incision was infiltrated with bupivacaine and closed with sterile 6-0 Ethicon Ophthalmic suture. Following recovery, the mouse was housed in an individual cage in the laboratory animal facilities and provided with standard laboratory chow and water ad libitum.

Functional Studies in Cavernosal Strips

After carbon dioxide (CO₂) euthanasia, the penis was excised, transferred into ice-cold buffer, and dissected to remove the tunica albuginea as previously published [15]. One crural strip preparation (1 × 1 × 10 mm) was obtained from each corpus cavernosum (two crural strips from each penis). Cavernosal strips were mounted in 4 mL myograph chambers (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) containing physiological salt solution (PSS) at 37°C, pH 7.4, continuously bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. The tissues were stretched to a resting force of 2.5 mN and allowed to equilibrate for 60 minutes. Changes in isometric force were recorded using a PowerLab/8SP data acquisition system (Chart software, version 5.0; ADInstruments, Colorado Springs, CO). To verify the contractile activity of the preparations, a high potassium chloride (KCl) solution (120 mM) was added to the organ baths at the end of the equilibration period. Cumulative concentration-response curves to acetylcholine (ACh; endothelium-dependent vasodilator; 10⁻⁹ to 3 × 10⁻⁶ M), sodium nitroprusside (SNP; NO donor; 10⁻⁸ to 10⁻³ M), isoproterenol (or isoprenaline, beta-adrenergic receptor agonist; 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ M), tadalafil (phosphodiesterase-5 [PDE-5] inhibitor; 10⁻¹⁰ to 10⁻⁴ M) and Y-27632 (Rho-kinase inhibitor; 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M) were obtained in cavernosal strips contracted with phenylephrine

(PE; 10^{-5} M). Tadalafil was chosen to cause relaxation because it does not affect Ca^{2+} handling, in addition to increasing cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels through inhibition of phosphodiesterase type 5 inhibitors (PDE5), as vardenafil does [16]. Cavernosum contractility was evaluated with cumulative concentration-response curves to PE (10^{-9} to 3×10^{-5} M) in the absence and presence of N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10^{-4} M). Electrical field stimulation (EFS) was applied to strips placed between platinum pin electrodes attached to a stimulus splitter unit (Stimu-Splitter II), which was connected to a Grass S88 stimulator (Astro-Med West Warwick, RI), and EFS was conducted at 20 V, 1-ms pulse width and trains of stimuli lasting 10 seconds at varying frequencies (1–32 Hz). To evaluate sympathetic nerve-mediated responses, cavernosal strips were stimulated on basal tone and after incubation for 45 minutes with L-NAME (10^{-4} M) plus atropine (10^{-6} M). To evaluate nonadrenergic-noncholinergic (NANC)-mediated relaxation, strips were incubated for 45 minutes with bretylium (3×10^{-5} M) plus atropine (10^{-6} M) (to eliminate noradrenergic and cholinergic nerves-mediated responses, respectively), contracted with PE (10^{-5} M) and frequency-response curves were performed.

Spontaneous Erections Measurements

In order to verify the number of erections displayed by control and TNF- α KO animals, studies were performed as previously described [17]. Briefly, mice were habituated to the testing room and test chamber during 1 week. The chamber was a glass ($25 \times 20 \times 20$ cm) with a video recorder underneath it to facilitate penis visualization. Two males, each in a separate test chamber without visual or physical contact, were usually observed at the same time. Observations were commenced after placing the male in the chamber and images were captured for 30 minutes. We reliably observed, distinguished and separately counted erection when the male stood on its hind limbs, bent its body forward, bent its head down to reach the genital area, licked and held the penis with its forepaws and displayed hip movements. The erect penis was always visible, but often only briefly. Erection-like responses in mice, (when the male stood on its hind limbs, bent its body forward, bent its head down, licked the abdomen but not the penis, and displayed hip movements), as described by Rampin and coworkers [17] were also observed. Two criteria therefore distinguished erections

from erection-like responses: in the case of erection, the male licked and held the penis. In the present study, only erection responses were scored.

Histological and Immunohistochemistry Analysis of Corpora Cavernosa from Control and TNF- α KO Mice

Tissues were fixed in methacarn (60% methanol; 30% chloroform; 10% acetic acid) for 3 hours at 4°C. After washing, tissues were dehydrated and embedded in paraffin (Oxford, St. Louis, MO) at 60°C. Transversal sections (5 μ m thick) of penis from control and TNF- α KO mice were cut to obtain the midline plane of corpus cavernosum. Samples were then stained with Masson trichrome (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). This identifies collagen as blue and smooth muscle as red. Verhoeff-van Gieson staining reaction was used to establish elastin expression. The corpora cavernosa of each penis were viewed using a Zeiss Axioskop 2 microscope from 2 $\times$ to 40 $\times$ objectives. Images of this region were captured using a digital camera Canon Power Shot G5 (Canon USA, Lake Success, NY) and KS 100 3.0 software (Carl Zeiss, Thornwood, New York, USA). The entire area of corpus cavernosum, vascular spaces plus smooth muscle and collagen were measured using the Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). For collagen/smooth muscle staining, the ratio of the area stained for collagen (blue) to the total area of the lacunar spaces plus smooth muscle (white and red) was used. Other serial sections were stained immunohistochemically using standard protocols. Briefly, sections were treated with primary mouse monoclonal anti- α -actin antibody (1:200 dilution) (Sigma, following manufacturer's instructions) and incubated overnight at 4°C. Then, sections were washed twice in phosphate buffer saline (PBS) and incubated with the secondary antibody, a biotin-conjugated immunoglobulin G (IgG) antibody, for 30 minutes. Bound antibodies were detected with streptavidin-peroxidase complex using 0.2 mg/mL 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in PBS containing 0.003% hydrogen peroxide. Sections were counterstained with hematoxylin. The number of positive cells were determined and expressed as the number of positive cells per field at 20 $\times$ magnification. At least three fields per slide were analyzed and the mean value was used. Negative sections were incubated only with secondary antibody. In all cases, three sections per tissue specimen from groups of four animals were used to calculate means $\pm$ SEM.

eNOS and nNOS Protein Expression

Cavernosal tissues were dissected and homogenized in protease inhibitor cocktail ([4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin and aprotinin]; Sigma Aldrich) using a small tissue homogenizer. The Bradford assay was used to measure protein concentration. A total of 40 µg of protein was loaded onto an SDS-PAGE 10% gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were then probed with rabbit polyclonal anti-eNOS antibody (1:500; Cell signaling) or mouse monoclonal anti-nNOS (1:2000; BD Transduction Laboratories). The immunostaining was detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:2000; GE Healthcare) and anti-mouse IgG (1:2000; GE Healthcare) for 1 hour at room temperature. Bands were revealed by the SuperSignal Substrate (Pierce Biotechnology) and quantified by densitometry using Scion Image analyzer software (Scion Image Corporation).

Drugs and Solutions

PSS of the following composition was used: 130 mM NaCl, 14.9 mM NaHCO₃, 5.5 mM dextrose, 4.7 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.17 mM MgSO₄·7H₂O, 1.6 mM CaCl₂·2H₂O, and 0.026 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Rabbit polyclonal anti-eNOS antibody was purchased from cell signaling and mouse monoclonal anti-nNOS from BD Transduction Laboratories. The kit biotin-streptavidin system used for immunohistochemistry studies was obtained from Vector Laboratories. ACh chloride, atropine, isoproterenol, SNP, L-NAME, PE hydrochloride, Y-27632 dihydrochloride ([R]-[+]-trans-4-[1-Aminoethyl]-N-[4-Pyridyl] cyclohexanecarboxamide dihydrochloride) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tadalafil (Cialis, tablets containing 20 mg of tadalafil) and bupivacaine (Marcaine, 0.5% without epinephrine) were obtained from CVS Pharmacy (Augusta, GA). All reagents used were of analytical grade. Stock solutions were prepared in deionized water and stored in aliquots at -20°C; dilutions were prepared immediately before use.

Statistical Analysis

Contractions were recorded as changes in the displacement (mN) from baseline and are represented as mN for N experiments. Relaxation was expressed as percentage change from the PE contracted levels. Agonist concentration-response

curves were fitted using a nonlinear interactive fitting program (Graph Pad Prism 4.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Agonist potencies and maximum response are expressed as negative logarithm of the molar concentration of agonist producing 50% of the maximum response (pD₂) and maximum effect elicited by the agonist (E_{max}), respectively. Constraining curve-fit parameters were used to fit a sigmoidal curve and to determine pD₂ values for the drugs tadalafil and Y-27632. Statistically significant differences were calculated by one-way analysis of variance plus Bonferroni's post hoc test or Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

The body weight of the TNF-α KO mice used in these studies was statistically lower (28.0 ± 0.8; N = 22) compared to the control group (31.3 ± 0.6, N = 22). However, no differences were observed in the mean arterial blood pressure (mmHg) control, 102 ± 3, N = 12 vs. TNF-α KO, 98 ± 2, N = 12) or in the ratio of organ weight to body weight ([heart, kidney, penis]/body weight [not shown]) between the groups.

Functional Responses of Corpora Cavernosa

The addition of PE (10⁻⁵ M) to the bathing medium caused a submaximal contraction of mouse cavernosal segments, which consisted of a rapid rise in force followed by a slower rise to a sustained level within 10 minutes. The cumulative addition of ACh (10⁻⁹ to 10⁻⁶ M) produced concentration-dependent relaxations of PE-contracted tissues in both groups (Figure 1A). Although there was no difference in pD₂ value between the groups, the maximal response elicited by ACh in cavernosal strips from TNF-α KO mice (97.4 ± 5.3%) were significantly augmented (*P* < 0.05) in comparison to that elicited in strips from control mice (76.3 ± 6.3%), (Figure 1B).

Whereas eNOS activation seems to account for ACh-induced relaxation, NANC-induced relaxation of cavernosal segments is mediated via NO from nNOS. Accordingly, whereas ACh-induced relaxation is completely blocked in the presence of 10⁻⁶ M atropine (ACh: 76 ± 6 vs. atropine: 8 ± 2; % of relaxation) or 10⁻⁴ M L-NAME (L-NAME: 4 ± 1; % of relaxation), relaxation induced by EFS is minimally altered in the presence of atropine (vehicle: 66 ± 5 vs. atropine: 70 ± 4; % of relaxation at 32 Hz), but it is completely blocked by incubation with L-NAME 10⁻⁴ M (L-NAME:

Figure 1 Endothelium-dependent relaxation and nonadrenergic-noncholinergic nerves stimulation in cavernosal segments from control and TNF- α KO mice. (A) Representative traces showing ACh-induced relaxation in cavernosal segments from control (top) and TNF- α KO (bottom) mice; (B) acetylcholine concentration-effect curves and (C) frequency-response curves elicited by EFS (1–32 Hz) were performed in cavernosal strips, contracted with PE (10^{-5} M), from control (●) and TNF- α KO (■) mice. Experimental values of the relaxations induced by EFS (N = 4 and 6, respectively), and acetylcholine (N = 5 in each group) were calculated relatively to the maximal changes from the contraction produced by PE in each tissue, which was taken as 100%. Data represent the mean $\pm$ SEM of *n* experiments. **P* < 0.05 vs. control (wild type). TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice; EFS = electrical field stimulation; PE = phenylephrine.

1 ± 0.5 ; % of relaxation at 32 Hz). To evaluate the effects of NANC nerve stimulation, cavernosal smooth muscle strips were incubated with bretylium tosylate (3×10^{-5} M; sympathetic nerve block-

ing agent) and atropine 10^{-6} M. After 45 minutes of incubation, strips were contracted with PE (10^{-5} M) and frequency-dependent responses to EFS (1–32 Hz) were evaluated. EFS-induced relaxations were significantly augmented in cavernosal segments from TNF- α KO mice in comparison to strips from control mice (Figure 1C).

On the other hand, no differences were observed in the relaxant responses induced by SNP (NO donor), isoproterenol (beta adrenergic receptor agonist), tadalafil (PDE5 inhibitor) or Y-27632 (Rho kinase inhibitor) between the groups (Figure 2). E_{max} and pD_2 values for the agonists are shown at Table 1.

In order to determine the presence of changes in contractile responses of cavernosal strips from TNF- α KO mice, frequency-dependent EFS curves and concentration-response curves to PE (10^{-9} to 10^{-4} M) were performed. In cavernosal smooth muscle strips under resting conditions and after incubation with atropine 10^{-6} M plus L-NAME 10^{-4} M, EFS (1–32 Hz), produced decreased frequency-dependent contractions in the TNF- α KO group compared to control (Figure 3A). These responses were completely abolished by the sympathetic nerve blocking agent bretylium tosylate (3×10^{-5} mM; N = 4) or by the alpha-adrenergic antagonist terazosin (10^{-6} M; N = 4) (vehicle: 2.4 ± 0.3 vs. bretylium tosylate: 0.1 ± 0.1 vs. terazosin: 0.1 ± 0.2 ; mN contraction at 32 Hz), confirming that these responses are neuronal in origin and adrenergic in nature and that there was not direct cavernosal smooth muscle activation by EFS.

Cavernosal segments from TNF- α KO mice also exhibited decreased responses to PE, both in the absence and in the presence of L-NAME 10^{-4} M, compared to strips from control mice (Figures 3B, C). Nevertheless, pD_2 values for PE were increased in cavernosal strips from TNF- α KO mice compared to control group (Table 1).

Corporal NOS Isoforms Expression and Collagen and Elastin Content

To address if increased relaxant responses to ACh and NANC nerve stimulation are associated with increased expression of NOS isoforms, expression of eNOS and nNOS was evaluated by Western blot in corpora cavernosa from control and TNF- α KO mice. As shown in Figure 4, increased eNOS and nNOS expression was detected in tissues from TNF- α KO animals.

We further evaluated whether structural changes would occur in corpora cavernosa from

Figure 2 Relaxation responses in cavernosal segments from control and TNF- α KO mice. Effects of (A) sodium nitroprusside, (B) isoproterenol, (C) tadalafil and (D) Y-27632 were evaluated in cavernosal strips, contracted with PE (10^{-5} M), from control (●) and TNF- α KO (■) mice. Experimental values of the relaxations induced by sodium nitroprusside (N = 5 in each group), isoproterenol (N = 4 and 6, respectively), tadalafil (N = 5 in each group) and Y-27632 (N = 5 in each group) were calculated relative to the maximal changes from the contraction produced by PE, which was taken as 100%. Data represent the mean $\pm$ SEM of n experiments. TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice; PE = phenylephrine.

TNF- α KO animals. Histological analysis showed that cavernosal tissue from TNF- α KO mice displays increased collagen/smooth muscle and elastin/smooth muscle ratio (Figure 5A, B, respectively). The number of corporal smooth muscle cells was not different between the groups (Control: 146 ± 11 vs. TNF- α KO: 124 ± 17 ; number of positive cells at $20\times$ magnification).

Spontaneous Erections

In order to verify if the increased relaxation and decreased contractile responses observed in corpora cavernosa from TNF- α KO mice in vitro are translated into facilitated erectile responses in the intact animal, we determined the number of spontaneous erections displayed by these animals during 30 minutes intervals. TNF- α KO animals displayed an increased number of spontaneous

erections compared to the control group (Figure 6).

Discussion

The present study shows that isolated corpora cavernosa from TNF- α KO mice display increased endothelium-dependent relaxation and altered neural-mediated responses that would favor penile tumescence to occur: decreased contractile response to adrenergic nerve stimulation and increased relaxant responses upon activation of NANC nerves. This study also shows that the expression of key enzymes involved in the erectile responses, such as eNOS and nNOS, are increased in cavernosal strips from TNF- α KO mice.

In the first set of experiments, we observed that cavernosal strips from TNF- α KO mice display

Table 1 Emax and pD₂ values for agonists in cavernosal strips from control and TNF- α KO mice

Agonist	Control		TNF- α KO	
	Emax (%)	pD ₂	Emax (%)	pD ₂
Acetylcholine (N = 5)	76.3 $\pm$ 6.3	6.99 $\pm$ 0.13	97.4 $\pm$ 5.3*	7.11 $\pm$ 0.07
Sodium nitroprusside (N = 5)	75.6 $\pm$ 4.2	6.13 $\pm$ 0.16	76.6 $\pm$ 2.4	5.84 $\pm$ 0.07
Isoproterenol (N = 5)	65.9 $\pm$ 4.4	7.47 $\pm$ 0.17	63.5 $\pm$ 3.9	7.12 $\pm$ 0.13
Tadalafil (N = 5)	99.2 $\pm$ 4.1	6.61 $\pm$ 0.16	96.4 $\pm$ 3.9	6.26 $\pm$ 0.24
Y-27632 (N = 6)	94.4 $\pm$ 6.3	5.03 $\pm$ 0.07	95.7 $\pm$ 11.7	5.36 $\pm$ 0.10
Phenylephrine (N = 5)	2.5 $\pm$ 0.1	5.54 $\pm$ 0.08	1.6 $\pm$ 0.1*	5.99 $\pm$ 0.17*
Phenylephrine + L-NAME (N = 5)	2.2 $\pm$ 0.2	5.73 $\pm$ 0.12	1.5 $\pm$ 0.1*	6.34 $\pm$ 0.19*

Values are means $\pm$ SEM for N experiments in each group.

* $P < 0.05$ vs. control (*t-test).

Emax = maximum effect elicited by the agonist; TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice; L-NAME = N ω -nitro-L-arginine methyl ester.

TNF- α and Corpus Cavemosum Function

121

Figure 3 Contractile responses upon stimulation of adrenergic nerves or α_1 -adrenergic receptor in cavernosal segments from control and TNF- α KO mice. (A) Frequency-response curves elicited by EFS (1–32 Hz) were performed in the presence of L-NAME 10^{-4} M plus atropine 10^{-6} M (N = 10 and 8, respectively). Phenylephrine concentration-response curves were performed in the absence (B) or presence (C) of L-NAME 10^{-4} M (N = 5 in all groups). Experimental values of contraction of cavernosal strips from control (●) and TNF- α KO (■) mice are in mN and data represent the mean $\pm$ SEM of n experiments. * P < 0.05 compared with values from control segments. TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice; EFS = electrical field stimulation; L-NAME = Nw-nitro-L-arginine methyl ester.

increased endothelium-dependent and NANC relaxation compared to control animals. In order to verify if the increased relaxation was a specific phenomenon, concentration-response curves were

performed to different relaxant compounds, such as SNP, isoproterenol, tadalafil and Y-27632. However, no differences were observed between responses from cavernosal strips from control and TNF- α KO mice, suggesting specific functional changes in endothelium-dependent and NANC-induced relaxation. Our results are consistent with previous studies showing that administration of TNF- α in vivo induces impairment of endothelium-dependent vasorelaxation and decreases the release of NO, not only in animals, but also in humans patients [8]. The constitutive eNOS and nNOS are tightly regulated and produce physiologically relevant levels of NO in endothelial cells and autonomic nerve endings of the penis, respectively [12]. Despite its ability to induce the expression of inducible NOS and increase NO production by the endothelium, in vitro administration of TNF- α inhibits endothelium-dependent relaxation in cat carotid and rat pulmonary arteries, consistent with TNF- α -induced impairment of NO production by the endothelium. Accordingly, it has been demonstrated that TNF- α suppresses eNOS expression by inhibiting gene promoter activity [10,11], predominantly through destabilization of eNOS mRNA in endothelial cells [11]. In fact, these studies corroborate with our present finding that cavernosal strips from TNF- α KO animals show increased expression of eNOS. Although, increased NOS protein expression associated with increased NANC and endothelium-dependent relaxation indicate increased NOS activity, measurements of NO or cGMP levels are necessary to further support this suggestion.

Vlachopoulos and collaborators [13] have demonstrated the association between low grade inflammation and altered endothelial-prothrombotic state on one side and ED on the other, in patients with and without coronary artery disease by analyzing a wide spectrum of circulating markers and mediators. According to their findings, the level of TNF- α and endothelial-prothrombotic parameters are inversely associated with sexual performance. Additionally, this study corroborates recent findings that endothelial dysfunction in ED is a systemic arterial defect not only confined to the penile vasculature, and offers a humoral basis for this association. In fact, several lines of evidence suggest that the pro-inflammatory cytokine TNF- α plays a key role in inducing endothelial dysfunction. First, in clinically stable heart transplant patients, a strong positive relation between plasma TNF- α and the vascular response to ACh has been documented [18]. Second, Baghat and

Figure 4 Protein NOS expression in corpora cavernosa from control and TNF- α KO mice. Representative immunoblots for eNOS (A) and nNOS (B) (top panel). Corresponding bar graphs demonstrating increased NOS expression in the corporal tissue from TNF- α KO animals (bottom panel). Results are mean $\pm$ SEM of N = 5–6 experiments. * P < 0.05, TNF- α vs. control (WT). NOS = nitric oxide synthase; TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice; eNOS = endothelial nitric oxide synthase; nNOS = neuronal nitric oxide synthase.

Vallance [19] have shown that whereas infusion of TNF- α alone impaired endothelial function in health subjects, infusion of IL-6 did not. Finally, a key role for TNF- α in mediating endothelial dysfunction is of interest not only because markedly elevated serum levels of TNF- α have been documented in patients with ED, but also because we now have access to targeted anti-TNF- α therapies, such as etanercept.

While eNOS is mainly involved in endothelium-dependent relaxation, nNOS is considered the major mediator of NANC relaxation in the penis [12]. Although there is no report about TNF- α actions on nNOS expression in corpora cavernosa, it has been demonstrated that TNF- α infusion significantly induced an increase in mean arterial pressure and reduction in renal nNOS protein expression, within both the cortex and medulla from pregnant rats [20]. In addition, these animals also showed reduced endothelium-dependent relaxation. In accordance with our results, and further supporting increased NANC-mediated relaxation, penes from TNF- α KO mice were shown to have increased nNOS expression. Taken together, these findings suggest that TNF- α impairs cavernosum relaxation not only by decreasing eNOS expression on endothelial cells, but also by negatively modulating nNOS present in nerve terminals in the penis.

Traditionally, ED is thought of as an outcome of occlusive systemic vascular disease that occurs as a late consequence of atherosclerosis. Current and emerging clinical research studies are showing that the penile vascular bed may be a sensitive indicator

of early systemic endothelial cell and/or smooth muscle dysfunction. Numerous clinical epidemiology studies have demonstrated that ED is highly prevalent in men with vascular risk factors for diabetes [21,22], hypertension [23], dyslipidemia [24,25], cigarette smoking [1], obesity, and sedentary lifestyles [26–28]. These conditions are all associated with an increased incidence of ED and increased levels of cytokines. Recently, Zhang and coworkers [29] have demonstrated a substantial proatherogenic role for TNF- α . Furthermore, the presence of tumor necrosis factor receptor-1 in the vascular wall causes atherosclerosis independently of macrophage infiltration [29].

Excessive deposition of extracellular matrix components produced by the synthetic phenotype of smooth muscle cells in the intima is postulated to be one of the most important pathological changes in atherosclerosis. In the present study, it was demonstrated that corpora cavernosa from TNF- α KO mice have increased collagen expression. In addition, this result is further supported by Hiraga and coworkers [30], which have shown that TNF- α decreases the synthesis of collagen in smooth muscle cells, especially collagen types IV and V. Although smooth muscle cells are postulated to be one of the cell types in which collagen synthesis is strongly suppressed by TNF- α [30], indirect effects produced by TNF- α or compensatory mechanisms brought on by TNF- α KO cannot be ruled out. Considering that changes of elastic fibers or collagen types can alter mechanical properties of the penis, the increased collagen content in TNF- α KO corpora cavernosa could

Figure 5 Bar graphs represent collagen/smooth muscle ratio (A) and elastin/smooth muscle ratio (B). Overall view of the corpus cavernosum, corpus spongiosum (CS), urethra (U), dorsal artery (DA), and central artery (CA) in penes from control (A) and TNF- α KO (B) mice (upper panel). Observe in corporal sections from TNF- α KO increased collagen and elastin deposition (dashed arrows). Original magnification 4 $\times$. * $P < 0.05$ vs control. TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice.

indicate a fibrotic state with reduced elasticity and compliance, finally leading to the impairment of erectile responses. However, collagen types I, III and IV are the predominant isoforms in the corporal tissue. Type I collagen, which forms stiff bands of fibrils, has been shown to be less compliant than type III collagen, which is found predominantly in distensible elastic tissue and is

essential for normal tensile strength [31]. Based on that, we speculate that the discrepancy observed may be due to changes in the ratio of collagen I/collagen III, which would diminish the impact caused by increased collagen expression on cavernosal contractility. Furthermore, cavernosal tissue of TNF- α KO mice displayed increased elastin content, which may contribute to increased cavernosal elasticity. In addition, elastin expression has been demonstrated to be decreased in patients with ED [32]. Finally, cavernosal responses in vitro indicating that TNF- α KO mice have facilitated penile tumescence, were confirmed by the in vivo experiments. One potential limitation of our study is the fact that in vivo erectile function has been evaluated only by videomonitoring (30 minutes) of spontaneous erection and not by assessment of intracavernous pressure. Taken together, our results present the novelty that TNF- α can negatively modulate erectile responses, at physiological conditions, partially via inhibition of NOS expression. Thus, deleterious actions of TNF- α in cavernosal function, may be particularly important in conditions where its levels are increased. We are currently addressing whether TNF- α contributes to hypertensive or diabetes-associated ED.

In summary, we have shown that TNF- α KO mice exhibit changes in cavernosal reactivity that would facilitate erectile responses: decreased responses to adrenergic nerve stimulation and increased NANC and endothelium-dependent relaxation that are associated with increased corporal eNOS and nNOS protein levels. A key role for TNF- α in mediating endothelial dysfunction in ED is markedly relevant since we now have access to anti-TNF- α therapies. Blockade of

Figure 6 Spontaneous erections. Bar graphs demonstrating the number of erections in control and TNF- α KO animals during 30 minutes intervals. Only the numbers of erections, but not erections-like were scored. * $P < 0.05$, TNF- α vs. control (WT). TNF- α KO = tumor necrosis factor- α knockout mice.

TNF- α actions may represent an alternative therapeutic approach for ED, especially in pathological conditions associated with increased levels of this cytokine.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the National Institutes of Health (HL71138 and HL74167), Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo—FAPESP and CAPES, Brazil.

Corresponding Author: Fernando S. Carneiro, MSc, Medical College of Georgia, Department of Physiology, 1120 15th St., Augusta, GA, USA. Tel: 706-721-3547; Fax: 706-721-7299; E-mail: fcarneiro@mcg.edu

Conflict of Interest: None declared.

Statement of Authorship

Category 1

(a) Conception and Design

Fernando S. Carneiro; Rita C. Tostes

(b) Acquisition of Data

Fernando S. Carneiro; Lashon C. Sturgis; Fernanda R.C. Giachini; Zidonia N. Carneiro; Victor V. Lima; Brandi M. Wynne

(c) Analysis and Interpretation of Data

Fernando S. Carneiro; Sebastian San Martin; Rita C. Tostes

Category 2

(a) Drafting the Article

Fernando S. Carneiro; Rita C. Tostes

(b) Revising It for Intellectual Content

Rita C. Tostes; Michael W. Brands; R. Clinton Webb

Category 3

(a) Final Approval of the Completed Article

Rita C. Tostes; R. Clinton Webb

References

- 1 Tostes RC, Carneiro FS, Lee AJ, Giachini FRC, Leite R, Osawa Y, Webb RC. Cigarette smoking and erectile dysfunction: Focus on NO bioavailability and ROS generation. *J Sex Med* 2008;5:1284–95.
- 2 Giugliano F, Esposito K, Di Palo C, Ciotola M, Giugliano G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J Endocrinol Invest* 2004;27:665–9.
- 3 Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: Common links. *Eur Urol* 2007;52:1590–600.
- 4 Guay AT. ED2: Erectile dysfunction = endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007;36:453–63.
- 5 Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:93–109; discussion 9–11.
- 6 Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: A double facet cytokine. *Cardiovasc Res* 1998;37:554–9.
- 7 Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Ayala A, Cain BS, Shames BD, Ao L, Banerjee A, Harken AH. Human myocardial tissue TNF α expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1683–9.
- 8 Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:695–701.
- 9 Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:963–9.
- 10 Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF- α induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L452–9.
- 11 Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205–9.
- 12 Musicki B, Burnett AL. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:154–65.
- 13 Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vasiliadou C, Alexopoulos N, Stefanadi E, Askitis A, Stefanadis C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006;27:2640–8.
- 14 Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Ceylan E, Cildag O. Correlates of erectile dysfunction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respirology* 2007;12:248–53.
- 15 Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Leite R, Inscho EW, Tostes RC, Webb RC. Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. *J Sex Med* 2008;5:1156–66.
- 16 Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:654–61.
- 17 Rampin O, Jerome N, Suaudeau C. Proerectile effects of apomorphine in mice. *Life Sci* 2003;72:2329–36.

- 18 Holm T, Aukrust P, Andreassen AK, Ueland T, Brosstad F, Froland SS, Simonsen S, Gullestad L. Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: Possible role of proinflammatory cytokines. *Clin Transplant* 2000;14:218–25.
- 19 Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997;96:3042–7.
- 20 Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens* 2002;15:170–5.
- 21 Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB. Sexual function in men older than 50 years of age: Results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med* 2003;139:161–8.
- 22 Moulik PK, Hardy KJ. Hypertension, anti-hypertensive drug therapy and erectile dysfunction in diabetes. *Diabet Med* 2003;20:290–3.
- 23 Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens* 1999;12:271–5.
- 24 Wei M, Macera CA, Davis DR, Hornung CA, Nankin HR, Blair SN. Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol as important predictors of erectile dysfunction. *Am J Epidemiol* 1994;140:930–7.
- 25 Musicki B, Liu T, Strong T, Jin L, Laughlin MH, Turk JR, Burnett AL. Low-fat diet and exercise preserve eNOS regulation and endothelial function in the penis of early atherosclerotic pigs: A molecular analysis. *J Sex Med* 2008;5:552–61.
- 26 Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994;151:54–61.
- 27 Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, Capobianco S, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. *Circulation* 2007;115:245–54.
- 28 Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB. Modifiable risk factors and erectile dysfunction: Can lifestyle changes modify risk? *Urology* 2000;56:302–6.
- 29 Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, Orman ES, Brian L, Exum ST, Freedman NJ. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1087–94.
- 30 Hiraga S, Kaji T, Ueda Y, Zisaki F, Iwata K, Koizumi F, Okada Y, Katsuda S, Nakanishi I. Modulation of collagen synthesis by tumor necrosis factor α in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2000;66:235–44.
- 31 Luangkhot R, Rutchik S, Agarwal V, Puglia K, Bhargava G, Melman A. Collagen alterations in the corpus cavernosum of men with sexual dysfunction. *J Urol* 1992;148:467–71.
- 32 Akkus E, Carrier S, Baba K, Hsu GL, Padmanathan H, Hunes L, Lue TF. Structural alterations in the tunica albuginea of the penis: Impact of Peyronie's disease, ageing and impotence. *Br J Urol* 1997;79:47–53.

ANEXO B – Artigo publicado: TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity.

Carneiro FS, Zemse S, Giachini FR, Carneiro ZN, Lima VV, Webb RC, Tostes RC. TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity. J Sex Med. 2009;6 (Suppl 3):311-9.

TNF- α Infusion Impairs Corpora Cavernosa Reactivity

Fernando S. Carneiro, MSc,*† Saiprazad Zemse, BSc,† Fernanda R.C. Giachini, MSc,*†
Zidonia N. Carneiro,† Victor V. Lima, BSc,† R. Clinton Webb, PhD,† and Rita C. Tostes, PhD*†

*Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo—Pharmacology, Sao Paulo, SP, Brazil; †Medical College of Georgia—Department of Physiology, Augusta, GA, USA

DOI: 10.1111/j.1743-6109.2008.01189.x

ABSTRACT

Introduction. Erectile dysfunction (ED), as well as cardiovascular diseases (CVDs), is associated with endothelial dysfunction and increased levels of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Aim. We hypothesized that increased TNF- α levels impair cavernosal function.

Methods. In vitro organ bath studies were used to measure cavernosal reactivity in mice infused with vehicle or TNF- α (220 ng/kg/min) for 14 days. Gene expression of nitric oxide synthase isoforms was evaluated by real-time polymerase chain reaction.

Main Outcome Measures. Corpora cavernosa from TNF- α -infused mice exhibited decreased nitric oxide (NO)-dependent relaxation, which was associated with decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) cavernosal expression.

Results. Cavernosal strips from the TNF- α -infused mice displayed decreased nonadrenergic-noncholinergic (NANC)-induced relaxation (59.4 ± 6.2 vs. control: 76.2 ± 4.7 ; 16 Hz) compared with the control animals. These responses were associated with decreased gene expression of eNOS and nNOS ($P < 0.05$). Sympathetic-mediated, as well as phenylephrine (PE)-induced, contractile responses (PE-induced contraction; 1.32 ± 0.06 vs. control: 0.9 ± 0.09 , mN) were increased in cavernosal strips from TNF- α -infused mice. Additionally, infusion of TNF- α increased cavernosal responses to endothelin-1 and endothelin receptor A subtype (ET_A) receptor expression ($P < 0.05$) and slightly decreased tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) expression ($P = 0.063$).

Conclusion. Corpora cavernosa from TNF- α -infused mice display increased contractile responses and decreased NANC nerve-mediated relaxation associated with decreased eNOS and nNOS gene expression. These changes may trigger ED and indicate that TNF- α plays a detrimental role in erectile function. Blockade of TNF- α actions may represent an alternative therapeutic approach for ED, especially in pathologic conditions associated with increased levels of this cytokine. **Carneiro FS, Zemse S, Giachini FRC, Carneiro ZN, Lima VV, Clinton Webb R, and Tostes RC. TNF- α infusion impairs corpora cavernosa reactivity. J Sex Med 2009;6(suppl 3):311–319.**

Key Words. Tumor Necrosis Factor-Alpha; Corpus Cavernosum; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Neuronal Nitric Oxide Synthase; Mouse

Introduction

Epidemiologic data demonstrate a close relationship between erectile dysfunction (ED) and cardiovascular diseases (CVDs) [1–6]. A clear connection between vasculogenic ED and CVD is evidenced by common risk factors such as hypertension [7], smoking [8], dyslipidemia [9,10], obesity [11,12], and diabetes [13,14]. Moreover, the clustering of these factors increases the risk for ED even further, as

observed in metabolic syndrome [13,15–17]. ED is considered the early clinical manifestation of generalized vascular disease and carries an independent risk factor for cardiovascular events [18,19]. In this sense, the penile vasculature may be seen as an early sentinel that predicts CVD and especially the atherosclerotic process observed in coronary artery diseases [2,18]. In addition, ED is associated with endothelial dysfunction and increased levels of proinflammatory cytokines [3,11].

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a proinflammatory cytokine with a broad range of actions and contributes to many CVDs, including myocardial ischemia-reperfusion injury, chronic heart failure, atherosclerosis, and sepsis-associated cardiovascular disorders [20–22]. The vascular endothelium is a major target for the actions of TNF- α , and the administration of TNF- α induces the impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in a variety of vascular beds and decreases the release of nitric oxide (NO) [23].

Vlachopoulos and coworkers [3] demonstrated increased levels of TNF- α in patients with ED and a negative correlation between sexual performance and TNF- α levels [3]. In addition, transgenic animals that overexpress human tumor necrosis factor- α (hTNF- α) display fewer erections and decreased mounting behavior [24]. Although TNF- α effects in the vasculature have been demonstrated, no information exists about its actions in the cavernosal tissue. Therefore, we hypothesized that TNF- α impairs cavernosal smooth muscle reactivity and thus leads to ED. To test our hypothesis, we have used various pharmacologic tools to evaluate relaxant and contractile responses of cavernosal segments from control and TNF- α -infused animals. In addition, corporal nitric oxide synthase expression was determined.

Methods

Animals

Male C57BL/6 mice (12 weeks old, from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) were used in these studies. All procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education. The animals were housed four per cage on a 12-hour light/dark cycle and fed a standard chow diet with water ad libitum.

Human Recombinant TNF- α Infusion

After anesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (2.9 mg/kg), minipumps were implanted subcutaneously to deliver hTNF- α (220 ng/kg/min, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Blood Pressure Measurements

At the end of treatment (14 days), the mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (2.9 mg/kg).

Following anesthesia, a sterile catheter was inserted into the left carotid artery. The incision was closed with sterile 6-0 Ethicon Ophthalmic suture (Cornelia, GA, USA). The catheter was secured on the back of the mouse. All surgeries were conducted under aseptic and sterile conditions. After the animals recovered from anesthesia, the catheter was connected to a transducer, and the mean arterial pressure (MAP) was recorded for 3–4 hours. Subsequently, the animals were euthanized, and cavernosal tissues were isolated for further studies.

Functional Studies in Cavernosal Strips

After carbon dioxide (CO₂) euthanasia, the penis was excised, transferred into ice-cold physiologic salt solution (PSS), and dissected to remove the tunica albuginea. One crural strip preparation (1 × 1 × 10 mm) was obtained from each corpus cavernosum (two crural strips from each penis). Changes in isometric force were recorded using a PowerLab/8SP data acquisition system (Chart software, version 5.0, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA), as previously shown elsewhere [25]. Cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh; endothelium-dependent vasodilator; 10^{−9} to 3 × 10^{−5} M) were obtained in cavernosal strips contracted with phenylephrine (PE; 10^{−5} M). Cavernosum contractility was evaluated with cumulative concentration–response curves to PE (10^{−9} to 10^{−4} M) and endothelin-1 (ET-1, 10^{−10} to 10^{−6}). Electrical field stimulation (EFS) to determine sympathetic-mediated contractions and nonadrenergic–noncholinergic (NANC)-mediated relaxations were performed as previously described [25].

Quantitative Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Total RNA was extracted from cavernosal strips using the RNeasy kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA). The quantity, purity, and integrity of all qRNA samples were determined by NanoDrop spectrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed. qPCRs were performed as previously described in detail [26]. Primers for preproendothelin-1 (preproET-1) (N^o Mm00438656_m1), ET_A receptor (Rn00561137_m1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Mm01164908_m1), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Mm00435175), and tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1)

(Rn01492348_m1) mRNA were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Drugs and Solutions

PSS of the following composition was used: 130 mM NaCl, 14.9 mM NaHCO₃, 5.5 mM dextrose, 4.7 mM KCl, 1.18 mM KH₂PO₄, 1.17 mM MgSO₄·7H₂O, 1.6 mM CaCl₂·2H₂O, and 0.026 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Acetylcholine chloride, atropine, N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), bretylium tosylate, and phenylephrine hydrochloride were purchased from Sigma Chemical Co. ET-1 was obtained from Tocris (Ellisville, MO, USA).

Statistical Analysis

Contractions were recorded as changes in the displacement (millinewton) from baseline and are represented as millinewton for N experiments. Relaxation was expressed as percentage change from the PE-contracted levels. Agonist concentration–response curves were fitted using a nonlinear interactive fitting program (Graph Pad Prism 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Agonist potencies and maximum response are expressed as negative logarithm of the molar concentration of agonist producing 50% of the maximum response and maximum effect elicited by the agonist, respectively. Statistically significant differences were calculated by one-way analysis of variance plus Bonferroni's post hoc test or Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

The body weight of the TNF- α -infused mice used in these studies was not statistically different (27.6 ± 1.4 ; N = 13) compared with the control group (27.5 ± 1.0 ; N = 11). In addition, no differences were observed in the mean arterial blood pressure between the groups ([mm Hg] control, 105 ± 1.7 vs. TNF- α -infused, 110 ± 3.8).

Functional Responses of Corpora Cavernosa

In order to determine the presence of changes in sympathetic-induced contractile responses in cavernosal strips, frequency-dependent EFS curves were performed. After incubation with atropine 10^{-6} M plus L-NAME 10^{-4} M, EFS (1–64 Hz) produced increased sympathetic-induced contractions in cavernosal strips from TNF- α -infused mice compared with the control group (Figure 1A,

B). These responses were completely abolished by the sympathetic nerve blocking agent bretylium tosylate (3×10^{-5} M) or by the alpha-adrenergic antagonist terazosin (10^{-6} M), confirming that these responses are neuronal in origin and adrenergic in nature.

Cavernosal segments from the TNF- α -infused mice also exhibited increased responses to PE (Figure 1C) and ET-1 (Figure 1D) compared with those in the control strips. The addition of ET_A receptor antagonist nearly abolished the contractile response to ET-1 in all groups (data not shown).

Whereas eNOS activation seems to account for ACh-induced relaxation, NANC-induced relaxation of cavernosal segments is mediated via NO derived from nNOS. Accordingly, ACh-induced relaxation is completely blocked in the presence of 10^{-6} M atropine or 10^{-4} M L-NAME. However, relaxation induced by EFS is minimally altered in the presence of atropine, but it is completely blocked by incubation with L-NAME 10^{-4} M. To evaluate the effects of NANC nerve stimulation, cavernosal smooth muscle strips were incubated with bretylium tosylate (3×10^{-5} M; sympathetic nerve blocking agent) and atropine 10^{-6} M. After 45 minutes of incubation, the strips were contracted with PE (10^{-5} M) and frequency-dependent responses to EFS (1–64 Hz) were evaluated. EFS-induced relaxations were significantly decreased in cavernosal segments from the TNF- α -infused mice in comparison to strips from the control mice (Figure 2A, B).

The cumulative addition of ACh (10^{-9} to 3×10^{-5} M) produced concentration-dependent relaxations of PE-contracted tissues in both groups (Figure 2C). However, there was no difference in ACh-induced relaxation between the groups (Figure 2C).

TNF- α Effects on nNOS, eNOS, ET-1, and TNFR1 Receptor Expression

In the second set of experiments, we first determined whether corpora cavernosa express TNFR1 receptor, the main receptor that mediates TNF- α effects. Cavernosal strips from mice display TNFR1 receptor expression (Figure 3A). There was a tendency of reduced TNFR1 expression in cavernosal tissue from the TNF- α -infused mice (*P* = 0.0638), indicating down-regulation due to TNF- α infusion. Consistent with the changes observed in functional data, TNF- α infusion decreased nNOS gene expression (Figure 3B). Despite the fact that cavernosal strips from the

Figure 1 Contractile responses upon stimulation of adrenergic nerves, α_1 -adrenergic, and endothelin-1 (ET-1) receptor activation are augmented in cavernosal segments from tumor necrosis factor- α (TNF- α)-infused mice. (A) Representative traces of the frequency-response curves elicited by electric field stimulation (EFS) (1–64 Hz). (B) Frequency-response curves elicited by EFS (1–64 Hz) were performed in the presence of Nw-nitro-L-arginine methyl ester 10^{-4} M plus atropine 10^{-6} M in cavernosal strips from the control and TNF- α -infused mice (N = 5 and 6, respectively). (C) Phenylephrine concentration-response curves (N = 8 in all groups). (D) ET-1-induced contractile responses (N = 7 in all groups). Experimental values of contraction of cavernosal strips from the control (●) and TNF- α -infused (■) mice are in millinewton, and data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of N experiments. * P < 0.05 compared with values from the control segments.

TNF- α -infused mice displayed no changes to ACh-induced relaxation, decreased eNOS gene expression was observed with TNF- α infusion (Figure 3C). TNF- α infusion did not change

preproET-1 gene expression in mouse corpora cavernosa (Figure 3D). In contrast, TNF- α infusion induced a fourfold increase in ET $_A$ receptor gene expression in cavernosal tissue.

Figure 2 Relaxant responses due to nonadrenergic–noncholinergic (NANC) nerve stimulation and endothelium-dependent relaxation in cavernosal segments from the control and tumor necrosis factor- α (TNF- α)-infused mice. (A) Representative traces showing NANC-induced relaxation in cavernosal segments from the control (top) and TNF- α -infused (bottom) mice; (B) frequency–response curves elicited by electric field stimulation (EFS) (NANC nerves stimulation); and (C) acetylcholine concentration–response curves in cavernosal strips precontracted with phenylephrine (PE) (10^{-5} M) from the control (●) and TNF- α -infused (■) mice. Experimental values of the relaxations induced by EFS (N = 9 and 10, respectively) and acetylcholine (N = 7 and 10, respectively) were calculated relatively to the maximal changes from the contraction produced by PE in each tissue, which was taken as 100%. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean of N experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

Discussion

A role for cytokines in ED has emerged [11]. Cytokines induce genes that synthesize other peptides in the cytokine family and several mediators, such as prostanooids, leukotrienes, NO, bradykinin, reactive oxygen species, and platelet-activating factor, all of which can affect vascular function. The vascular responses appear to be related to the balance between all the vasoactive factors released under the influence of cytokines, and regional differences in release and responsiveness to these factors appear to contribute to the dilator or constrictor response observed within a specific vascular bed [27]. Consistent with the fact that the cavernosal tissue is a complex extension of the vascular bed, risk factors that affect the vasculature have been shown to affect cavernosal function as well. Accordingly, the penile tissue has been rec-

ognized as an early sentinel for atherosclerosis that underlines coronary artery disease and CVD [18,19].

Vlachopoulos and collaborators [3] have demonstrated the association between low-grade inflammation, altered endothelial–prothrombotic state, and ED. In addition, high levels of TNF- α were demonstrated in patients with ED [3]. Several studies show that TNF- α plays a key role in inducing endothelial dysfunction [22,23,28–30], thus causing changes in vascular reactivity. In addition, a mouse model that overexpresses hTNF- α exhibits not only decreased induced erections but also decreased mounting behavior and a number of intromissions [24]. “One should consider that these altered behavioral responses may be due to the central actions of TNF- α . Although the TNF- α transport system in the blood–brain barrier is saturable [31], circulating levels of

Figure 3 Messenger RNA expression of (A) tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1), (B) neuronal nitric oxide synthase (nNOS), (C) endothelial nitric oxide synthase (eNOS), (D) preproendothelin-1 (preproET-1), and (E) ET $_A$ receptor determined by quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction using total RNA extracted from the cavernosal tissue of the control (open bar) or tumor necrosis factor- α (TNF- α)-infused (filled bar) mice. Bar graphs show fold of change in gene expression. Values were normalized by the correspondent 18s rRNA of each sample. Results are mean $\pm$ standard error of the mean (N = 5–7). * P < 0.05 vs. control.

TNF- α can reach the central nervous system.” Taken together, these studies suggest that TNF- α may play an important role on erectile function and be a link between ED and CVD.

Herein, we present the novelty that isolated corpora cavernosa from the TNF- α -infused mice display decreased NANC-dependent relaxation and increased sympathetic-mediated contractions that would favor penile detumescence to occur. This study also shows that gene expression of key enzymes involved in erectile responses, such as

eNOS and nNOS, is decreased in cavernosal strips from the TNF- α -infused mice. Additionally, this study corroborates the notion that ED is a systemic arterial defect not only confined to the penile vasculature and offers a humoral basis for this association.

Our results are consistent with previous studies showing that TNF- α caused increased contractile responses to PE in vessels from pregnant rats [32]. Although the exact mechanisms remain unclear for this effect, Parris and coworkers [33] demonstrated

that TNF- α increases Ca^{2+} sensitivity of the myofilaments by increasing myosin light chain phosphorylation. In addition, these effects seem to be mediated by the RhoA/Rho-kinase signaling pathway [34].

While nNOS-derived NO is considered the major mediator of NANC relaxation in the penis, eNOS is mainly involved in endothelium-dependent relaxation [35]. In the present study, cavernosal strips from TNF- α -infused mice displayed decreased NANC relaxation associated with decreased nNOS gene expression. Although there is no report about TNF- α actions on nNOS expression in corpora cavernosa, it has been demonstrated that TNF- α infusion significantly induced an increase in MAP and reduction in renal nNOS protein expression, within both the cortex and medulla from pregnant rats [36]. Consistent with our results, TNF- α suppresses eNOS expression by inhibiting gene promoter activity [37,38], predominantly through destabilization of eNOS mRNA in endothelial cells [38]. Despite this fact, cavernosal tissue from TNF- α -infused mice did not have any changes in ACh-induced relaxation. Although counter-regulatory mechanisms may account for this response, time-dependent changes seem more likely to be involved in this apparent discrepancy. Accordingly, ED is frequently associated with CVD, where TNF- α levels are increased chronically. Similarly, although cavernosal tissue from the TNF- α -infused mice displayed increased contraction to ET-1, no differences were observed in ET-1 gene expression between the groups. Interestingly, TNF- α has been shown to enhance ET-1 secretion in endothelial cells [39]. Increased ET_A receptor gene expression demonstrated in this study may account for the increased contractile response to ET-1 in cavernosal tissue from the TNF- α -infused mice. Although real-time polymerase chain reaction is a reliable quantitative technique, several post-translational changes in gene expression may occur. Thus, additional studies to determine protein expression levels are necessary.

TNF- α plays a substantial proatherogenic role [40]. However, the presence of TNFR1 in the vascular wall causes atherosclerosis independently of macrophage infiltration [40]. In the present study, we demonstrated that cavernosal tissues from mice express TNFR1, which substantiates TNF- α action in the penis. Infusion of TNF- α tended to decrease the expression of TNFR1 in corporal tissue, which may be a negative feedback to limit TNF- α -induced changes in cavernosal tissue.

Finally, a recent study shows that cavernosal tissue from TNF- α knockout mice displays increased NANC and endothelium-dependent relaxation associated with increased nNOS and eNOS expression [35]. Moreover, sympathetic and PE-induced contractile responses were decreased in corpora cavernosa from TNF- α knockout mice, which display increased number of spontaneous erections additionally supporting our findings [35].

In summary, we have shown that TNF- α infusion causes changes in cavernosal reactivity that would facilitate ED: increased responses to adrenergic nerve stimulation and decreased NANC-dependent relaxation that are associated with decreased corporal eNOS and nNOS gene expression. Blockade of TNF- α actions may represent an alternative therapeutic approach for ED, especially in pathologic conditions associated with increased levels of this cytokine.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the National Institutes of Health (HL71138 and HL74167) and Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo—FAPESP, Brazil.

Corresponding Author: Fernando S. Carneiro, MSc, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo—Pharmacology, Sao Paulo, SP, Brazil; Medical College of Georgia—Department of Physiology, Augusta, GA, USA. Tel: 706-721-3547; Fax: 706-721-7299; E-mail: fcarneiro@mcg.edu

Conflict of Interest: None declared.

References

- 1 Muller A, Mulhall JP. Cardiovascular disease, metabolic syndrome and erectile dysfunction. *Curr Opin Urol* 2006;16:435–43.
- 2 Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: Common links. *Eur Urol* 2007;52:1590–600.
- 3 Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vasiliadou C, Alexopoulos N, Stefanadi E, Askitis A, Stefanadis C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006;27:2640–8.
- 4 Guay AT. ED2: Erectile dysfunction = endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007;36:453–63.
- 5 Jensen J, Lendorf A, Stimpel H, Frost J, Ibsen H, Rosenkilde P. The prevalence and etiology of impo-

- tence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens* 1999;12:271–5.
- 6 Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Ceylan E, Cildag O. Correlates of erectile dysfunction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respirology* 2007;12:248–53.
- 7 Moulik PK, Hardy KJ. Hypertension, anti-hypertensive drug therapy and erectile dysfunction in diabetes. *Diabet Med* 2003;20:290–3.
- 8 Tostes RC, Carneiro FS, Lee AJ, Giachini FR, Leite R, Osawa Y, Webb RC. Cigarette smoking and erectile dysfunction: Focus on NO bioavailability and ROS generation. *J Sex Med* 2008;5:1284–95.
- 9 Wei M, Macera CA, Davis DR, Hornung CA, Nankin HR, Blair SN. Total cholesterol and high density lipoprotein cholesterol as important predictors of erectile dysfunction. *Am J Epidemiol* 1994;140:930–7.
- 10 Miner M, Billups KL. Erectile dysfunction and dyslipidemia: Relevance and role of phosphodiesterase type-5 inhibitors and statins. *J Sex Med* 2008;5:1066–78.
- 11 Giugliano F, Esposito K, Di Palo C, Ciotola M, Giugliano G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J Endocrinol Invest* 2004;27:665–9.
- 12 Corona G, Mannucci E, Fisher AD, Lotti F, Petrone L, Balercia G, Bandini E, Forti G, Maggi M. Low levels of androgens in men with erectile dysfunction and obesity. *J Sex Med* 2008;5:2454–63.
- 13 Heidler S, Temml C, Broessner C, Mock K, Rauchenwald M, Madersbacher S, Pohnholzer A. Is the metabolic syndrome an independent risk factor for erectile dysfunction? *J Urol* 2007;177:651–4.
- 14 Esposito K, Ciotola M, Giugliano F, Sardelli L, Maiorino MI, Beneduce F, De Sio M, Giugliano D. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in diabetic and nondiabetic men with erectile dysfunction. *J Sex Med* 2008;5:1436–42.
- 15 Jackson G. The metabolic syndrome and erectile dysfunction: Multiple vascular risk factors and hypogonadism. *Eur Urol* 2006;50:426–7.
- 16 Corona G, Mannucci E, Petrone L, Balercia G, Paggi F, Fisher AD, Lotti F, Chiarini V, Fedele D, Forti G, Maggi M. NCEP-ATPIII-defined metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and prevalence of hypogonadism in male patients with sexual dysfunction. *J Sex Med* 2007;4:1038–45.
- 17 Guay A, Jacobson J. The relationship between testosterone levels, the metabolic syndrome (by two criteria), and insulin resistance in a population of men with organic erectile dysfunction. *J Sex Med* 2007;4:1046–55.
- 18 Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moynour CM, Coltman CA. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. *JAMA* 2005;294:2996–3002.
- 19 Pohnholzer A, Temml C, Obermayr R, Wehrberger C, Madersbacher S. Is erectile dysfunction an indicator for increased risk of coronary heart disease and stroke? *Eur Urol* 2005;48:512–8, discussion 17–8.
- 20 Berk BC, Abe JI, Min W, Surapitschat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:93–109, discussion 109–11.
- 21 Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: A double facet cytokine. *Cardiovasc Res* 1998;37:554–9.
- 22 Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Ayala A, Cain BS, Shames BD, Ao L, Banerjee A, Harken AH. Human myocardial tissue TNF α expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1683–9.
- 23 Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor- α impairs endothelium-dependent vasodilation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:695–701.
- 24 Hayward MD, Jones BK, Saparov A, Hain HS, Trillat AC, Bunzel MM, Corona A, Li-Wang B, Strenkowski B, Giordano C, Shen H, Arcamone E, Weidlick J, Vilensky M, Tugusheva M, Felkner RH, Campbell W, Rao Y, Grass DS, Buikova O. An extensive phenotypic characterization of the hTNF α transgenic mice. *BMC Physiol* 2007;7:13.
- 25 Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Leite R, Inscho EW, Tostes RC, Webb RC. Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. *J Sex Med* 2008;5:1156–66.
- 26 Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nunes KP, Ergul A, Leite R, Tostes RC, Webb RC. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:320–8.
- 27 Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1016–21.
- 28 Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997;96:3042–7.
- 29 Holm T, Aukrust P, Andreassen AK, Ueland T, Brosstad F, Froland SS, Simonsen S, Gullestad L. Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: Possible role of proinflammatory cytokines. *Clin Transplant* 2000;14:218–25.
- 30 Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, Capobianco S, Chilian WM, Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in Lep $^{r}(db)$ mice. *Circulation* 2007;115:245–54.
- 31 Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor α is transported from blood to

- brain in the mouse. *J Neuroimmunol* 1993;47:169–76.
- 32 Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. TNF- α enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R130–43.
- 33 Parris JR, Cobban HJ, Littlejohn AF, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumour necrosis factor- α activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. *J Physiol* 1999;518:561–9.
- 34 Hunter I, Cobban HJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumor necrosis factor- α -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: Role in the Ca²⁺ sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2003;63:714–21.
- 35 Musicki B, Burnett AL. eNOS function and dysfunction in the penis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006;231:154–65.
- 36 Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens* 2002;15:170–5.
- 37 Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF- α induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L452–9.
- 38 Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205–9.
- 39 Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR. Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26(3 suppl):S56–8.
- 40 Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, Orman ES, Brian L, Exum ST, Freedman NJ. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1087–94.

ANEXO C – Artigo publicado: Emerging role for TNF-alpha in erectile dysfunction.

Carneiro FS, Webb RC, Tostes RC. Emerging Role for TNF- α in Erectile Dysfunction. J Sex Med. 2010;7(12):3823-3834.

Emerging Role for TNF- α in Erectile Dysfunction

Fernando S. Carneiro, MSc,*† Robert Clinton Webb, PhD,* and Rita C. Tostes, PhD*†

*Medical College of Georgia, Department of Physiology, Augusta, GA, USA; †University of Sao Paulo, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Sao Paulo, SP, Brazil

DOI: 10.1111/j.1743-6109.2010.01762.x

ABSTRACT

Introduction. A role for cytokines in the pathophysiology of erectile dysfunction (ED) has emerged. Cytokines induce genes that synthesize other peptides in the cytokine family and several mediators, such as prostanooids, leukotrienes, nitric oxide, bradykinin, reactive oxygen species, and platelet-activating factor, all of which can affect vascular function. Consistent with the fact that the cavernosal tissue is a complex extension of the vasculature, risk factors that affect the vasculature have been shown to affect cavernosal function as well. Accordingly, the penile tissue has been recognized as an early sentinel for atherosclerosis that underlies coronary artery disease and cardiovascular diseases (CVD).

Aim. To review the literature pertaining to the role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in ED.

Methods. PubMed search for pertinent publications on the role of cytokines, particularly TNF- α , in CVD and ED.

Main Outcome Measures. Clinical and experimental evidence demonstrates that TNF- α may play a role in ED.

Results. TNF- α has been shown to play an important role in CVD, mainly due to its direct effects on the vasculature. In addition, high levels of TNF- α were demonstrated in patients with ED. In this review, we present a short description of the physiology of erection and the cytokine network. We focus on vascular actions of TNF- α that support a role for this cytokine as a potential candidate in the pathophysiology of ED, particularly in the context of CVD. A brief overview of its discovery, mechanisms of synthesis, receptors, and its main actions on the systemic and penile vasculature is also presented.

Conclusions. Considering that ED results from a systemic arterial defect not only confined to the penile vasculature, implication of TNF- α in the pathophysiology of ED offers a humoral linking between CVD and ED. **Carneiro FS, Webb RC, and Tostes RC. Emerging role for TNF- α in erectile dysfunction. J Sex Med **;**:**-**.**

Key Words. Erectile Dysfunction; TNF- α ; Cytokines; Cardiovascular Disease; Coronary Artery Disease

The Physiology of Erection

Penile erection is determined by pressure changes in the cavernosal sinuses. The vasculature of the erectile tissue differs from most vascular beds as it is composed of arterioles and hollow blood-filled sinuses, both of which are lined with smooth muscle and endothelial cells [1–3]. In the absence of arousal stimuli, cavernosal vasoconstriction maintains the penis in the non-erect state. Contraction of the cavernosal smooth muscle, mainly in response to norepinephrine (NE) released from sympathetic nerve terminals, narrows the arteriolar lumen and sinusoidal cavities, restricting blood flow to maintain low intracavernosal pressure and a non-erect

(flaccid) penis [1–3]. During sexual arousal or nocturnal tumescence, the release of nitric oxide (NO) (predominantly through the activation of neuronal nitric oxide synthase [nNOS] in nonadrenergic noncholinergic [NANC] nerves and local endothelial cells [endothelial nitric oxide synthase, eNOS]) stimulates smooth muscle relaxation [1–3]. The resulting dilation of the cavernosal arterioles and sinuses results in increased blood flow (driven by the force of the arterial blood pressure) and a subsequent rise in intracavernosal pressure. The erectile response ensues as the force of the elevated pressure expands the outer tunica albuginea of the penis, resulting in the increased penile length and diameter characteristic of erection.

Although various vasodilators have been implicated in the erectile response, NO is thought to be the principal stimulator of cavernosal vasodilation and penile erection [4–6]. NO is formed from the precursor amino acid, L-arginine, by enzymatic action of NOS, which exists as three main isoforms: nNOS, inducible nitric oxide synthase, and eNOS. All three isoforms have been detected in the penis; nevertheless, nNOS and eNOS are constitutive NOS enzymes expressed in penile tissues [5,7–9]. Upon its release, NO diffuses locally into adjacent smooth muscle cells of the corpus cavernosum and binds to soluble guanylyl cyclase, which catalyzes the conversion of guanosine triphosphate (GTP) to 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP). This cyclic nucleotide then activates protein kinase G, also known as cGMP-dependent protein kinase I, which decreases cytosolic calcium (Ca^{2+}) by various mechanisms. The decay in cytosolic Ca^{2+} concentration induces relaxation of the vascular and cavernosal smooth muscle cells, leading to dilation of arterial vessels, increased blood flow into the sinuses of the corpora cavernosa, and penile erection [10,11].

NE, released from sympathetic nerve terminals, initiates contraction via a rise in the concentration of cytoplasmic Ca^{2+} and triggers smooth muscle contraction and flaccidity. Increased intracellular Ca^{2+} enhances the binding of Ca^{2+} to calmodulin, leading to activation of myosin light chain kinase and phosphorylation of the myosin light chain (MLC_{20}) of myosin II. The extent of MLC_{20} phosphorylation or force of contraction induced by agonist stimulation is normally higher than that predicted by the actual Ca^{2+} concentration in the cell, the so-called Ca^{2+} sensitization process. Activation of the Ca^{2+} -sensitizing pathway is regulated by Ras homolog gene family (Rho), member A (RhoA), a small G-protein from the Rho family that is activated upon the binding of GTP. Activation of RhoA, which is facilitated by Rho-specific guanine nucleotide exchange factors, stimulates downstream effectors, such as Rho kinase, or ROCK. Activated ROCK phosphorylates the regulatory subunit of myosin light chain phosphatase and inhibits its activity, inhibiting MLC_{20} dephosphorylation and facilitating smooth muscle cells contraction and flaccidity [10,11]. The importance of ROCK in the Ca^{2+} sensitization of corpus cavernosum smooth muscle cells and maintenance of penile flaccidity is well established [11–13]. All the components of RhoA/ROCK signaling pathway (RhoA, phosphatase inhibitor CPI-17, myosin phosphatase regulatory

[MYPT-1] and catalytic [PP1delta] subunits, ROCK isoforms) are expressed in corpora cavernosa from several species and ROCK inhibition increases corpus cavernosum pressure in in vivo models [10,11]. Increased ROCK activity also plays critical roles in certain types of erectile dysfunction (ED) [14–19]. Rho-dependent pathways are activated by several stimuli and mediate cellular functions other than vascular smooth muscle cells contraction including actin cytoskeleton organization, cell adhesion, proliferation, migration, and inflammation, all of which are associated with vascular remodeling [20,21]. Recent evidence indicates that RhoA/ROCK is involved in the progression of target organ damage induced by vasoactive hormones, such as angiotensin II (Ang II) and aldosterone [22,23].

Based on the above information, it is reasonable to postulate that any substance that decreases relaxation mechanisms or increases contractile mechanisms in cavernosal smooth muscle cells may be a causative agent to the development of ED. In this sense, several cytokines, particularly tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$), appear as the most prominent candidate to the pathophysiology of ED due to its known effects on the vasculature.

Cytokines

Cytokines are soluble hormone-like proteins that provide communication between cells and the external environment. It is a term that comprises different protein families, such as lymphokines, monokines, interleukins (IL), colony-stimulating factors, interferons, chemokines, and TNF [24,25]. Although cytokine actions and interactions are extraordinarily complex and it seems to defy a simple understanding of their physiological function, some broad basic properties are commonly shared among cytokines: (i) pleiotropy, where a single cytokine can act on many different types of cells rather than a single cell type; (ii) redundancy, comprising a similar function that can be stimulated by different cytokines; and (iii) multifunctional referring to the fact that the same cytokine may be able to regulate several different immune functions [24].

Cytokines are secreted by white blood cells in the body in response to inflammatory stimuli [24–26]. However, it is now clear that other cells and tissues not only produce but are often major targets of cytokine effects. Among these tissues is the vascular endothelium, and a large body of evi-

dence suggests that cytokines induce a variety of structural and functional alterations in endothelial cells (often called “endothelial activation”) and that cytokine-endothelial interactions may play important roles in immunity, inflammation, and vascular injury [27–29].

Furthermore, several reports have demonstrated that cytokines modulate the tonus of the vasculature in different vascular beds [30,31], and the vascular response appears to be related to the balance between all the vasoactive factors released under the influence of cytokines. Thus, regional differences in release and responsiveness to these factors appear to contribute to the dilator or constrictor response observed within a specific vascular bed [32]. In addition, the presence of a low-grade inflammatory process is associated with many cardiovascular diseases (CVD) and, accordingly, cytokines levels, such as TNF- α , are increased in response to inflammation and contribute to the changes in vascular reactivity observed in CVD [29,33–35].

TNF- α : Its Receptors, and Signaling Pathway

TNF- α , named for its ability to cause rapid necrotic tumor regression [36], is the founding member of the TNF ligand superfamily, which is known to have pleiotropic functions including cell proliferation, differentiation, activation, and apoptosis [37]. TNF- α is primarily produced by macrophages, lymphocytes, neutrophils, keratinocytes, and fibroblasts during acute inflammatory reactions [38]. However, it has been demonstrated that

TNF- α is produced in cardiac myocytes, smooth muscle cells, and endothelial cells in response to endotoxin independent of the presence of inflammatory cells in ex vivo and in vitro cardiac studies [39,40]. Its synthesis is initiated by the transcriptional activation of the TNF- α gene, which is largely driven by several nuclear factor-kappa B (NF- κ B) responsive elements in the 5' promoter region [41]. Currently, two isoforms of TNF (TNF- α and TNF- β) have been identified and share similar inflammatory activities [42]. TNF- α is the smaller and more abundant of the two peptides, and TNF- β (first described as lymphotoxin- α) [43] is less abundant, and is thought to be produced mainly by T-cells. TNF- β will not be discussed further in this review. TNF- α receptors (TNFRs) signal as homotrimers, and can exist either as membrane-bound or as truncated soluble forms [44]. Two distinct surface receptors mediate the effects of TNF- α , TNFR-1 (p55), and TNFR-2 (p75), both receptor subtypes are found in endothelial cells [45], smooth muscle [46], human and rat cardiac myocytes [47,48]. Furthermore, gene expression of TNFR-1 has been demonstrated in cavernosal tissue [49]. The wide repertoire of signaling responses elicited by TNF results from the ability to recruit a range of adapter proteins to the receptor. Both TNFRs and associated adapter proteins contain various defined regions or motifs that have been shown to elicit specific signaling events (Figure 1). Usually, the first protein recruited to TNFR1 activation is TNFR1-associated death domain protein (TRADD), which

Figure 1 Illustration demonstrates the sequential events in the activation of TNFR1 and TNFR2 receptors by tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). Usually, TNFR1-associated death domain protein (TRADD) is the first recruited protein after TNFR1 receptor activation, which acts like an anchor of at least three additional mediators: receptor interaction protein 1 (RIP1), TNF-receptor-associated factor 2 (TRAF2), and Fas-associated death domain protein (FADD). TRAF2 stimulates antiapoptotic and inflammatory pathways, whereas FADD stimulates caspases inducing apoptotic and anti-inflammatory effects. TRAF2 is also recruited by TNFR2 receptor with TNF-receptor-associated factor 1 (TRAF1) causing inflammatory and antiapoptotic effects.

serves as a platform to recruit at least three additional mediators, receptor-interacting protein 1, Fas-associated death domain protein and TNF-receptor-associated factor 2 (TRAF2) [50–53]. TRAF2 plays a central role in early events, common to TNFR1 and TNFR2, that lead to I κ B kinase (IKK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Structural and biochemical analysis of the TRADD–TRAF2 complex reveals that TRAF2 has a higher affinity for TRADD than it has for TNFR1 or TNFR2 [52,54]. This might explain why TNF- α is a better activator of TNFR1, which uses TRADD as an adaptor, than TNFR2, which does not interact with TRADD. NF- κ B activation represents one of the most central pro-inflammatory responses elicited by TNF- α , particularly in endothelial cells [55]. NF- κ B is regulated primarily by phosphorylation of inhibitory proteins, the I κ Bs, which retain the transcription factor in the cytoplasm of nonstimulated cells [56]. In response to TNF- α and other agonists, the I κ Bs are phosphorylated by the IKK complex, resulting in their ubiquitination, degradation, and nuclear translocation of the freed NF- κ B [56]. Once in the nucleus, NF- κ B transcriptional activity can be modulated further through phosphorylation by various protein kinases that are TNF- α responsive, such as the p38 subgroup of MAPK, providing a point for cross talk with other signaling pathways. Although other signaling pathways are activated by TNF- α , such as MAPK, PI-3 Kinase/Akt, and sphingomyelinase, detailed discussion on this topic is beyond the scope of this review (more information about this topic can be obtained in comprehensive reviews [38,52,55,57–60]).

TNF- α Actions on the Vasculature

TNF- α is an important contributor to many CVD, such as myocardial ischemia–reperfusion injury, chronic heart failure, atherosclerosis, and sepsis-associated cardiovascular disorders [61–63].

Endothelial dysfunction is a key event in the pathophysiology of ED and, importantly, endothelial function is impaired in the presence of increased oxidative stress and inflammatory conditions [64]. The vascular endothelium is a major target for the actions of TNF- α in these diseases, in which TNF- α plasma levels are significantly elevated. Administration of TNF- α in vivo induces impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in a variety of vascular beds and decreases the release of NO [65]. TNF- α has the ability to increase arterial reactive oxygen species generation, which likely accounts for some of the reduction in NO

levels. Moreover, TNF- α suppresses eNOS expression by inhibiting the gene promoter activity [66,67], predominantly through destabilization of eNOS mRNA in endothelial cells [68]. In addition to its effects on endothelial function, a substantial proatherogenic role for TNF- α has recently been demonstrated [69]. The presence of TNFR1 in the vascular wall causes atherosclerosis [69].

In endothelial cells, TNF- α not only induces inflammatory gene transcription but also activation of RhoA and ROCK [70]. ROCK activation plays a role in TNF- α -induced increases in junctional permeability [71,72], as well as in TNF- α -induced actomyosin rearrangement and apoptosis [73]. Additionally, pharmacological inhibition of ROCK as well as dominant negative RhoA overexpression dramatically reduced TNF- α -induced endothelial cell permeability and apoptosis [71,73]. Degradation of inhibitor kappa-B followed by translocation of NF- κ B into the nucleus and activation of gene expression is essential in TNF- α signaling. In human umbilical cord vein endothelial cells, inhibition of RhoA reduces TNF- α -induced NF- κ B binding to DNA, via blockade of NF- κ B-translocation [74]. Finally, TNF- α leads to increased Ca²⁺ sensitivity, via activation of the RhoA/ROCK pathway, a mechanism that may contribute not only to TNF- α -induced airway hyperresponsiveness and hyperreactivity [75,76]. Conversely, inhibitors of ROCK also block TNF- α production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes [77] and burn-injured cardiomyocytes [78]. ROCK inhibitors attenuate TNF- α -induced leukocyte infiltration by inhibiting both cytoskeletal rearrangement of endothelial cells [79] and by a suppressive effect on the functions of polymorphonuclear leukocytes and expression of inflammatory cytokines [77,80–82]. All together, these observations suggest that ROCK inhibitors may display anti-inflammatory properties, by blocking TNF- α actions.

ED and Markers of CVD (Inflammatory Mediators)

ED, defined as the inability to attain and/or maintain penile erection [83], is a multifactorial condition that is estimated to affect more than 150 million men worldwide, with this number expected to double by 2025 [84,85]. Considered a major public health problem, which seriously affects the quality of life of patients and their partners, ED becomes increasingly prevalent with age. The presence of chronic illness (e.g., CVD), as well as smoking, alcohol or drug abuse, and sedentary lifestyle are major risk factors for ED [84,86].

Traditionally, ED is thought of as an outcome of occlusive systemic vascular disease that occurs as a late consequence of atherosclerosis. Prospective results from the Massachusetts Male Aging Study [87] demonstrated that ED and coronary artery diseases (CAD) share common risk factors in humans. In addition, the prevalence of ED ranges from 42% to 75% in patients with established CAD [88–91] and severity of CAD is associated with the severity of ED [91–93]. Furthermore, Montorsi and coworkers [94] reported that CAD and atherosclerotic burden determine the rate of ED: it is low in acute coronary symptoms and one-vessel disease and high in chronic coronary syndrome. However, vasculogenic ED may result not only from occlusion of the cavernosal arteries by atherosclerosis (structural vascular ED), but also from impairment of endothelial function/smooth muscle relaxation (functional vascular ED) [95–97]. Current and emerging clinical studies show that the penile vascular bed may be indeed a sensitive indicator of early systemic endothelial cell and/or smooth muscle dysfunction. In other words, ED is considered an early clinical manifestation of generalized vascular disease and carries an independent risk for cardiovascular events [98–100]. While it is clear that ED is multifactorial, longitudinal population-based studies clearly demonstrate that cardiovascular risk factors such as hypertension, dyslipidemia, central obesity, and insulin resistance are major risk factors for vasculogenic ED [101]. Furthermore, clustering of these factors, as occurs in patients with metabolic syndrome, increases the risk for the development of ED even further [102,103].

Recent evidence points to a low-grade inflammatory process as an important pathophysiologic component of CVD. Accordingly, inflammatory markers are increased in patients with hypertension and metabolic disorders, and predict the development of CVD [104]. Patients with CVD present with increased expression and plasma concentration of several inflammatory mediators, which include C-reactive protein (CRP) and adhesion molecules, such as selectins (P-selectin, E-selectin, and L-selectin), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Moreover, increased plasma levels of the primary inflammatory cytokine TNF- α and of the secondary inflammatory cytokine IL-6, as well as ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, von Willebrand factor (vWF), and CRP have been demonstrated in patients with hypertension [104]. High levels of inflammatory mediators are considered independent risk factors for the development of hyperten-

sion and may also be associated with increased risk of diabetes, CVD, and ED. Available evidence identifies inflammation as a common pathophysiologic mechanism linking ED, metabolic syndrome, and CAD [34,105–112]. Patients with ED also present with increased expression and plasma concentration of inflammatory markers and mediators, including CRP [34,106–108,110,111], adhesion molecules (P-selectin, ICAM-1, VCAM-1) [107,111], and cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-18) [34,108,111]. Importantly, plasma levels of these inflammatory markers are significantly higher in patients with ED (vs. subjects without ED) matched for age and coronary risk score [109]. In addition, levels of inflammatory markers are also increased in men with ED but without cardiovascular risk factors or overt vascular damage [107]. Finally, sexual performance has also been negatively correlated with circulating levels of endothelial prothrombotic and inflammatory parameters such as fibrinogen, vWF, IL-1 β , and IL-6 [34]. Therefore, therapeutic approaches to control vascular inflammation, particularly in patients with ED and CVD, may provide significant clinical benefits.

TNF- α and ED

Figure 2 illustrates the complex interplay between ED and CAD, where the incidence of ED and the

Figure 2 Graph demonstrates simultaneous increase in the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), erectile dysfunction (ED) and coronary artery disease (CAD). Correlation between age and plasma TNF- α levels (straight line). The dashed line illustrates the correlation between the incidence of ED and age. The age range for the first clinical symptoms of CAD is indicated by the shaded area. Adapted results from references [70,75,80–82].

Figure 3 Molecular mechanisms targeted by tumor necrosis factor- α (TNF- α) causing impairment of relaxation in the corpora cavernosa. During sexual arousal or sleep-related tumescence acetylcholine and nitric oxide (NO) are released from parasympathetic and nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerves, respectively. Whereas acetylcholine causes NO generation by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation on endothelial cells, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is responsible for NO production in NANC nerves. Upon its release, NO diffuses locally into adjacent smooth muscle cells of the corpus cavernosum and binds to soluble guanylyl cyclase, which catalyzes the conversion of guanosine triphosphate (GTP) to 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP). TNF- α decreases eNOS and nNOS expression on endothelial cells and NANC nerves, respectively, causing impairment of cavernosal relaxation. Pro-inflammatory status is evoked by TNF- α , which induces adhesion molecules, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and increases leukocyte migration. TNF- α induces changes in extracellular matrix deposition by smooth muscle cells and initiates a fibrotic state with reduced elasticity and compliance, which finally can lead to the impairment of erectile responses.

levels of TNF- α are simultaneously correlated to age [84,113,114]. It is noteworthy that CAD appears right after ED and after the levels of TNF- α start to increase [87,89,94]. Thus, TNF- α may represent not only a common link between ED and CAD, but its increasing levels associated with ED may be a predictor of cardiovascular events.

The association between low-grade inflammation and altered endothelial-prothrombotic state on one side and ED on the other in patients with and without CAD has been recently reviewed [34]. Several lines of evidence suggest that TNF- α plays a key role in inducing endothelial

dysfunction. First, clinically stable heart transplant patients exhibit a strong positive relation between plasma TNF- α and impaired vascular response to acetylcholine [115]. Second, infusion of TNF- α alone impaired endothelial function in healthy subjects, whereas infusion of IL-6 did not [116]. Of major importance, TNF- α levels are increased in serum of patients with moderate to severe ED [34,112,117], and levels of TNF- α and endothelial-prothrombotic parameters are inversely associated with sexual performance [34].

Experimental studies have demonstrated that TNF- α knockout (KO) mice exhibit changes in cavernosal reactivity that would facilitate erectile

Figure 4 Molecular mechanisms activated by tumor necrosis factor- α (TNF- α) which causes hypercontractility of cavernosal smooth muscle cells. Norepinephrine release from sympathetic nerve terminals activates α -adrenergic receptors that lead to the subsequent activation of specific G proteins and phospholipase C (PLC), which causes a rise in the concentration of cytoplasmic Ca^{2+} . Increased intracellular Ca^{2+} then activates myosin light chain (MLC) and triggers smooth muscle contraction and subsequent penile flaccidity. Activation of Ras homolog gene family member A (RhoA) which is facilitated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs), stimulates downstream effectors, such as Rho-kinase. Activated Rho-kinase phosphorylates the regulatory subunit of myosin light chain phosphatase and inhibits its activity, thus facilitating smooth muscle cells contraction and flaccidity. TNF- α increases sympathetic- and α -adrenergic agonist-mediated contractions in corpora cavernosa and activates the RhoA/Rho-kinase signaling pathway.

responses: decreased responses to adrenergic nerve stimulation and increased NANC and endothelium-dependent relaxation that are associated with increased corporal eNOS and nNOS protein levels [118].

While eNOS is mainly involved in endothelium-dependent relaxation, nNOS is considered the major mediator of NANC relaxation in the penis [4–6]. Recently, it has been shown that TNF- α decreases nNOS expression in corpora cavernosa [49]. On the other hand, TNF- α knockout animals have increased nNOS expression in cavernosal tissue [118], which suggests that TNF- α down-regulates nNOS expression in cavernosal tissue (Figure 3). Accordingly, it has been demonstrated that TNF- α infusion significantly induces an increase in mean arterial pressure and a reduction in renal nNOS protein expression, within both the cortex and medulla from pregnant rats [119].

Hayward and coworkers [120] have shown that a mouse model that overexpresses human tumor necrosis factor alpha (hTNF- α) not only exhibits

decreased induced erections but also decreased mounting behavior and number of intromissions. Conversely, TNF- α KO mice demonstrate increased number of spontaneous erections [118]. Additionally, isolated corpora cavernosa from TNF- α -infused mice display decreased NANC-dependent relaxation and increased sympathetic-mediated contractions in vitro (Figure 4), which would favor penile detumescence to occur [49]. Increased direct adrenergic responses were also observed in cavernosal tissue from TNF- α -infused mice [49]. Although TNF- α increases Ca^{2+} sensitivity in airway smooth muscle cell, the exact role on cavernosal smooth muscle remains speculative (Figure 4). Downregulation of eNOS and nNOS seems to be the mechanism underlying the functional changes in cavernosal strips from TNF- α -infused mice [49].

It is interesting to note that the penile vasculature may not be only a target of widespread inflammation generated elsewhere, but it may actively participate in the whole process. Accord-

ingly, the human corpus cavernosum has a local renin-angiotensin system (RAS) [121] and Ang II, one of the final products and the main known mediator of the RAS, which induces vascular injury through several mechanisms, including vasoconstriction, cell growth, oxidative stress production, and inflammation [122]. Similarly, the penile smooth muscle cells not only respond to but also synthesize endothelin-1 (ET-1), its converting enzyme (ECE-1), and both ET_A and ET_B receptor subtypes [123]. ET-1 not only induces vasoconstriction, but it also stimulates the expression of adhesion molecules and activates transcriptional factors responsible for the coordinated increase in the expression of many cytokines and enzymes, which can in turn lead to the production of inflammatory mediators [124,125]. Both peptides have been shown to increase TNF- α levels and this pro-inflammatory cytokine also positively regulates release of these vasoactive peptides [126–129]. More importantly, TNF- α inhibition slows the progression of hypertension and renal damage Ang II salt-sensitive hypertension [130] as well as in mineralocorticoid hypertension [131], a model where ET-1 plays a major role in end-organ damage [124,125,132,133]. In deoxycorticosterone-acetate (DOCA)-salt hypertensive animals, blockade of TNF- α actions with etanercept treatment reduces most indexes of renal inflammation independent of any blood pressure-lowering effect. In DOCA-salt hypertensive rats, TNF- α inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 excretion and lowers renal cortical NF- κ B activity. Urinary ET-1 excretion also decreases in DOCA-salt hypertensive rats on etanercept treatment along with reductions in renal cortical ICAM-1 expression [131].

It is noteworthy that diseases associated with high levels of TNF- α such as psoriasis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and chronic obstructive pulmonary disease also have been associated with ED in males and, in many cases, with sexual dysfunction in females [117,134–138]. Although these evidence indicate that TNF- α may be the causal agent of ED, TNF- α is not alone in the list of cytokines, and a myriad of effects must coexist in all of these conditions.

Further studies are essential to determine whether TNF- α plays a detrimental role in ED associated with CVD such as hypertension, diabetes, CAD, and heart failure. Finally, a key role for TNF- α in mediating smooth muscle and endothelial dysfunction is of interest not only because

markedly elevated serum levels of TNF- α have been documented in patients with ED, but also because we now have access to targeted anti-TNF- α therapies.

Corresponding Author: Fernando S. Carneiro, MSc, Medical College of Georgia, Department of Physiology, 1120 15th St., Augusta, GA, USA. Tel: 706-721-1866; Fax: 706-721-7299; E-mail: fcarneiro@mcg.edu

Conflict of Interest: None.

Statement of Authorship

Category 1

(a) Conception and Design

Fernando S. Carneiro

(b) Acquisition of Data

Fernando S. Carneiro

(c) Analysis and Interpretation of Data

Fernando S. Carneiro; Rita C. Tostes

Category 2

(a) Drafting the Article

Fernando S. Carneiro; Rita C. Tostes

(b) Revising It for Intellectual Content

Robert Clinton Webb

Category 3

(a) Final Approval of the Completed Article

Rita C. Tostes

References

- 1 Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod* 1995;52:485–9.
- 2 Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 2001;53:417–50.
- 3 Andersson KE, Stief CG. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. *World J Urol* 1997;15:14–20.
- 4 Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:843–50.
- 5 Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 1992;326:90–4.
- 6 Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med* 1996;2:288–96.
- 7 Alm P, Larsson B, Ekblad E, Sundler F, Andersson KE. Immunohistochemical localization of peripheral nitric oxide synthase-containing nerves using antibodies raised against synthesized C- and N-terminal fragments of a cloned enzyme from rat brain. *Acta Physiol Scand* 1993;148:421–9.
- 8 Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, Snyder SH, Walsh PC. Immunohistochemical

- localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol* 1993;150:73–6.
- 9 Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res* 1995;282:109–16.
- 10 Leite R, Giachini FR, Carneiro FS, Nunes KP, Tostes RC, Webb RC. Targets for the treatment of erectile dysfunction: Is NO/cGMP still the answer? *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 2007;2:119–32.
- 11 Priviero FB, Leite R, Webb RC, Teixeira CE. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:751–5.
- 12 Chitaley K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, Mills TM. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med* 2001;7:119–22.
- 13 Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV. RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J Biol Chem* 2002;277:30614–21.
- 14 Chitaley K, Webb RC, Mills TM. Rho-kinase as a potential target for the treatment of erectile dysfunction. *Drug News Perspect* 2001;14:601–6.
- 15 Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitaley K, Webb RC, Lewis RL, Mills TM, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9121–6.
- 16 Rajasekaran M, White S, Baquir A, Wilkes N. Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male Brown-Norway rats. *J Androl* 2005;26:182–8.
- 17 Seftel A. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *J Urol* 2005;173:928–9.
- 18 Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: Mechanism for age-associated erectile dysfunction. *FASEB J* 2006;20:536–8.
- 19 Park K, Kim SW, Rhu KS, Paick JS. Chronic administration of an oral Rho kinase inhibitor prevents the development of vasculogenic erectile dysfunction in a rat model. *J Sex Med* 2006;3:996–1003.
- 20 Kobayashi N, Nakano S, Mita S, Kobayashi T, Honda T, Tsubokou Y, Matsuoka H. Involvement of Rho-kinase pathway for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and cardiovascular remodeling in hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:459–66.
- 21 Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P. RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1051–6.
- 22 Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 2005;28:925–36.
- 23 Ohtsu H, Mifune M, Frank GD, Saito S, Inagami T, Kim-Mitsuyama S, Takuwa Y, Sasaki T, Rothstein JD, Suzuki H, Nakashima H, Woolfolk EA, Motley ED, Eguchi S. Signaling cross-talk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1831–6.
- 24 Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—An update. *Eur J Pharmacol* 2008;579:1–12.
- 25 Kelso A. Cytokines: Principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 1998;76:300–17.
- 26 O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28:477–87.
- 27 Cotran RS, Pober JS. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol* 1990;1:225–35.
- 28 Cotran RS, Pober JS. Effects of cytokines on vascular endothelium: Their role in vascular and immune injury. *Kidney Int* 1989;35:969–75.
- 29 Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2008;103:398–406.
- 30 Glembot TM, Britt LD, Hill MA. Endotoxin interacts with tumor necrosis factor- α to induce vasodilation of isolated rat skeletal muscle arterioles. *Shock* 1996;5:251–7.
- 31 Minghini A, Britt LD, Hill MA. Interleukin-1 and interleukin-6 mediated skeletal muscle arteriolar vasodilation: In vitro versus in vivo studies. *Shock* 1998;9:210–5.
- 32 Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1016–21.
- 33 Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagby GJ, Chilian WM. TNF- α contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:475–80.
- 34 Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vasiliadou C, Alexopoulos N, Stefanadi E, Askitis A, Stefanadis C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006;27:2640–8.
- 35 Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:219–30.
- 36 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3666–70.
- 37 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487–501.
- 38 Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372–7.
- 39 Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 1992;90:693–8.
- 40 Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995;96:1042–52.
- 41 Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990;171:35–47.
- 42 Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717–25.
- 43 Ruddle NH, Waksman BH. Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity. *Science* 1967;157:1060–2.
- 44 Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996;12:1–9.
- 45 Gaeta ML, Johnson DR, Kluger MS, Pober JS. The death domain of tumor necrosis factor receptor 1 is necessary but not sufficient for Golgi retention of the receptor and mediates receptor desensitization. *Lab Invest* 2000;80:1185–94.
- 46 Amrani Y, Ammit AJ, Panettieri RA Jr. Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: Role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2001;60:646–55.

- 47 Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients. *FEBS Lett* 1995;376:24–30.
- 48 Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995;92:1487–93.
- 49 Carneiro FS, Zemse S, Giachini FR, Carneiro ZN, Lima VV, Webb RC, Toes RC. TNF-alpha infusion impairs corpora cavernosa reactivity. *J Sex Med* 2009;6(3 suppl):311–9.
- 50 Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299–308.
- 51 Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424–7.
- 52 Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001;20:6482–91.
- 53 Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 1995;81:513–23.
- 54 Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, Myszk DG, Wu H. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000;101:777–87.
- 55 Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2001;70:317–25.
- 56 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–83.
- 57 Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:271–7.
- 58 Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. *Science* 2002;296:1634–5.
- 59 Ihnatho R, Kubes M. TNF signaling: Early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys* 2007;26:159–67.
- 60 Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45–65.
- 61 Ferrari R. Tumor necrosis factor in CHF: A double facet cytokine. *Cardiovasc Res* 1998;37:554–9.
- 62 Meldrum DR, Meng X, Dinarello CA, Ayala A, Cain BS, Shames BD, Ao L, Banerjee A, Harken AH. Human myocardial tissue TNF alpha expression following acute global ischemia in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1683–9.
- 63 Berk BC, Abe JI, Min W, Surapishchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:93–109; discussion 09–11.
- 64 Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium* 2006;13:423–9.
- 65 Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:695–701.
- 66 Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:963–9.
- 67 Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L452–9.
- 68 Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205–9.
- 69 Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, Orman ES, Brian L, Exum ST, Freedman NJ. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1087–94.
- 70 Mong PY, Petruccio C, Kaufman HL, Wang Q. Activation of Rho kinase by TNF-alpha is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2008;180:550–8.
- 71 Petrache I, Birukova A, Ramirez SI, Garcia JG, Verin AD. The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:574–81.
- 72 McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol* 2007;213:221–8.
- 73 Petrache I, Crow MT, Neuss M, Garcia JG. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:244–9.
- 74 Hippenstiel S, Schmeck B, Seybold J, Krull M, Eichel-Streiber C, Suttrop N. Reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) translocation but not inhibitor kappa-B (Ikappa-B)-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2002;64:971–7.
- 75 Hunter I, Cobban HJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Nixon GF. Tumor necrosis factor-alpha-induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: Role in the Ca^{2+} sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2003;63:714–21.
- 76 Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: Putative role of CPI-17. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:192–201.
- 77 Doe C, Bentley R, Behm DJ, Lafferty R, Stavenger R, Jung D, Bamford M, Panchal T, Grygielko E, Wright LL, Smith GK, Chen Z, Webb C, Khandekar S, Yi T, Kirkpatrick R, Dul E, Jolivet L, Marino JP Jr, Willette R, Lee D, Hu E. Novel Rho kinase inhibitors with anti-inflammatory and vasodilatory activities. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:89–98.
- 78 Horton JW, Maass DL, Ballard-Croft C. Rho-associated kinase modulates myocardial inflammatory cytokine responses. *Shock* 2005;24:53–8.
- 79 Thorlacius K, Slotta JE, Laschke MW, Wang Y, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment, and hepatocellular apoptosis in septic liver injury. *J Leukoc Biol* 2006;79:923–31.
- 80 Kawaguchi A, Ohmori M, Fujimura A. Partial protective effect of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2004;493:167–71.
- 81 Shiotani S, Shimada M, Suehiro T, Soejima Y, Yosizumi T, Shimokawa H, Machara Y. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transplantation* 2004;78:375–82.
- 82 Tasaka S, Koh H, Yamada W, Shimizu M, Ogawa Y, Hasegawa N, Yamaguchi K, Ishii Y, Richer SE, Doerschuk CM, Ishizaka A. Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:504–10.
- 83 NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA* 1993;270:83–90.
- 84 Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial

TNF- α and Erectile Dysfunction

11

- correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994;151:54–61.
- 85 Aya IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int* 1999;84:50–6.
- 86 Shabsigh R, Fishman IJ, Schum C, Dunn JK. Cigarette smoking and other vascular risk factors in vasculogenic impotence. *Urology* 1991;38:227–31.
- 87 Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, McKinlay JB. Erectile dysfunction and coronary risk factors: Prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med* 2000;30:328–38.
- 88 Hodges LD, Kirby M, Solanki J, O'Donnell J, Brodie DA. The temporal relationship between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Int J Clin Pract* 2007;61:2019–25.
- 89 Montorsi F, Briganti A, Salonia A, Rigatti P, Margonato A, Macchi A, Galli S, Ravagnani PM, Montorsi P. Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol* 2003;44:360–4; discussion 64–5.
- 90 Kloner RA, Mullin SH, Shook T, Matthews R, Mayeda G, Burstein S, Peled H, Pollock C, Choudhary R, Rosen R, Padma-Nathan H. Erectile dysfunction in the cardiac patient: How common and should we treat? *J Urol* 2003;170:S46–50; discussion S50.
- 91 Solomon H, Man JW, Wierzbicki AS, Jackson G. Relation of erectile dysfunction to angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003;91:230–1.
- 92 Akilli H, Gok H, Soylu A, Kayrak M. Severity of coronary artery disease and symptoms of erectile dysfunction in males with a positive exercise treadmill test. *Int J Urol* 2007;14:733–7.
- 93 Greenstein A, Chen J, Miller H, Matzkin H, Villa Y, Braf Z. Does severity of ischemic coronary disease correlate with erectile function? *Int J Impot Res* 1997;9:123–6.
- 94 Montorsi P, Ravagnani PM, Galli S, Rotatori F, Veglia F, Briganti A, Salonia A, Deho F, Rigatti P, Montorsi F, Fiorentini C. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: The COBRA trial. *Eur Heart J* 2006;27:2632–9.
- 95 Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Nitric oxide and penile erection: Is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc Res* 1999;43:658–65.
- 96 Montorsi P, Montorsi F, Schulman CC. Is erectile dysfunction the “tip of the iceberg” of a systemic vascular disorder? *Eur Urol* 2003;44:352–4.
- 97 Kirby M, Jackson G, Simonsen U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int J Clin Pract* 2005;59:225–9.
- 98 Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: Results of the minority health institute expert advisory panel. *J Sex Med* 2005;2:40–50; discussion 50–2.
- 99 Pongholzer S, Temml C, Obermayr R, Wehrberger C, Madersbacher S. Is erectile dysfunction an indicator for increased risk of coronary heart disease and stroke? *Eur Urol* 2005;48:512–8; discussion 17–8.
- 100 Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moynour CM, Coltman CA. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. *JAMA* 2005;294:2996–3002.
- 101 Grover SA, Lowensteyn I, Kaouache M, Marchand S, Coupal L, DeCarolis E, Zoccoli J, Defoy I. The prevalence of erectile dysfunction in the primary care setting: Importance of risk factors for diabetes and vascular disease. *Arch Intern Med* 2006;166:213–9.
- 102 Jackson G. The metabolic syndrome and erectile dysfunction: Multiple vascular risk factors and hypogonadism. *Eur Urol* 2006;50:426–7.
- 103 Heidler S, Temml C, Broessner C, Mock K, Rauchenwald M, Madersbacher S, Pongholzer A. Is the metabolic syndrome an independent risk factor for erectile dysfunction? *J Urol* 2007;177:651–4.
- 104 Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:375–84.
- 105 Sullivan ME, Miller MA, Bell CR, Jagroop IA, Thompson CS, Khan MA, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Fibrinogen, lipoprotein (a) and lipids in patients with erectile dysfunction. A preliminary study. *Int Angiol* 2001;20:195–9.
- 106 Billups KL, Kaiser DR, Kelly AS, Wetterling RA, Tsai MY, Hanson N, Bank AJ. Relation of C-reactive protein and other cardiovascular risk factors to penile vascular disease in men with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2003;15:231–6.
- 107 Bocchio M, Desideri G, Scarpelli P, Necozione S, Properzi G, Spartera C, Francavilla F, Ferri C, Francavilla S. Endothelial cell activation in men with erectile dysfunction without cardiovascular risk factors and overt vascular damage. *J Urol* 2004;171:1601–4.
- 108 Giugliano F, Esposito K, Di Palo C, Ciotola M, Giugliano G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J Endocrinol Invest* 2004;27:665–9.
- 109 Chiurlia E, D'Amico R, Ratti C, Granata AR, Romagnoli R, Modena MG. Subclinical coronary artery atherosclerosis in patients with erectile dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1503–6.
- 110 Esposito K, Giugliano F, Martedì E, Feola G, Marfella R, D'Armiento M, Giugliano D. High proportions of erectile dysfunction in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2005;28:1201–3.
- 111 Eaton CB, Liu YL, Mittleman MA, Miner M, Glasser DB, Rimm EB. A retrospective study of the relationship between biomarkers of atherosclerosis and erectile dysfunction in 988 men. *Int J Impot Res* 2007;19:218–25.
- 112 Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: Common links. *Eur Urol* 2007;52:1590–600.
- 113 Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40–69 years old: Longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol* 2000;163:460–3.
- 114 Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Advancing age and insulin resistance: Role of plasma tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol* 1998;275:E294–9.
- 115 Holm T, Aukrust P, Andreassen AK, Ueland T, Brosstad F, Froland SS, Simonsen S, Gullestad L. Peripheral endothelial dysfunction in heart transplant recipients: Possible role of proinflammatory cytokines. *Clin Transplant* 2000;14:218–25.
- 116 Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997;96:3042–7.
- 117 Karadag F, Ozcan H, Karul AB, Ceylan E, Cildag O. Correlates of erectile dysfunction in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respirology* 2007;12:248–53.
- 118 Carneiro FS, Sturgis LC, Giachini FR, Carneiro ZN, Lima VV, Wynne BM, San Martin S, Brands MW, Tostes RC, Webb RC. TNF- α knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation. *J Sex Med* 2009;6:115–25.

- 119 Alexander BT, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens* 2002;15:170–5.
- 120 Hayward MD, Jones BK, Saparov A, Hain HS, Trillat AC, Bunzel MM, Corona A, Li-Wang B, Strenkowski B, Giordano C, Shen H, Arcamone E, Weidlick J, Vilensky M, Tugusheva M, Felkner RH, Campbell W, Rao Y, Grass DS, Buiakova O. An extensive phenotypic characterization of the hTNF α transgenic mice. *BMC Physiol* 2007;7:13.
- 121 Kifer I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, Dluhy RG. Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol* 1997;157:1920–5.
- 122 Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: Role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H435–46.
- 123 Granchi S, Vannelli GB, Vignozzi L, Crescioli C, Ferruzzi P, Mancina R, Vinci MC, Forti G, Filippi S, Luconi M, Ledda F, Maggi M. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1053–64.
- 124 Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005;43:19–29.
- 125 Tostes RC, Muscara MN. Endothelin receptor antagonists: Another potential alternative for cardiovascular diseases. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:287–301.
- 126 Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF- α . *Am J Physiol* 1992;262:C854–61.
- 127 Ferreri NR, Zhao Y, Takizawa H, McGiff JC. Tumor necrosis factor- α -angiotensin interactions and regulation of blood pressure. *J Hypertens* 1997;15:1481–4.
- 128 Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Ling Y, Fallon MB. ET-1 and TNF- α in HPS: Analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G294–303.
- 129 Kagawa T, Takao T, Horino T, Matsumoto R, Inoue K, Morita T, Hashimoto K. Angiotensin II receptor blocker inhibits tumor necrosis factor- α -induced cell damage in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton)* 2008;13:309–15.
- 130 Elmarakby AA, Quigley JE, Pollock DM, Imig JD. Tumor necrosis factor α blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2006;47:557–62.
- 131 Elmarakby AA, Quigley JE, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM. TNF- α inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:R76–83.
- 132 Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nunes KP, Ergul A, Leite R, Tostes RC, Webb RC. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:320–8.
- 133 Carneiro FS, Nunes KP, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nogueira EF, Leite R, Ergul A, Rainey WE, Clinton Webb R, Tostes RC. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *J Sex Med* 2008;5:2793–807.
- 134 Ermercan AT. Sexual dysfunction in dermatological diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;9:985–1117.
- 135 Blake DJ, Maisiak R, Koplan A, Alarcon GS, Brown S. Sexual dysfunction among patients with arthritis. *Clin Rheumatol* 1988;7:50–60.
- 136 Dincer U, Cakar E, Kiralp MZ, Dursun H. Assessment of sexual dysfunction in male patients with Ankylosing Spondylitis. *Rheumatol Int* 2007;27:561–6.
- 137 Cakar E, Dincer U, Kiralp MZ, Taskaynatan MA, Yasar E, Bayman EO, Ozgul A, Dursun H. Sexual problems in male ankylosing spondylitis patients: Relationship with functionality, disease activity, quality of life, and emotional status. *Clin Rheumatol* 2007;26:1607–13.
- 138 Pirildar T, Muezzinoglu T, Pirildar S. Sexual function in ankylosing spondylitis: A study of 65 men. *J Urol* 2004;171:1598–600.

ANEXO D – Curriculum Vitae

Fernando Silva Carneiro

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Doutorado em Farmacologia. Em andamento.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF- α) NA FISIOPATOLOGIA DA DISFUNÇÃO ERÉTIL
Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2004 - 2006** Mestrado em Farmacologia.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Efeito da vitamina E sobre a reatividade vascular e o comportamento leucocitário em ratos hipertensos DOCA-Sal. Ano de obtenção: 2006
Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2004** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
- 1995 - 1997** Ensino Médio (2º grau).
Escola Estadual de 1º e 2º graus Juscelino Kubitschek de Oliveira, JKO, Brasil, Ano de obtenção: 1997
- 1987 - 1994** Ensino Fundamental (1º grau).
Escola Estadual de 1º e 2º Graus João Nepomuceno de Medeiros Mallet, EEJNMM, Brasil

Formação complementar

- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Programa de aperfeiçoamento ao ensino.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Curso de Proteção Radiológica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Treinamento no uso de animais de experimentação.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Biossegurança em laboratórios.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Introdução a Análises Instrumentais.
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil

2003 - 2003	Extensão universitária em Campanha Sol e Saúde. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
2002 - 2002	Extensão universitária em Levando Saúde Através da Água. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
2002 - 2002	Curso de curta duração em Curso de Preparação e aplicação de injetáveis. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
2001 - 2002	Curso de curta duração em Atividades Didáticas e Manuseio de animais de lab. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil, Ano de obtenção: 2002
2002 - 2002	Extensão universitária em I Simpósio de integração do ICLMA. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil, Ano de obtenção: 2003
2001 - 2002	Curso de curta duração em Técnicas Cirúrgicas e Manuseio de Animais de Lab. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil, Ano de obtenção: 2002
2001 - 2001	Curso de curta duração em Inglês Basic Two. FISK, Brasil
2000 - 2000	Curso de curta duração em Inglês Basic One. FISK, Brasil
1998 - 1998	Curso de curta duração em Leitura e Produção de Textos. Universidade do Estado de Mato Grosso, UNEMAT, Cáceres, Brasil

Atuação profissional

1. Centro Acadêmico de Farmácia José Jacarandá - CAFAR- UFMT

Vínculo institucional

1999 - 2000 Presidente do CAFAR

Atividades

06/1999 - 05/2000 Direção e Administração, Diretoria, Presidência

*Cargos Ocupados:
Presidência do CAFAR*

2. Congregação do ICLMA - CICLMA

Vínculo institucional

1999 - 2000 Representante discente na congregação do ICLMA .

Atividades

09/1999 - 05/2000 Conselhos, Comissões e Consultoria

Especificação:

Portaria ICLMA 001/99 Representante Discente na Congregação do ICLMA

Revisor de periódico

1. Asian Journal of Andrology -
2. Journal of Pharmacy and Pharmacology -
3. International Medical Journal for Experimental and Clinical Research -
4. The Journal of Sexual Medicine -
5. Expert Opinion on Therapeutic Targets -
6. Journal of Pain Research -
7. Internation Journal of Hypertension -
8. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology -

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Bem
Português	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2009 Graduate Research Symposium, Department of Physiology - Medical College of Georgia

2007	Merck New Young Investigator Award, American Heart Association
2007	Travel award 10th conference on endothelin, Tenth International conference on endothelin
2006	Merck Latin America New Investigator Award, American Heart Association
2005	Travel award, 9th conference on endothelin, Ninth International conference on endothelin

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Carneiro, FS**, Webb, RC, Tostes, RC. Emerging Role for TNF- α in Erectile Dysfunction. The Journal of Sexual Medicine (Print). , p.Mar 15 - , 2010.
2. **Carneiro, FS**, Giachini, FRC, Carneiro, ZN, Lima, VV, Ergul, A, Webb, RC, Tostes, RC. Erectile Dysfunction in Young Non-Obese Type II Diabetic Goto-Kakizaki Rats is Associated with Decreased eNOS Phosphorylation at Ser1177. The Journal of Sexual Medicine (Print). , p.no - no, 2010.
3. Lima, VV, Giachini, FR, **Carneiro, FS**, Carvalho, MHC, Fortes, ZB, Webb, RC, Tostes, RC. O-GlcNAcylation contributes to the vascular effects of ET-1 via activation of the RhoA/Rho-kinase pathway. Cardiovascular Research. , p.01 - 02, 2010.
4. Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Brands, MW, Webb, RC, Tostes, RC. A key role for Na⁺/K⁺-ATPase in the endothelium-dependent oscillatory activity of mouse small mesenteric arteries. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Impresso). , v.42, p.1058 - , 2009.
5. Giachini, FRC, Osmond, DA, Zhang, S, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Inscho, EW, Webb, RC, Tostes, RC. Clopidogrel, independent of the vascular P2Y receptor, improves arterial function in small mesenteric arteries from AngII-hypertensive rats. Clinical Science (1979). , v.118, p.463 - 471, 2009.
6. Giachini, FR, Sullivan, JC, LIMA, VV, **Carneiro, FS**, Fortes, ZB, Pollock, DM, Carvalho, MHC, Webb, RC, Tostes, RC. Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Activation, via Downregulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1, Mediates Sex Differences in Desoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension Vascular Reactivity. Hypertension (Dallas, Tex. 1979). , v.55, p.172 - 179, 2009.
7. Lima, VV, Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Carneiro, ZN, Fortes, ZB, Carvalho, MHC, Webb, RC, Tostes, RC. Impaired vasodilator activity in DOCA-salt hypertension is associated with increased protein O-GlcNAcylation. Hypertension (Dallas). , v.53, p.166 - 174, 2009.
8. Giachini, FRC, Chiao, CW, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Carvalho, MHC, Fortes, ZB, Webb, RC, Tostes, RC. Increased activation of STIM-1/Orai-1 in aorta from hypertensive rats: a novel insight into vascular dysfunction. Hypertension (Dallas). , v.53,

p.409 - 416, 2009.

9. Giachini, FRC, Zemse, S, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Callera, GE, Ergul, A, Webb, RC, Tostes, RC. Interleukin-10 attenuates vascular responses to endothelin-1, via effects on ERK1/2-dependent pathway, in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* , v.296, p.H489 - H496, 2009.

10. Lima, VV, Giachini, FR, **Carneiro, FS**, Carneiro, ZN, Saleh, MA, Pollock, DM, Fortes, ZB, Carvalho, MHC, Ergul, A., Webb, RC, Tostes, RC. O-GlcNAcylation Contributes to Augmented Vascular Reactivity Induced by Endothelin 1. *Hypertension (Dallas, Tex. 1979).* , v.55, p.180 - 188, 2009.

11. **Carneiro, FS**, Zemse, S, Giachini, FRC, Carneiro, ZN, LIMA, VV, Webb, RC, Tostes, RC. TNF- α infusion impairs cavernosal function. *The Journal of Sexual Medicine.* , v.6, p.311 - 319, 2009.

12. **Carneiro, FS**, Sturgis, LC, Giachini, FRC, Carneiro, ZN, LIMA, VV, Wynne, BM, MARTIN, SS, BRANDS, MW, Tostes, RC, Webb, RC. TNF- α knockout mice have increased corpora cavernosa relaxation. *The Journal of Sexual Medicine.* , v.6, p.115 - 125, 2009.

13. Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Dorrance, A, Webb, RC, Tostes, RC. Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Translational Research.* , v.154, p.183 - 193, 2009.

14. **Carneiro, FS**, Nunes, KP, Giachini, FRC, Lima, VV, Carneiro, ZN, Nogueira, EF, Leite, R, Ergul, A, Rainey, WE, Webb, RC, Tostes, RC. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *The Journal of Sexual Medicine.* , v.2, p.2793 - , 2008.

15. **Carneiro, FS**, Giachini, FRC, Lima, VV, Carneiro, ZN, Leite, R, Inscho, EW, Tostes, RC, Webb, R C. Adenosine actions are preserved in corpus cavernosum from obese and type II diabetic db/db mouse. *The Journal of Sexual Medicine.* , v.5, p.1156 - 1166, 2008.

16. Tostes, RC, **Carneiro, FS**, Lee, AJ, Giachini, FRC, Leite, R, Osawa, Y, Webb, RC. Cigarette smoking and erectile dysfunction: Focus on NO bioavailability and ROS generation. *The Journal of Sexual Medicine.* , v.5, p.1284 - 1295, 2008.

17. **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Nunes, KP, Ergul, A, Leite, R, Tostes, RC, Webb, RC, Giachini, FRC. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* , v.86, p.320 - 328, 2008.

18. Lima, VV, Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Carneiro, ZN, Fortes, ZB, Carvalho, MHC, Webb, RC, Tostes, RC. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli. *Journal of the american society of hypertension.* , v.2, p.410 - 417, 2008.

19. **Carneiro, FS**, Carneiro, ZN, Giachini, FRC, Lima, VV, Nogueira, EF, Rainey, WE, Tostes, RC, Webb, RC. Murine and rat cavernosal responses to endothelin-1 and urotensin-II. *Journal of the american society of hypertension.* , v.2, p.439 - 447, 2008.

20. Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Lima, VV, Carneiro, ZN, Carvalho, MHC, Fortes, ZB, Webb, RC, Tostes, RC. Pyk2 mediates increased adrenergic contractile responses in arteries from DOCA-salt mice. *Journal of the american society of hypertension.* , v.2, p.431 - 438, 2008.
21. Giachini, FRC, Callera, GE, **Carneiro, FS**, Tostes, RC, Webb, RC. Therapeutic targets in hypertension: is there a place for antagonists of the most potent vasoconstrictors?. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* , v.12, p.327 - 339, 2008.
22. Tostes, RC, Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Leite, R, Inscho, EW, Webb, RC. Determination of adenosine effects and adenosine receptors in murine corpus cavernosum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (Online).* , v.322, p.1 - 8, 2007.
23. Leite, R, Giachini, FRC, **Carneiro, FS**, Nunes, KP, Tostes, RC, Webb, RC. Targets for the treatment of erectile dysfunction: Is NO/cGMP still the answer? Recent patents on cardiovascular drug discovery. , v.2, p.119 - 132, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CARNEIRO, F. S., Carneiro, ZN, GIACHINI, F. R. C., LIMA, V. V., WEBB, R. C., Tostes, R.C. DOCA-salt hypertensive rats display decreased vascular reactivity to urotensin-II In: *Experimental Biology 2009*, 2009, New Orleans. **Experimental Biology 2009.** , 2009.
2. Carneiro, ZN, CARRILO-SEPULVEDA, M. A., CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., LIMA, V. V., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Hyperthyroid rats display increased adrenergic-mediated contraction in cavernosal tissue In: *Experimental Biology 2009*, 2009, New Orleans. **Experimental Biology 2009.** , 2009.
3. NUNES, K. P., CARNEIRO, F. S., CORDEIRO, M. N., PRIVIERO, F. B., Tostes, R.C., De Lima, M. H., LEITE, R., WEBB, R. C. nNOS mediates relaxation in corpus cavernosum mice strips improved by Tx2-6 toxin from Phoneutria nigriventer spider via cGMP increase In: *Experimental Biology 2009*, 2009, New Orleans. **Experimental Biology 2009.** , 2009.
4. GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., LIMA, V. V., Carneiro, ZN, DORRANCE, A. M., Tostes, R.C., WEBB, R. C. Sex differences in vascular expression and activation of STIM/Orai-1 during hypertension: focus on calcium regulation In: *Experimental Biology 2009*, 2009, New Orleans. **Experimental Biology 2009.** , 2009.
5. CARNEIRO, F. S., STURGIS, L. C., GIACHINI, F. R. C., Carneiro, ZN, LIMA, V. V., Wynne, BM, MARTIN, S. S., BRANDS, M. W., Tostes, R.C., WEBB, R. C. A role for TNF alpha on cavernosal function in mice In: *American Urological Associação summer research conference*, 2008, Baltimore. **American Urological Associação summer research conference.** , 2008.
6. LIMA, V. V., GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., Carneiro, ZN, SALEH, M. D., POLLOCK, D. M., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Augmented vascular reactivity induced by ET-1 is associated with increased O-GlcNAcylation In: *Experimental Biology 2009*, 2009,

New Orleans. **Experimental Biology 2009.** , 2008.

7. CARNEIRO, F. S., Carneiro, ZN, GIACHINI, F. R. C., LIMA, V. V., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Differential endothelium-dependent relaxation in cavernosal strips from mice and rats: What does that imply? In: Joint Congress of the international and European societies for sexual medicine 2008, 2008, Bruxelas. **Joint Congress of the international and European societies for sexual medicine 2008.** , 2008.

8. CARNEIRO, F. S., NUNES, K. P., GIACHINI, F. R. C., Carneiro, ZN, LIMA, V. V., NOGUEIRA, E. F., LEITE, R., RAINEY, W. E., ERGUL, A., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Endothelin-1 (ET-1) contributes to erectile dysfunction in DOCA-salt hypertensive rats In: 62nd Annual High Blood Pressure Research Conference, 2008, Atlanta. **Hypertension.** American Heart Association, 2008. v.52. p.e52 - e52

9. CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., Carneiro, ZN, LIMA, V. V., ERGUL, A., Tostes, R.C., WEBB, R. C. Increased cavernosal relaxation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats In: Experimental Biology 2008, 2008, San Diego. **Experimental Biology 2008.** , 2008.

10. GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., LIMA, V. V., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Increased vascular contractile responses to phenylephrine in DOCA-salt mice is normalized by PYK2 blockade In: Experimental Biology 2008, 2008, San Diego. **Experimental Biology 2008.** , 2008.

11. Carneiro, ZN, CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., LIMA, V. V., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Murine and rat cavernosal responses to endothelin-1 and urotensin-II In: Experimental Biology 2008, 2008, San Diego. **Experimental Biology 2008.** , 2008.

12. CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., LEITE, R., WEBB, R. C., Tostes, R.C. A key role for Rho-kinase in ET-1-induced corpora cavernosum contraction on DOCA-salt hypertensive mice In: ET-10 Tenth international conference on Endothelin, 2007, Bergamo. **ET-10 Tenth international conference on Endothelin.** , 2007.

13. GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., LEITE, R., PRIVIEIRO, F. B., CHAO, C. W., WEBB, R. C., Tostes, R.C. A key role for the Na/K ATPase Pump in the endothelium-dependent oscillatory activity of mouse resistance mesenteric arteries: Pharmacological evidence In: 61th Annual High Blood Pressure Research Conference 2007, 2007, Tucson. **Hypertension.** , 2007.

14. CARNEIRO, F. S., STURGIS, L. C., GIACHINI, F. R. C., LANE, K., LEITE, R., BRANDS, M. W., Tostes, R.C., WEBB, R. C. A role for TNF alpha on the functional alterations of cavernosal strips in Angiotensin II hypertensive mice. In: 61st Annual High Blood Pressure Research Conference 2007, 2007, Tucson. **Hypertension.** , 2007. v.50. p.e79 - e79

15. GIACHINI, F. R. C., Zemse, S, CARNEIRO, F. S., ERGUL, A., WEBB, R. C., Tostes, R.C. Interleukin-10 modulates vascular responses to Endothelin-1 in vivo In: ET-10 Tenth international conference on Endothelin, 2007, Bergamo. **ET-10 Tenth international conference on Endothelin.** , 2007.

16. CARNEIRO, F. S., Callera, G. E., SOUZA, H. P., RODRIGUES, S. F., Montezano, A.C.,

Nigro, D., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H.C., Tostes, R.C. Vitamin E effects on leukocyte-endothelial cells interactions in DOCA-salt hypertensive rats In: 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, 2006, San Antonio. **Hypertension.** , 2006. v.48.

17. CARNEIRO, F. S., Callera, G. E., Montezano, A.C., Carvalho, M.H.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., Tostes, R.C. Efeito da vitamina E sobre a reatividade vascular e o comportamento leucocitário em ratos hipertensos DOCA-sal In: IV Congresso do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005, São Paulo. **IV Congresso do ICB-USP.** , 2005.

18. CARNEIRO, F. S., Callera, G. E., Montezano, A.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H.C., Tostes, R.C. Efeito da vitamina E sobre o comportamento leucocitário e reatividade vascular em ratos hipertensos DOCA-SAL In: FESBE-2005, 2005, Águas de Lindóia. **FESBE-2005.** , 2005.

19. YOGI, A., Callera, G. E., CARNEIRO, F. S., Nigro, D., Carvalho, M.H.C., Fortes, Z.B., TOUYZ, R. M., Tostes, R.C. ET-1 induced MAP kinases activation involves c-Src independent mechanisms in DOCA-salt hypertension: Role of oxidative stress In: Ninth international conference on Endothelin, 2005, Utah. **ET-9 Ninth international conference on Endothelin.** , 2005.

20. MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Alteração dos valores bioquímicos na excreção de ácido úrico em ratos Wistar com uso da Artemisia absinthium (losna), Alopurinol e Benzbromarona In: VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá-MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

21. GARDIANO, V. K., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Comparação dos efeitos diuréticos, uricosúricos, glicosúricos e a excreção de sódio e potássio de Phyllanthus niruri, furosemida, espironolactona e hidroclorotiazida, através de análises bioquímicas na urina de ratos Wistar machos In: VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá-MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

22. GARDIANO, V. K., GIACHINI, F. R. C., MORZELLE, L. C. C., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Efeitos diuréticos, caluréticos, uricosúricos e glicosúricos com Phyllanthus niruri (quebra-pedra), Equisetum arvense (cavalinha) e Foeniculum vulgare (funcho) In: VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá- MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

23. MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Parâmetros Bioquímicos de Rattus norvegicus (wistar) do Biotério do Campus Universitário do Pontal do Araguaia In: VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá- MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

24. GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., DAVID, F. L. Perfil da dislipidemia, glicemia e uricemia na população de Barra do Garças-MT: Uma associação ao alto risco de cardiopatias In: VI Congresso Regional de Análises

Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá-MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

25. MORZELLE, L. C. C., CARNEIRO, F. S., GARDIANO, V. K., GIACHINI, F. R. C., SILVA, E. F., BOHAZUCK, T. B., CARDOSO, G., GOMES, M. N., DAVID, F. L. Perfil da qualidade da água distribuída aos reservatórios da cidade de Barra do Garças e Campus Universitário do ICLMA/UFMT através de análise microbiológica, realizado por alunos do Curso de Farmácia da UFMT In: VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste, 2004, Cuiabá-MT. **VI Congresso Regional de Análises Clínicas do Centro-Oeste.** , 2004.

26. MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L., TOLEDO, O. R. Avaliação do consumo de medicamentos psicotrópicos distribuídos pela Rede Pública de Saúde de Barra do Garças In: I Mostra de Extensão Universitária, 2003, Barra do Garças. **I Mostra de Extensão Universitária.** , 2003. p.48 - 48

27. CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Avaliação do efeito diurético, caliurético, natriurético, uricosúrico e glicosúrico de Duguetia furfuracea (sofre-do-rim-quem-quer) orientada por informações etnofarmacológicas In: I Mostra de Extensão Universitária, 2003, Barra do Garças.

I Mostra de Extensão Universitária. , 2003. p.46 - 46

28. CARNEIRO, F. S., MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., GIACHINI, F. R. C. Efeitos Diuréticos da Quebra Pedra (*Phyllanthus niruri*) da Cavalinha (*Equisetum arvense*), furosemida e Hidroclorotiazida em ratos Wistar In: XI Encontro de Iniciação científica, 2003, Cuiabá. **XI Encontro de Iniciação científica.** , 2003. p.145 - 145

29. CARNEIRO, F. S., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., GARDIANO, V. K., DAVID, F. L. Efeitos diuréticos do Funcho (*Foeniculum vulgare*), Quebra-Pedra (*Phyllanthus niruri*), Cavalinha (*Equisetum arvense*), Espironolactona, Furosemida e Hidroclorotiazida em ratos Wistar In: 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2003, Goiânia. **Revista do 4º Congresso de Medicamentos Genéricos.** , 2003. p.21 - 21

30. MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., GARDIANO, V. K., DAVID, F. L. Efeitos Diuréticos do Funcho (*Foeniculum vulgare*), Quebra-Pedra (*Phyllanthus niruri*), Cavalinha (*Equisetum arvense*), Espironolactona, Hidroclorotiazida e Furosemida em ratos Wistar In: 6ª Jornada Farmacêutica UNAERP, 2003, Ribeirão Preto. **Revista da 6ª Jornada Farmacêutica UNAERP.** , 2003. p.24 - 24

31. CARNEIRO, F. S., GARDIANO, V. K., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., DAVID, F. L. Fatores preditivos da auto-medicação e o uso de plantas medicinais como forma de terapias alternativas em Pontal do Araguaia – MT In: VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003, Águas de São Pedro. **VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais.** , 2003.

32. GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., DAVID, F. L. Incrementos na diurese produzido pelo funcho (*F. vulgare*), quebra-pedra (*P. niruri*), cavalinha (*E. arvense*) espirolactona, furosemida e hidroclorotiazida In: VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003, Águas de São Pedro. **VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais.** , 2003.

33. CARDOSO, G., MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., GOMES, M. N., BOHAZUCK, T. B., SILVA, E. F., DAVID, F. L. Levando Saúde Através da Água In: I Mostra de Extensão Universitária, 2003, Barra do Garças. **I Mostra de Extensão Universitária.** , 2003. p.25 - 25

34. CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., GOMES, M. N., CARDOSO, G., SILVA, E. F., DAVID, F. L., SILVA, P. J. Organização da Temporada 2003 da Praia da Arara, Pontal do Araguaia - MT: Praia para todos de 0 até perder de vista. In: Praia para todos de 0 até perder de vista., 2003, Pontal do Araguaia. **I Mostra de Extensão Universitária.** , 2003. p.24 - 24

35. GIACHINI, F. R. C., CARNEIRO, F. S., MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., DAVID, F. L., TOLEDO, O. R. Perfil do Consumo de Medicamentos Psicotrópicos Distribuídos Gratuitamente Pela Rede Pública de Saúde de Barra do Garças In: 6ª Jornada Farmacêutica UNAERP, 2003, Ribeirão Preto. **6ª Jornada Farmacêutica UNAERP.** , 2003. p.18 - 18

36. MORZELLE, L. C. C., GIACHINI, F. R. C., GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., DAVID, F. L. Phyllanthus niruri (Quebra -Pedra) e Artemisia absinthium (Losna): Efeitos Diuréticos, Uricosúricos e Glicosúricos In: 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2003, Goiânia. **Revista do 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos.** , 2003. p.21 - 22

37. GARDIANO, V. K., MORZELLE, L. C. C., CARNEIRO, F. S., GIACHINI, F. R. C., TOLEDO, O. R., DAVID, F. L. Relação entre diagnóstico e consumo de Diazepam pelos pacientes da Rede Pública de Saúde de Barra do Garças - MT In: 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2003, Goiânia. **Revista 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos.** , 2003. p.22 - 22

38. GIACHINI, F. R. C., MORZELLE, L. C. C., GARDIANO, V. K., CARNEIRO, F. S., TOLEDO, O. R., DAVID, F. L. Utilização de Medicamentos Psicotrópicos Distribuídos Pela Rede Pública de Saúde de Barra do Garças In: 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2003, Goiânia. **Revista do 4º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos.** , 2003. p.20 - 21

39. CARNEIRO, F. S. Medicamentos Genéricos consumidos pela População de Barra do Garças MT In: IX Congresso Científico Brasileiro dos Estudantes de Farmácia, 2002, Vitória. **IX Congresso Científico Brasileiro dos Estudantes de Farmácia/XXV Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia.** Espírito Santo: Editora da Universidade Federal do Espírito Santo/Centro Biomédico - curso Farmácia, 2002. v.1. p.46 - 46

40. CARNEIRO, F. S. Perfil do Consumo de Medicamentos Genéricos pela População de Barra do Garças MT In: . 3º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2002, Goiania. **3º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos.** Goiania: . 3º Congresso Brasileiro de Medicamentos Genéricos, 2002. v.1. p.5 - 6

Citações em bases bibliográficas

Web of Science

Número total de citações : 66;

Número de trabalhos : 23 Data : 19/06/2010; Fator H: 5;

Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:

Carneiro FS