

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS  
BIOATIVOS**

**VALERIA LOPES DE ASSIS**

**EFEITOS DO LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
CASCA DA RAIZ DE *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham EM  
RATOS DIABÉTICOS COM DISFUNÇÃO ERÉTIL**

**JOÃO PESSOA**

**2016**

**VALERIA LOPES DE ASSIS**

**EFEITOS DO LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
CASCA DA RAIZ DE *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham EM  
RATOS DIABÉTICOS COM DISFUNÇÃO ERÉTIL**

Tese apresentada ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR**.  
Área de Concentração: **FARMACOLOGIA**.

**Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**JOÃO PESSOA**

**2016**

**Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

A848e Assis, Valeria Lopes de.

Efeitos do liofilizado do extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham em ratos diabéticos com disfunção erétil / Valeria Lopes de Assis. - João Pessoa, 2016.

143 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia. 2. Disfunção erétil - Ratos diabéticos. 3. *Dioclea grandiflora*. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Título.

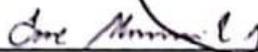
UFPB/BC

VALERIA LOPES DE ASSIS

EFEITOS DO LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
CASCA DA RAIZ DE *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham EM  
RATOS DIABÉTICOS COM DISFUNÇÃO ERÉTIL

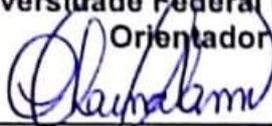
Tese de Doutorado aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

Banca examinadora



---

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador



---

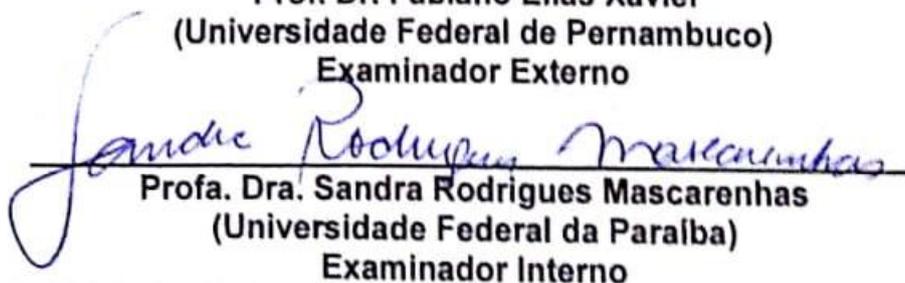
Profa. Dra. Caliana Maria Bezerra Luna Lima  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Evandro Leite Souza  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Externo

---

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier  
(Universidade Federal de Pernambuco)  
Examinador Externo



---

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno

# *Dedicatória*

---

À **Deus** e à **Nossa Senhora**, que estiveram comigo durante toda esta jornada, dando-me força, fé e coragem suficientes para enfrentar todos os desafios. Agradeço-lhes por toda cura, saúde, providência e perseverança derramadas sobre mim durante o desenvolvimento do meu doutorado.

Aos meus pais, **Jailson e Maria da Salete**, por serem meu alicerce e minha inspiração. Foi com vocês que eu aprendi a buscar sempre mais e dar sempre o melhor de mim em tudo.

Aos meus irmãos **Vinícius, Vagner e Victor**, pelo companheirismo, amizade e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu amado marido, **Alexandre**, que pacientemente me apoiou, ajudou e amou durante estes últimos quatro anos. Foi ele um dos meus principais incentivadores, que nunca me deixou desistir e que enfrentou ao meu lado todos os obstáculos encontrados.

# *Agradecimientos*

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Isac Almeida de Medeiros**, pela orientação, confiança e incentivo, os quais foram imprescindíveis para minha formação pessoal e profissional. Serei eternamente grata;

Ao Prof. Dr. **Robson Cavalcante Veras**, que foi um dos grandes responsáveis pelo meu ingresso e continuidade na pós-graduação. Obrigada por toda atenção, disponibilidade e amizade oferecidas em todos estes anos;

À Prof. Dra. **Thais Porto**, por toda dedicação e disponibilidade, cujas críticas e sugestões foram indispensáveis no desenvolvimento deste estudo;

A todos os **meus familiares**, que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes, torcendo por minhas vitórias e conquistas;

Ao aluno de iniciação **Hassler Cavalcante**, que foi um dos anjos enviados por Deus para me ajudar. Foi com ele que enfrentei o dia-a-dia do doutorado e que me deu todo o apoio imprescindível para a realização dos meus experimentos. Obrigada meu querido amigo por seu companheirismo, amor e dedicação ao estudo;

Aos alunos de iniciação **Arthur, Janio e Pablo**, pela extrema dedicação e zelo na realização de todos os experimentos, vocês são um exemplo de compromisso e reponsabilidade;

Às alunas de iniciação **Alzimary e Mayara**, em conjunto com as Profa. **Adriana e Manuela Jardim**, pelo desafio aceito, companheirismo e pela preciosa amizade construída;

Aos grandes amigos e companheiros **George, Kívia, Mônica e Natália**, pelo apoio nas batalhas do dia a dia do laboratório, as insubstituíveis ajudas e os grandes ensinamentos;

Ao colega **Josué**, pela inestimável colaboração que tornou possível a realização deste trabalho;

À Profa. Dra. **Maria Angélica Satyro Gomes Alves**, que me ajudou com a preparação inicial do projeto e que sempre esteve disponível a ajudar durante todo o desenvolvimento deste estudo;

Ao Prof. Dr. **Fernando Carneiro**, que me ensinou uma técnica imprescindível para o desenvolvimento deste estudo, e para isto me recebeu em sua casa, onde fui carinhosamente recepcionada pela sua esposa, **Zidonia Carneiro**. Obrigada também à Profa. Dra. **Rita Tostes**, que me recebeu de portas abertas em seu laboratório para o aprendizado desta nova técnica;

À Profa. **Islania Giselia**, pelo incentivo, apoio e amizade oferecidos ao longo da caminhada da pós-graduação;

Às colegas **Tereza e Fátima**, por toda a ajuda e por tornarem a convivência diária no laboratório uma tarefa prazerosa;

Às amigas **Fabíola e Carminha**, com quem tive o privilégio de dividir inúmeros momentos da minha vida acadêmica;

Aos demais participantes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: **Anaís, Bruna, Camila, Érica, Fran, Kaline, Lisandra, Lorena, Luciana, Matânia, Priscilla, Rayane, Renata, Tays Amanda e Walma**. Todos foram muito solícitos e companheiros;

Aos laboratórios vizinhos, que sempre que possível nos apoiavam com o compartilhamento de aparelhos, substâncias e instalações;

À coordenadora **Adriana Paredes**, por todo o apoio e compreensão, indispensáveis à realização deste estudo e a todos que compõe a **Farmácia Hospitalar do Complexo de Pediatria Arlinda Marques**;

À toda **equipe de Peritos Químicos do Núcleo de Laboratório Ferense de Guarabira – PB**, que supriram as minhas ausências e me apoiaram durante os dois últimos anos do doutorado;

A **José Crispim Duarte** e **Matheus Monteiro** pela amizade e apoio, estando sempre prontos a ajudar, não importando a situação;

Aos **colegas da turma de doutorado**, pelo companheirismo e amizade construídos ao longo dos anos da pós-graduação;

Às funcionárias **Mônica Rodrigues** e **Dona Maria**, com as quais tive o prazer de dividir vários inícios de manhãs nos meus dias de experimento. E aos funcionários **Luís Cordeiro da Silva** e **Adriano Cordeiro** pelo trabalho realizado no biotério nos dando suporte para trabalhar. À **Hélia** (PRPG) por sua grande ajuda na Reitoria, sempre solícita para os assuntos burocráticos;

A todos os **professores** do doutorado, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas;

Aos professores membros da banca de doutorado, Profa. Dra. **Caliandra Maria**, Prof. Dr. **Evandro Leite**, Prof. Dr. **Fabiano Elias** e Profa. Dra. **Sandra Rodrigues** por toda a disponibilidade, críticas e sugestões sobre o estudo;

À **Coordenação** e aos **funcionários** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, seriedade e apoio;

Ao **CNPq**, **CAPES**, **PgPNSB** e **UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

*“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigiam as sentinelas. Inútil levantar-vos antes da aurora, e atrasar até alta noite vosso descanso, para comer o pão de um duro trabalho, pois Deus o dá aos seus amados até durante o sono.”*

*(Salmos 127, 1 – 2)*

---

*Resumo*

---

## Resumo

ASSIS, V. L. **Efeitos do liofilizado do extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham em ratos diabéticos com disfunção erétil.** 143 F. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB, 2016.

*Dioclea grandiflora* é uma planta da família Leguminosae, exclusiva da caatinga brasileira. Estudos demonstraram diversas propriedades farmacológicas de extratos ou componentes desta planta, como propriedades antioxidantes e efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Entretanto, não há relatos sobre sua atividade na função erétil. Desta forma, este estudo objetivou caracterizar o liofilizado do extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *D. grandiflora* (LEHDg), bem como avaliar seu efeito sobre a função erétil de ratos normoglicêmicos e diabéticos. Para isto, foram utilizados ensaios experimentais *in vitro* e *in vivo*. LEHDg apresentou grande concentração de compostos fenólicos pelos métodos Folin-Ciocalteu e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Além disso, este liofilizado demonstrou potente atividade anti-radicalar frente ao radical DPPH<sup>•</sup>. Em preparações de corpo cavernoso (CC) de ratos pré-contráídos por fenilefrina, LEHDg induziu relaxamento dependente de concentração. Entretanto, esta resposta foi significativamente reduzida na presença de L-N-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), inibidor da NOS; 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido sal de potássio (PTIO), sequestrador do NO radicalar e 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), inibidor da ciclase de guanilil solúvel (CGs), sugerindo a participação da via NOS/NO/CGs em seu efeito relaxante. A ação antioxidante do LEHDg foi avaliada em cortes de CC tratados pela sonda dihidroetídeo (DHE). Este liofilizado reduziu os níveis de fluorescência basal desta sonda, quando comparada ao controle e ao controle positivo (apocinina), comprovando ação antioxidante. Diante destes resultados, investigou-se a ação do LEHDg sobre a disfunção erétil (DE) de animais com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ). Os ratos foram divididos em 5 grupos: grupo controle (não diabéticos), grupo STZ, três grupos STZ tratados com LEHDg (25 ou 37,5mg/kg) ou com sildenafil (1,5mg/kg), os quais foram tratados por 28 dias. Nos ratos diabéticos, o peso corporal reduziu e os níveis glicêmicos aumentaram, quando comparados ao grupo controle. O tratamento com LEHDg ou sildenafil não afetou estes parâmetros. A função erétil foi avaliada pela relação pressão intracavernosa/pressão arterial média (ICP/MAP). A ICP/MAP nos grupos diabéticos foi significativamente reduzida quando comparada ao grupo controle. Os tratamentos com LEHDg ou sildenafil promoveram melhora deste parâmetro, sugerindo redução da DE por estes tratamentos. Em preparações de CC, a resposta contrátil máxima com fenilefrina foi significativamente aumentada em ratos diabéticos, comparada ao grupo controle. Os tratamentos com LEHDg ou sildenafil reduziram esta hipercontratibilidade. Da mesma forma, houve aumento significativo da resposta contrátil induzida pela estimulação por campo elétrico em CC de animais diabéticos, entretanto, apenas o tratamento com LEHDg 37,5mg/kg reduziu este efeito. A resposta relaxante induzida pela acetilcolina foi reduzida significativamente em CC de animais diabéticos quando comparados ao grupo controle. Este efeito foi revertido pelos tratamentos com LEHDg ou sildenafil. Em cortes de CC, o tratamento com LEHDg ou sildenafil reduziu significativamente a fluorescência basal da sonda DHE, quando comparados aos animais diabéticos. Estes resultados demonstram que LEHDg é rico em compostos fenólicos, com potente atividade antioxidante, que promove relaxamento em CC pela via NOS/NO/CGs. Em animais com DE induzida pelo diabetes, LEHDg promove melhora da função erétil, como também melhora da função endotelial, diminuição da hipercontratibilidade e redução do estresse oxidativo nos corpos cavernosos.

Palavras-chave: *Dioclea* spp. Corpo cavernoso. Diabetes. Atividade antioxidante. Função erétil.

# *Abstract*

---

## Abstract

ASSIS, V. L. **Effects of the lyophilized of the hydro-alcoholic extract from the bark of *Dioclea grandiflora* root Martius ex Bentham in diabetic rats with erectile dysfunction.** 143 F. Doctoral Thesis (Graduate Studies in Natural Products and Synthetic Bioactive) PgPNSB/CCS/UFPB, 2016.

*Dioclea grandiflora* is a Leguminosae family plant, exclusive of the Brazilian Caatinga. Studies have shown various pharmacological properties of extracts or components of the plant, such as antioxidant properties and beneficial effects on the cardiovascular system. However, there are no reports on its activity in erectile function. Thus, this study aimed to characterize the lyophilized of the hydro-alcoholic extract of the bark of *D. grandiflora* root (LEHDg) and to assess its effect on erectile function of normoglycemic and diabetic rats. To this end, in vivo and in vitro experimental assays were used. LEHDg showed great concentration of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu methods and high-performance liquid chromatography (HPLC). Also, this lyophilized demonstrated potent anti-free radical activity against DPPH<sup>•</sup> radical. In rats corpus cavernosum preparations (CC) pre-contracted by phenylephrine, LEHDg induced concentration dependent relaxation. However, this response was significantly reduced in the presence of L-N-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) NOS inhibitor; 2-(4-phenyl)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxy-3-oxide potassium salt (PTIO), the NO radical scavenger and 1H-[1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) cyclase inhibitor of soluble guanylyl (CGs), suggesting the involvement of via NOS/NO/CGs in its relaxing effect. The antioxidant activity of LEHDg was evaluated in CC cuts treated by dihydroetid probe (DHE). This lyophilized has reduced the basal fluorescence levels of this probe when compared to the control and the positive control (apocynin), proving antioxidant action. Given these results, we investigated the action of LEHDg on erectile dysfunction (ED) in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. The rats were divided into 5 groups: control group (non-diabetic), STZ group and three STZ groups treated with LEHDg (25 or 37.5 mg/kg) or sildenafil (1.5 mg/kg), which were treated with 28 days. In diabetic rats, body weight decreased and glucose levels increased, when compared to the control group. Treatment with LEHDg or sildenafil did not affect these parameters. Erectile function was assessed by the ratio intracavernous pressure/mean arterial pressure (ICP/MAP). The ICP/MAP in diabetic groups was significantly reduced when compared to the control group. Treatment with sildenafil or LEHDg promoted improvement of this parameter, suggesting a reduction of ED by these treatments. In CC preparations, the maximum contractile response to phenylephrine was significantly increased in diabetic rats compared to controls. Treatments with LEHDg or sildenafil reduced this hypercontractility. Likewise, a significant increase in contractile response induced by electrical field stimulation in CC of diabetic animals, however, only treatment with LEHDg 37.5 mg/kg reduced this effect. The relaxing response induced by acetylcholine was significantly reduced in CC of diabetic animals when compared to the control group. This effect was reversed by treatment with LEHDg or sildenafil. In CC cuts, treatment with sildenafil or LEHDg significantly reduced basal fluorescence of DHE probe when compared to diabetic animals. These results demonstrate that LEHDg is rich in phenolic compounds with potent antioxidant activity that promotes relaxation in CC via NOS/NO/CGs. In animals with diabetes induced ED, LEHDg promotes improvement in erectile function, as well as improved endothelial function, decreased hypercontractility and reducing oxidative stress in the corpus cavernosum.

Key words: *Dioclea* spp., corpus cavernosum, diabetes, antioxidant activity, erectile function.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ilustração do corte transversal do pênis humano	29
<b>Figura 2</b> – Esquema do mecanismo de relaxamento do músculo liso no corpo cavernoso	33
<b>Figura 3</b> – Inflorescências da <i>Dioclea grandiflora</i> Martius ex Bentham	46
<b>Figura 4</b> – Esquema da preparação <i>in vitro</i> de corpo cavernoso isolado de rato	58
<b>Figura 5</b> – Esquema para avaliação do efeito do LEHDg sobre corpo cavernoso de ratos, pré-contraídos com FEN	60
<b>Figura 6</b> – Esquema para investigação da participação da via NOS-NO-CGs no efeito relaxante induzido por LEHDg em corpo cavernoso de rato	61
<b>Figura 7</b> – Esquema para avaliação do efeito do LEHDg sobre corpo cavernoso de ratos, pré-contraídos com solução despolarizante de 120 mM de KCl	62
<b>Figura 8</b> – Esquema dos grupos de animais utilizados para a investigação do efeito do LEHDg sobre a DE de ratos com diabetes induzido por STZ	64
<b>Figura 9</b> – Esquema para indução do diabetes e do tratamento dos animais durante quatro semanas	65
<b>Figura 10</b> – Esquema para avaliação da resposta contrátil do corpo cavernoso isolado de animais tratados durante quatro semanas	67
<b>Figura 11</b> – Esquema para avaliação da resposta relaxante do corpo cavernoso isolado de animais tratados	68
<b>Figura 12</b> – Medida da atividade sequestradora de radical livre (DPPH <sup>*</sup> ) por LEHDg	73
<b>Figura 13</b> – Registro original representativo da resposta relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos de ratos pré-contraídas com FEN	74
<b>Figura 14</b> – Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos	74
<b>Figura 15</b> – Envolvimento da NOS no efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos	75
<b>Figura 16</b> – Envolvimento do NO <sup>*</sup> no efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos	76
<b>Figura 17</b> – Envolvimento da GCs sobre o efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos	77
<b>Figura 18</b> – Efeito de LEHDg sobre tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com KCl 120 mM	78
<b>Figura 19</b> – Efeito antioxidante do LEHDg em corpo cavernoso	80
<b>Figura 20</b> – Alteração do peso corporal nos diferentes grupos durante o período de tratamento	82

<b>Figura 21</b> – Modificação dos níveis glicêmicos durante o período de tratamento	83
<b>Figura 22</b> – Variação da ICP/MAP dos diferentes grupos após tratamento	85
<b>Figura 23</b> – Variabilidade do efeito contrátil de FEN em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento	87
<b>Figura 24</b> – Alteração da resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento	89
<b>Figura 25</b> – Efeito relaxante de NPS em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento	91
<b>Figura 26</b> – Variação do relaxamento induzido pela ACh em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento	93
<b>Figura 27</b> – Efeito antioxidante de LEHDg em corpos cavernosos de animais diabéticos	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Compostos fenólicos identificados e quantificados em LEHDg por HPLC	72
<b>Tabela 2</b> – Alteração do peso corporal nos diferentes grupos durante o período de tratamento	81
<b>Tabela 3</b> – Modificação dos níveis glicêmicos durante o período de tratamento	83
<b>Tabela 4</b> – Variação da ICP/MAP dos diferentes grupos após tratamento	84
<b>Tabela 5</b> – Alteração da resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento	88

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Resumo das terapias farmacológicas da DE em pacientes com diabetes	42
<b>Quadro 2</b> – Composição da solução de Krebs-Ringer	53
<b>Quadro 3</b> – Composição da solução de PBS	53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AGE</b>	Produto final de glicação avançada
<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahydrobiopterina
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canais de K <sup>+</sup> sensível ao Ca <sup>2+</sup> de grande condutância
<b>CA</b>	Ciclase de adenilil
<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canais de Ca <sup>2+</sup> sensíveis à voltagem
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% do efeito máximo
<b>CGs</b>	Ciclase de guanilil solúvel
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DE</b>	Disfunção erétil
<b>DHE</b>	Dihidroetídeo
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose necessária para matar 50% da população teste
<b>DM</b>	Diabetes <i>mellitus</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	2,2-difenil-2-picrilhidrazilo
<b>ECE</b>	Estimulação por campo elétrico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>E<sub>máx</sub></b>	Efeito máximo
<b>eNOS</b>	Sintase do óxido nítrico endotelial
<b>FAD</b>	Dinucleotídeo de flavina e adenina
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FMN</b>	Mononucleotídeo de flavina
<b>GDI</b>	Inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina
<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina
<b>GEF</b>	Fator de troca de guanina
<b>GMPc</b>	Monofosfato de guanosina cíclico
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado à proteína G

<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>ICP</b>	Pressão intracavernosa
<b>iPDE</b>	Inibidores da fosfodiesterase
<b>KCl 120 mM</b>	Solução de Krebs-Ringer com [KCl] a 120 mM
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LEHDg</b>	Liofilizado do extrato hidroalcoólico de <i>D. grandiflora</i>
<b>L-NAME</b>	L-N <sup>ω</sup> -nitro-arginina-metil-éster
<b>MAP</b>	Pressão arterial média
<b>MLC</b>	Cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	Cinase da cadeia leve da miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase da cadeia leve da miosina
<b>MYPT1</b>	Subunidade alvo da miosina fosfatase 1
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado
<b>NADH</b>	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
<b>NANC</b>	Não adrenérgicos não colinérgicos
<b>nNOS</b>	Sintase do óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase do óxido nítrico
<b>NPS</b>	Nitroprussiato de sódio
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
<b>OCT</b>	Meio ótimo de temperatura de corte
<b>P38 MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno p 38
<b>P.A.</b>	Para análise
<b>PARP</b>	Poli(ADP-ribose) polimerase
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato
<b>pD<sub>2</sub></b>	Logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do E <sub>máx</sub>
<b>PDE</b>	Fosfodiesterase
<b>PGE1</b>	Prostaglandina E1
<b>PKA</b>	Proteína cinase dependente de AMPc
<b>PKB</b>	Proteína cinase B

<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>PKG</b>	Proteína cinase dependente de GMPc
<b>PTEN</b>	Fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10
<b>PTIO</b>	2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido sal de potássio
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ROCK</b>	Rho-cinase
<b>ROS</b>	Espécies reativas do oxigênio
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>%[DPPH]<sup>•</sup><sub>rem</sub></b>	% remanescente da concentração de DPPH <sup>•</sup>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 OBJETIVOS.....	27
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>29</b>
2.1 ANATOMIA E FUNÇÃO DO PÊNIS .....	29
2.2 INTUMESCÊNCIA E DETUMESCÊNCIA PENIANA.....	31
2.3 DISFUNÇÃO ERÉTIL.....	35
2.4 DISFUNÇÃO ERÉTIL E O DIABETES <i>MELLITUS</i> .....	36
2.5 TERAPIAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL.....	42
2.6 PAPEL DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NA DISFUNÇÃO ERÉTIL .....	43
2.7 <i>DIOCLEA GRANDIFLORA MARTIUS EX BENTHAM</i> .....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 ANIMAIS .....	51
3.2 OBTENÇÃO DO LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DA RAIZ DE <i>DIOCLEA GRANDIFLORA MARTIUS EX BENTHAM</i> .....	51
3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	52
3.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS .....	52
3.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO LEHDg.....	53
<b>3.5.1 Pesquisa de Alcaloides</b> .....	54
<b>3.5.2 Pesquisa de Esteroides</b> .....	54
<b>3.5.3 Pesquisa de Taninos</b> .....	54
<b>3.5.4 Pesquisa de Flavonoides</b> .....	55
<b>3.5.5 Pesquisa de Saponinas</b> .....	55
3.6 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	55
3.7 ANÁLISE DO LEHDg POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	56
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS DPPH* .....	57
3.9 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	58
<b>3.9.1 Ensaio farmacológico utilizando corpos cavernosos isolados de rato em cubas para órgãos isolados</b> .....	58
3.9.1.1 Protocolos experimentais para preparações de corpos cavernosos isolados de rato .....	59
3.9.1.2 Avaliação do efeito relaxante do LEHDg em corpo cavernoso isolado de rato pré-contraído com FEN.....	59

3.9.1.3 Avaliação da participação da via NOS/NO/CGs no efeito relaxante do LEHDg em corpo cavernoso isolado de rato pré-contraído com FEN.....	60
3.9.1.4 Investigação do efeito relaxante do LEHDg em preparações de corpos cavernosos pré-contraídos com solução despolarizante de 120 mM de KCl.....	61
<b>3.9.2 Avaliação da ação do LEHDg sobre a concentração do ânion superóxido em corpos cavernosos</b> .....	<b>62</b>
<b>3.10 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LEHDg EM RATOS COM DISFUNÇÃO ERÉTIL INDUZIDA POR DIABETES</b> .....	<b>63</b>
<b>3.10.1 Indução do diabetes por STZ</b> .....	<b>64</b>
<b>3.10.2 Monitoramento da função erétil <i>in vivo</i></b> .....	<b>65</b>
<b>3.10.3 Estudos de reatividade do corpo cavernoso isolado de animais tratados</b> ..	<b>66</b>
3.10.3.1 Avaliação da resposta contrátil do corpo cavernoso isolado de animais tratados .....	66
3.10.3.2 Investigação da resposta relaxante do corpo cavernoso isolado de animais tratados .....	67
<b>3.10.4 Avaliação da produção do ânion superóxido em tiras de corpos cavernosos</b> .....	<b>68</b>
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	69
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR .....	71
4.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM LEHDg.....	71
4.3 ANÁLISE DO LEHDg POR HPLC .....	71
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS - DPPH* .....	72
4.5 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> .....	73
<b>4.5.1 Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídos por FEN</b> .....	<b>73</b>
<b>4.5.2 Participação da NOS na resposta relaxante induzida por LEHDg</b> .....	<b>75</b>
<b>4.5.3 Participação do NO radicalar (NO<sup>*</sup>) no efeito relaxante induzido por LEHDg</b>	<b>76</b>
<b>4.5.4 Participação da CGs na resposta relaxante induzida por LEHDg</b> .....	<b>77</b>
<b>4.5.5 Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 120 mM</b> .....	<b>78</b>
<b>4.5.6 Atividade antioxidante do LEHDg em corpo cavernoso por microscopia de fluorescência</b> .....	<b>79</b>
<b>4.6 EFEITOS DO LEHDg SOBRE A DISFUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS INDUZIDA PELO DIABETES</b> .....	<b>81</b>
<b>4.6.1 Peso corporal dos diferentes grupos de animais durante o período de tratamento de quatro semanas</b> .....	<b>81</b>
<b>4.6.2 Modificação dos níveis glicêmicos no início e no final do tratamento dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas</b> .....	<b>82</b>

4.6.3 Valores da ICP/MAP dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas .....	84
4.6.4 Efeito contrátil de FEN em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas .....	86
4.6.5 Resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas .....	88
4.6.6 Efeito relaxante de NPS em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas .....	90
4.6.7 Relaxamento induzido pela ACh em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas.....	92
4.6.8 Intensidade de fluorescência da sonda DHE em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas.....	94
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>1113</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>1155</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>143</b>

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A disfunção erétil (DE) é um distúrbio multidimensional bastante comum que tem efeitos negativos sobre a atividade sexual e reprodutiva, prejudicando a qualidade de vida do paciente e do parceiro. Trata-se, portanto, de um importante problema de saúde, pois gera ansiedade, depressão, diminuição da autoconfiança, que, por sua vez, dificulta ainda mais a ereção peniana (MORELLI et al., 2011).

A ereção do pênis é determinada por um equilíbrio complexo entre os sistemas nervosos central e periférico e da integridade do sistema vascular peniano (MELLER et al., 2013). A fisiologia da ereção peniana possui o óxido nítrico (NO) como o principal mediador. Grande parte de sua produção ocorre por meio da enzima sintase do NO (NOS), que produz níveis fisiologicamente relevantes deste mediador nas células endoteliais e nas terminações nervosas autonômicas do pênis (MUSICKI; BURNETT, 2006).

O NO liberado após estímulos eretogênicos difunde-se dos seus tecidos de origem para as células do músculo liso presentes no corpo cavernoso e arteríolas, onde se liga e estimula a ciclase de guanilil solúvel (CGs). A ativação desta enzima leva ao aumento da produção do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), com consequente ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que, por sua vez, fosforila vários alvos intracelulares. Esta sinalização resulta em hiperpolarização e redução citoplasmática de  $Ca^{2+}$ , causando o relaxamento do músculo liso cavernoso (IGNARRO et al., 1990; GHALAYINI, 2004).

O relaxamento das células musculares lisas nas arteríolas e no corpo cavernoso promove alterações hemodinâmicas no pênis, que levam a expansão dos corpos cavernosos e a oclusão do efluxo venoso, resultando na ereção (ANDERSSON; STIEF, 1997; DÍAZ-DÍAZ et al., 2012). Anormalidades funcionais e/ou estruturais que afetam a circulação peniana ou quaisquer dos fatores que participem do processo erétil podem desencadear no desenvolvimento da DE (AGARWAL et al., 2006; DECALUWÉ et al., 2014).

Evidências sugerem que a DE usualmente coexiste e compartilha vias de sinalização fisiopatológicas comuns com várias morbidades, como dislipidemia, doença cardiovascular e diabetes *mellitus* (DM) (VLACHOPOULOS et al., 2013). O DM é um dos fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento da DE. Estudos epidemiológicos sugerem que o diabetes do tipo 1 e 2 estão associados com risco

aumentado de DE, o que é relatado em mais de 50% dos homens com diabetes no mundo (GIULIANO et al., 2004; THORVE et al., 2011).

O DM pode causar DE por meio de uma série de vias fisiopatológicas (HATZIMOURATIDIS; HATZICHRISTOU, 2009). Estas incluem, principalmente, a neuropatia, disfunção endotelial, alterações estruturais/funcionais no músculo liso dos corpos cavernosos, alterações hormonais e aumento sustentado do estresse oxidativo (DÍAZ-DÍAZ et al., 2012).

O aumento do estresse oxidativo é caracterizado principalmente pela elevação dos níveis do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que, por sua vez, reage com NO para formar peroxinitrito ( $OONO^-$ ), um oxidante citotóxico, resultando na diminuição deste mediador. Além disso, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) desencadeiam disfunção das células endoteliais por meio de uma multiplicidade de mecanismos que também contribuem para o desenvolvimento da DE (PAPAHARALAMBUS; GRIENGLING, 2007; DÍAZ-DÍAZ et al., 2012).

Nos últimos anos, um grande número de estudos foi publicado com o objetivo de encontrar novas estratégias terapêuticas para o tratamento de DE (DECALUWÉ et al., 2014). Vários antioxidantes, tais como a vitamina E, o selenato de sódio, a melatonina e o ácido ascórbico demonstraram atenuação da disfunção neurogênica e endotelial no corpo cavernoso de animais diabéticos do tipo 1 e 2 (GÖÇMEN et al., 2000; PASKALOGLU; ŞENER; AYANĞOLU-DÜLGER, 2004; GÜR et al., 2005).

Outra família de antioxidantes com capacidade mais potente de eliminação de radicais livres são os polifenóis, como a quercetina, o ácido elágico e o resveratrol. Estes compostos também demonstraram efeito protetor sobre a função erétil por impedir o dano oxidativo em animais diabéticos, com consequente melhora da DE destes animais (GOSWAMI et al., 2014; BOYDENS et al., 2015).

Neste contexto, o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PgPNSB/UFPB) tem pesquisado a ação de extratos de plantas como potenciais produtos no tratamento da DE (ALVES, 2012). Bem como, a utilização de produtos ricos em compostos fenólicos com ação antioxidante no sistema cardiovascular (LUCIANO et al., 2011).

A *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham é uma liana, popularmente conhecida como olho-de-boi, encontrada em uma área com cerca de 800.000 km<sup>2</sup>

no Cerrado e Caatinga do Nordeste brasileiro (CASTRO; CAVALCANTE, 2010). O extrato hidroalcoólico da casca da raiz desta planta possui diversos compostos fenólicos e alguns deles já demonstraram capacidade antioxidante e efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular (SILVEIRA E SÁ et al., 2013). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a ação deste extrato sobre a função erétil.

Desta forma, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização fitoquímica do liofilizado do extrato hidroalcoólico da casca da raiz da *D. grandiflora* (LEHDg), bem como avaliar o seu efeito sobre a função erétil de ratos normoglicêmicos e diabéticos e os seus possíveis mecanismos de ação.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de LEHDg sobre a função erétil de ratos normoglicêmicos e diabéticos e os seus possíveis mecanismos de ação.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica do LEHDg;
- Investigar o efeito relaxante do LEHDg em corpo cavernoso isolado de rato e a participação da via NOS/NO/CGs;
- Avaliar a ação antioxidante do LEHDg em corpo cavernoso de rato;
- Investigar o efeito do tratamento do LEHDg sobre a medida de ICP/MAP, reatividade a agentes relaxantes e contracturantes e sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos.

# *Fundamentação Teórica*

---

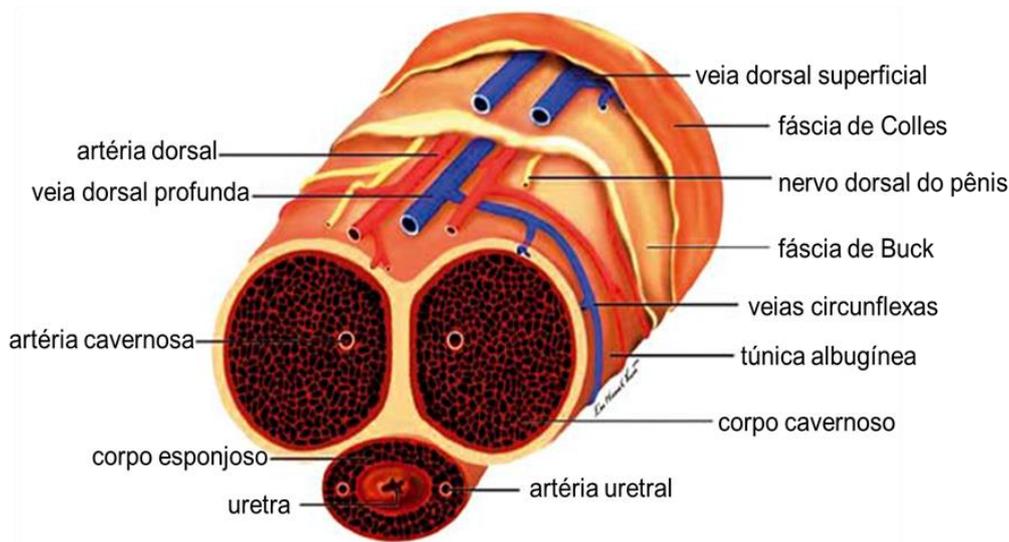
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ANATOMIA E FUNÇÃO DO PÊNIS

O pênis é o órgão genital e copulatório externo masculino que executa duas funções: a ejaculação do sêmen e a eliminação da urina (JUNG et al., 2014). Este órgão é uma estrutura única composta de glânde, músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso, corpo esponjoso e dois corpos cavernosos emparelhados (MUNDY; HEALY, 2005).

Os corpos cavernosos compreendem duas das três colunas de tecido erétil, estando posicionados dorsalmente, e a terceira coluna, o corpo esponjoso, está posicionada ventralmente, envolvendo a uretra (GÜMÜŞ et al., 2004). As três colunas do tecido erétil são formadas por uma malha de feixes de trabéculas que possuem células musculares lisas, fibroblastos, colágeno, elastina e terminações nervosas, formando as paredes dos sinusóides ou lacunas, que são internamente cobertos por endotélio (MAS; ESCRIG; GONZALEZ-MORA, 2002) (Figura 1).

**Figura 1** – Ilustração do corte transversal do pênis humano



Fonte: Adaptado de Hsieh et al., 2012

O corpo cavernoso é um sistema de alta pressão que aumenta a rigidez do pênis durante a ereção e mantém o seu formato durante a cópula (KELLY, 1999). O corpo esponjoso é um sistema de baixa pressão (PUROHIT; BECKETT, 1976) que infla a glânde durante a ereção e apoia o seu tecido durante a cópula

(HOLMES et al., 1991; WILLIAMS-ASHMAN; REDDI, 1991). Cada corpo cavernoso é encapsulado por um tecido fibroso, formado principalmente por fibras de colágeno, denominada de túnica albugínea (BROCK et al., 1997). Os três corpos de tecido erétil são cercados pela fáscia de Buck e fáscia de Colles, que separam os corpos cavernosos das camadas da pele (HSIEH et al., 2012; JUNG et al., 2014).

Entre a túnica albugínea e fáscia de Buck está localizada, na posição média, a veia dorsal profunda, que recebe sangue da veia circunflexa proveniente do corpo esponjoso e, das veias emissárias, que correspondem às saídas do plexo venoso subtunical dos corpos cavernosos, de onde coletam o sangue dos sinusoides pelas veias crural e cavernosa. Uma única veia dorsal superficial está localizada entre a fáscia de Buck e fáscia de Colles para a drenagem venosa generalizada dos tecidos superficiais (HSU et al., 2003; HSU, 2006; HSIEH et al., 2012).

O suprimento de sangue arterial do pênis, por sua vez, é realizado principalmente pela artéria ilíaca interna, um ramo da ilíaca comum, que fornece o fluxo arterial para o pênis através de três ramos da artéria pudenda interna. O sangue para o corpo cavernoso é fornecido pelas artérias dorsais do pênis, que se estendem ao longo de cada lado da veia dorsal profunda, e pelas artérias profundas do pênis, localizadas nos corpos cavernosos, cujas ramificações são chamadas de artérias helicinais e fornecem sangue durante a ereção peniana (JUNG et al., 2014).

A ereção peniana é neurologicamente controlada pelos sistemas simpático e parassimpático. O plexo pélvico é o principal cruzamento de nervos autônomos genitais, composto por fibras parassimpáticas a partir das raízes sacrais nervosas (S2 – S4) e fibras nervosas simpáticas das raízes nervosas simpáticas toracolombar (T11 – L2). O plexo encontra-se em ambos os lados da bexiga e do reto, e se irradia para todas as vísceras pélvicas, incluindo o tecido genital masculino. As fibras autonômicas que vão para o pênis são chamadas coletivamente de nervo cavernoso e regulam o fluxo sanguíneo para o tecido erétil (YANG; JIANG, 2009).

Além da inervação autônoma, o pênis possui inervação sensitiva e motora, que estão presentes nos ramos do nervo pudendo (WILLIAMS; WARWICH, 1980), os quais surgem dos segmentos S2 - S4. Existem três ramos do nervo pudendo (nervo dorsal do pênis, perineal e retal inferior), cada ramo sensorial leva às regiões S2 – S4 espinhais sinais provenientes das estruturas genitais, que são retransmitidas por meio do sistema nervoso central (SNC) via ascendente do trato espinhal (GUERIT; OPSOMER, 1991).

## 2.2 INTUMESCÊNCIA E DETUMESCÊNCIA PENIANA

A ereção peniana é o resultado final de um complexo processo neurovascular em que estão envolvidos os nervos, o endotélio sinusoidal, os vasos sanguíneos e as células do músculo liso do órgão alvo. A ereção é basicamente mediada por um reflexo espinal, o qual, dependendo do contexto em que ocorre, envolve diferentes mecanismos neurais centrais, periféricos e/ou humorais (ANDERSSON, 2011).

No SNC, após a estimulação sexual (estímulos olfativo, auditivo e ambiental), o hipotálamo está exposto à entrada de diversos mediadores, dentre os quais a dopamina parece ser o neurotransmissor eretogênico primário (HELLSTROM, 2008). Terminações nervosas contendo dopamina se conectam com corpos celulares ocitocinérgicos no núcleo paraventricular, que, por sua vez, se projetam para as áreas extra-hipotalâmicas do cérebro, tais como o hipocampo, medula ventral e medula espinal (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2008).

A ocitocina tem sido localizada em vias descendentes do hipotálamo para o tronco cerebral e para os centros de controle autonômico dos tecidos eréteis do pênis, na região sacral espinal (BASKERVILLE; DOUGLAS, 2008). Além de vias centrais, um estímulo eretogênico pode ter origem no centro de ereção na região sacral espinal em resposta a estimulação tátil dirigida ao pênis, excitando os neurônios sensoriais que fazem sinapse no centro de ereção sacral localizada na região de S2 – S4 (LUE, 2000).

As diferentes etapas de neurotransmissão, propagação do impulso e transdução de sinais neurais intracelular na musculatura lisa do pênis ainda são apenas parcialmente conhecidas. No entanto, está bem estabelecido que o equilíbrio entre fatores contracturante e fatores relaxantes controlam o grau de tônus da vasculatura do pênis e do músculo liso dos corpos cavernosos e determina o estado funcional do pênis: detumescência (flacidez) ou intumescência (ereção) (ANDERSSON, 2011).

O processo de intumescência peniana possui NO como seu principal mediador (YETIK-ANACAK et al., 2015). A ereção peniana ocorre após estimulação do SNC ou periférico e consequente ativação de nervos presentes nos corpos cavernosos e nas pequenas artérias do pênis. Nos neurônios não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), há o aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  pela abertura de canais de

$\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), que resulta na formação do complexo de cálcio-calmodulina e ativação da sintase do NO neuronal (nNOS) (ZAMBLE et al., 2006).

O NO também pode ser produzido a partir da ligação da acetilcolina (ACh), liberada pelos neurônios colinérgicos, com os receptores muscarínicos  $M_3$  presentes no endotélio trabecular, o que leva a ativação da sintase do NO endotelial (eNOS). Durante a ereção, a atividade da eNOS é reforçada por um mecanismo mediado por fluxo, que ocorre devido ao aumento do estresse de cisalhamento no pênis, via fosforilação da Ser<sup>1177</sup> pela proteína cinase B (PKB, também conhecida como Akt), produzindo NO (MING et al., 2002).

Tanto a eNOS como a nNOS produzem o NO pela reação de conversão de L-arginina em L-citrulina e NO, na presença de oxigênio. Para a ação enzimática da NOS também são necessários cofatores adicionais como tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH), mononucleotídeo de flavina (FMN) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; LASKER; PANKEY; KADOWITZ, 2013).

O NO proveniente das terminações nervosas NANC ou das células endoteliais se difunde no músculo liso do corpo cavernoso e se liga ao ferro reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na subunidade heme da CGs, aumentando a atividade catalítica desta enzima e levando a formação de GMPc a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (BELLAMY; WOOD; GARTHWAITE, 2002). Os alvos moleculares ativados pelo GMPc na musculatura lisa do pênis ainda estão apenas parcialmente conhecidos, mas já se sabe que atua por meio de três principais alvos: canais iônicos, fosfodiesterases (PDE) e proteínas cinases, como a PKG (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010; ANDERSSON, 2011).

A ativação de um receptor de membrana acoplado a proteína G por prostaglandina E1 (PGE1) também pode induzir o relaxamento das células de músculo liso pela ativação da ciclase de adenilil (CA). A ativação da CA, por sua vez, aumenta a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), cujo aumento ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (LASKER; PANKEY; KADOWITZ, 2013).

Os eventos mediados pela PKA e PKG levam a inibição da via noradrenérgica por meio da hiperpolarização da membrana celular mediada, principalmente, pela abertura de canais de potássio sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  de grande condutância ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), inativação de canais de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana e



tornam rígidos, mantendo a ereção do pênis (ANDERSSON; WAGNER, 1995; AZADZOI et al., 1995; JUNG et al., 2014).

Fisiologicamente, a sinalização celular mediada pelo GMPc e AMPc é inibida pela ação das enzimas PDE que catalisam a hidrólise destes nucleotídeos cíclicos. Há 11 superfamílias das PDEs nos mamíferos, onde todas, exceto PDE6, são expressas nos corpos cavernosos (KÜTHE et al., 2001). Dentre estas enzimas, a PDE5 é a principal responsável por terminar a sinalização do GMPc na fisiologia da ereção e a sua inibição específica tem demonstrado ser eficaz no tratamento de distúrbios na ereção peniana (EARDLEY; CARTLEDGE, 2002).

As alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a ereção do pênis são invertidas durante a detumescência e incluem contração dos músculos lisos cavernosos, diminuição do fluxo arterial e restauração parcial ou total de fluxo venoso (ANDERSSON; WAGNER, 1995). As fibras simpáticas dos plexos hipogástricos e nervos esplâncnicos sacrais mantêm o músculo liso cavernoso em estado contraído e medeiam a detumescência do pênis (JUNG et al., 2014). Esta detumescência é mantida, principalmente, por meio da contração crônica do músculo liso pela ligação da noradrenalina, endotelina-1 e angiotensina II aos seus respectivos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) no músculo liso (KAMM; STULL, 1985).

A cascata de sinalização mediada por estes GPCRs aumenta o nível de  $Ca^{2+}$  citosólico, que se liga a calmodulina, promovendo a ativação da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Uma vez ativada, a MLCK fosforila a cadeia leve da miosina reguladora (MLC), permitindo que as cabeças dos filamentos de miosina se liguem à actina e causem a contração do músculo liso, levando à flacidez peniana (detumescência) (KAMM; STULL, 1985; SOPKO; HANNAN; BIVALACQUA, 2014).

Além da elevação dos níveis de  $Ca^{2+}$ , a flacidez peniana também é mediada pela ativação da via RhoA/Rho-cinase (ROCK), uma importante via de sensibilização ao  $Ca^{2+}$ , a qual atua de forma independente da concentração intracelular deste íon (FENG et al., 1999; CHITALEY et al., 2001). A ativação desta via no músculo liso pode ocorrer pela ativação de GPCR por um ligante, que ativa o fator de troca de guanina (Rho-GEF), o qual facilita a conversão do difosfato de guanosina (RhoA-GDP) para o trifosfato de guanosina (RhoA-GTP) e sua dissociação do inibidor de dissociação de RhoA-GDP (Rho-GDI), permitindo que RhoA, uma

pequena GTPase monomérica, se ligue a múltiplos alvos intracelulares, destacando-se a ROCK (SOPKO; HANNAN; BIVALACQUA, 2014).

A ROCK, uma serina/treonina cinase, cujas duas isoformas descritas em corpo cavernoso (Rock1 ou ROKb e Rock2 ou Roka) são capazes de manter o estado fosforilado da MLC por meio da fosforilação e inibição da subunidade alvo da miosina fosfatase 1 (MYPT1) da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP). A inibição da MLCP promove a ponte cruzada de actina/miosina e a contração do musculo liso cavernoso, contribuindo para o estado de detumescência peniana (NARUMIYA, 1996; JIN; BURNETT, 2006; SOPKO; HANNAN; BIVALACQUA, 2014).

### 2.3 DISFUNÇÃO ERÉTIL

A função erétil depende de um equilíbrio preciso entre os fatores psicológicos, hormonais, neurológicos, vasculares e cavernosos. Entretanto, uma alteração em qualquer um, ou uma combinação desses fatores pode levar à DE (AGARWAL et al., 2006). A DE foi então definida pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana que possibilite uma atividade sexual satisfatória (NIH, 1993).

A DE é um importante distúrbio que afeta a qualidade de vida das pessoas, entretanto, estudos epidemiológicos sobre o tema apresentam sérias dificuldades, como a grande variedade de abordagens metodológicas utilizadas (KUBIN; WAGNER; FUGL-MEYER, 2003). Apesar deste problema, alguns estudos comprovam a presença mundial da doença, com uma taxa de prevalência estimada entre 10% e 20% em todo o mundo (DEROGATIS; BURNETT, 2008). Em 2025, estima-se que mais de 322 milhões de homens serão afetados pela DE (MCKINLAY, 2000).

No Brasil, estudos indicam uma alta prevalência de DE em todas as regiões, o que confirma que a DE é um importante problema de saúde pública também em nosso país (ABDO et al., 2006). Estima-se que no Brasil cerca de 25 milhões de homens com mais de 18 anos sofrem de algum grau de DE, e que cerca de 11,3 milhões têm DE moderada ou severa (MOREIRA JR et al.; MOREIRA et al., 2003).

A etiologia da DE é multifatorial e, geralmente, inclui disfunção endotelial, alteração estrutural da vasculatura peniana, baixos níveis de testosterona, manipulação cirúrgica prostática prévia e/ou componentes psicogênicos

(DEAN; LUE, 2005). Por muito tempo acreditou-se que a DE estava relacionada exclusivamente a problemas psicológicos, entretanto, percebeu-se nas últimas décadas que mais de 80% dos casos de DE tem causas orgânicas (FELDMAN et al., 1994; BIVALACQUA et al., 2003; MUSICKI; BURNETT, 2007). Atualmente, a DE é considerada predominantemente uma doença vascular da circulação peniana (SULLIVAN; KEOGHANE; MILLER, 2001; RERIANI et al., 2014) e um marcador independente para o aumento de risco para doenças cardiovasculares (DONG; ZHANG; QIN, 2011; VLACHOPOULOS et al., 2013).

A DE está associada a diversos fatores de risco de doença cardiovascular, como aterosclerose, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, tabagismo e DM (JOHANNES et al., 2000; MOINPOUR et al., 2000). O DM é considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da DE, sendo três vezes mais prevalente em homens com diabetes tipo 1 e 2 do que em homens não diabéticos (FELDMAN et al., 1994; GIUGLIANO et al., 2010). No estudo realizado por Hakim e Goldstein (1996) foi estimado que 50 – 75% dos homens diabéticos têm algum grau de DE.

#### 2.4 DISFUNÇÃO ERÉTIL E O DIABETES *MELLITUS*

DM é classificado como uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos. Como resultado, a quantidade de glicose no sangue aumenta, enquanto as células são privadas de energia (KUMAR et al., 2012). DM é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e com ocorrência crescente, assumindo proporções epidêmicas. Em 2011, mais de 371 milhões de pessoas no mundo tinham DM (LAM; LEROITH, 2012) e estima-se que este número deverá atingir 552 milhões em 2030 (WILD et al., 2004).

DM tipo 1 é o resultado da destruição de células  $\beta$ -pancreáticas com consequente deficiência na produção de insulina. Na maioria dos casos, a destruição de células  $\beta$  é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM tipo 1. Por sua vez, DM tipo 2 ocorre quando há uma combinação de deficiência (secreção inadequada de insulina em relação aos níveis de glicose do sangue) e de resistência à insulina (redução da capacidade da insulina de estimular

a captação de glicose). A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade (DSB, 2015).

Uma associação entre DM e o desenvolvimento da DE tem sido documentada na literatura desde 1978 (MCCULLOCH et al., 1980). A maioria dos estudos que descreve a prevalência de DE em pacientes diabéticos não faz distinção entre diabetes tipo 1 e 2. Entretanto, alguns estudos relataram risco semelhante de DE entre homens portadores de DM do tipo 1 e 2 (BACON et al., 2002; KALTER-LEIBOVICI et al., 2005). Enquanto que Fedele e cols. (1998) reportaram risco maior de desenvolver DE em homens com diabetes tipo 1. Foi descrito também que a DE ocorre de forma precoce, cerca de 10 – 15 anos, em homens diabéticos do que em homens não diabéticos (FELDMAN et al., 1994; PENSON et al., 2003).

A patogênese da DE em DM é multifatorial. A resistência à insulina, a hiperglicemia e vários distúrbios metabólicos associados podem contribuir para a cascata fisiopatológica responsável pelo desenvolvimento da DE em pacientes diabéticos (MORANO, 2002; TRUSSELL; LEGRO, 2007). Os principais mecanismos propostos de DE no diabetes de ambos os tipos são representados por vasculopatia, neuropatia e hipogonadismo (MAIORINO; BELLASTELLA; ESPOSITO, 2014).

As hipóteses neurológicas e vasculares coincidem no pressuposto de que distúrbios metabólicos que ocorrem em indivíduos diabéticos causam angiopatia pelo dano ao endotélio, enquanto que a angiopatia, por sua vez, provoca neuropatia isquêmica (SULLIVAN; KEOGHANE; MILLER, 2001). A vasculopatia diabética consiste em microvasculopatia, macrovasculopatia e disfunção endotelial (MATSUI et al., 2015).

No pênis, a doença microvascular é determinada pelo dano isquêmico na circulação distal e pela neuropatia autonômica e periférica. Ambas as neuropatias somáticas e autonômicas podem contribuir para a DE induzida por diabetes. Isto ocorre devido à insuficiência de impulsos sensoriais a partir do pênis para o centro erétil reflexogênico e pela redução ou ausência de atividade parassimpática que é necessária para o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso (NEHRA; MORELAND, 2001; DE TEJADA et al., 2005).

A doença macrovascular em DM corresponde ao dano aterosclerótico nos vasos sanguíneos. No pênis, as lesões ateroscleróticas na artéria pudenda interna diminuem o influxo arterial para os corpos cavernosos. Já tem sido demonstrado em

modelos de DE que esta artéria sofre remodelamento patológico, caracterizado por espessamento medial, vasodilatação prejudicada e disfunção endotelial (HANNAN et al., 2010; MATSUI et al., 2015). Como mencionado anteriormente, vários fatores de risco cardiovasculares associados com DM contribuem para a gênese da insuficiência arterial peniana (BORTOLOTTI et al., 2001; ESPOSITO et al., 2005; PONHOLZER et al., 2005) e todos convergem para a disfunção endotelial, que representa o denominador comum levando a DE vascular (GUAY, 2007).

A disfunção endotelial no diabetes manifesta-se com a diminuição da biodisponibilidade do NO, resultando no relaxamento insuficiente do músculo liso vascular do corpo cavernoso. A diminuição da biodisponibilidade do NO pode ser provocada por sua degradação acelerada pelas ROS, provenientes do aumento do estresse oxidativo, bem como pela diminuição de sua produção pela NOS (BIVALACQUA et al., 2003).

A redução da produção enzimática de NO ocorre pela redução da expressão na enzima NOS, falta de substrato ou de cofatores para a NOS; alterações na sinalização intracelular de tal modo que NOS não é apropriadamente ativada ou permanece desacoplada (BIVALACQUA et al., 2003). Todos estes processos levam ao desequilíbrio entre as vias intracelulares vasoconstritoras e vasorrelaxantes, favorecendo o aumento da vasoconstrição (CHEITLIN, 2004; THORVE et al., 2011).

Tais afirmativas corroboram os achados encontrados em modelos de animais diabéticos, como a diminuição do gene e da expressão da proteína NOS no endotélio e nos nervos, concomitantemente com a diminuição do GMPc e da PKG-1. Outros estudos demonstraram níveis elevados de receptores vasoconstritores de endotelina, RhoA, ROCK-1 e proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) em animais diabéticos com DE (CHIOU; LIU; JUAN, 2010; TOQUE et al., 2013).

A RhoA regula a p38 MAPK e a ativação de ambas está relacionada com a ativação da arginase, uma enzima que compete com NOS pelo substrato L-arginina, diminuindo a produção de NO no pênis (TOQUE et al., 2013). Por outro lado, estudos em tecidos eréteis demonstraram que a via RhoA-ROCK está envolvida na super regulação de apoptose, pelo aumento da ativação de caspase-3 e fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10 (PTEN) e diminuição da atividade da PKB (LI et al., 2011). O aumento da apoptose, da deposição de colágeno e diminuição da proliferação de células endoteliais em DM crônica leva ao

remodelamento adverso do tecido erétil (CHANG et al., 2004; CHIOU; LIU; JUAN, 2010; SOPKO; HANNAN; BIVALACQUA, 2014).

O remodelamento do tecido erétil de diabéticos também pode sofrer alterações pela formação e acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), induzidas pela hiperglicemia. AGEs são os produtos de reações não enzimáticas entre glicose e lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos (CARTLEDGE; EARDLEY; MORRISON, 2001), que formam ligações covalentes com o colágeno vascular, levando ao espessamento vascular, redução da elasticidade, disfunção endotelial e aterosclerose, culminando em DE (SINGH et al., 2001; THOMAS, 2011).

Além da produção de AGEs, a hiperglicemia pode aumentar o estresse oxidativo pela via do polioliol ou via do sorbitol, que é relativamente específica para o DM. O aumento do estresse oxidativo ocorre como consequência da elevação dos níveis citosólicos livres da relação NADH/NAD<sup>+</sup> (dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido e dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado), similar ao que ocorre em tecidos com hipóxia. Este aumento nos níveis de NADH é atribuído ao aumento da redução dependente de NAD<sup>+</sup>, que ocorre na segunda metade da via do polioliol (WILLIAMSON et al., 1993).

O aumento do fluxo da via do polioliol diminui também os níveis de NADPH, o qual é um cofator essencial para NOS. Isto aumenta os níveis intracelulares de mensageiros secundários para a liberação de cálcio, tais como o diacilglicerol (DAG), aumentando assim a contratilidade do músculo liso. A alteração nos níveis de NADPH também altera o estado redox das células, que tem como resultado a redução no teor de glutatona celular que, por sua vez, compromete a proteção antioxidante, levando ao estresse oxidativo (WILLIAMSON et al., 1993).

O estresse oxidativo ocorre quando as células são expostas a níveis excessivos de ROS, como resultado de um desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e de proteção conferidos por antioxidantes (ZALBA et al., 2000). ROS são formados durante o metabolismo normal devido à redução univalente da molécula de oxigênio, sendo o ânion superóxido o mais importante entre as ROS. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o ácido hipocloroso (HOCl) e o peroxinitrito são outros radicais livres importantes implicados no mecanismo fisiopatológico da doença vascular (AGARWAL et al., 2006).

No diabetes, o estresse oxidativo é ativado diretamente pela hiperglicemia, o que pode interferir na função endotelial por afetar a função da eNOS, a atividade de

citocinas pró-inflamatórias, a liberação de fatores de crescimento e a contratilidade do músculo liso. Fontes vasculares de ROS incluem NADPH oxidase, eNOS desacoplada, transporte de elétrons mitocondrial, xantina oxidoreductase e ciclo-oxigenase (MÜNZEL et al., 2005).

A NADPH oxidase é um sistema induzível de transporte de elétrons, reconhecida como a principal enzima responsável pela produção do ânion superóxido na vasculatura em doenças como diabetes, aterosclerose e hipertensão. Esta enzima gera ânion superóxido pela montagem de um complexo proteico de múltiplas subunidades, utilizando NADH e NADPH como substratos (LASSEGUE; CLEMPUS, 2003). Em células endoteliais e em vasos sanguíneos de pacientes e animais diabéticos, foi encontrado aumento da atividade da NADPH oxidase e da expressão de suas subunidades (GUZIK et al., 2002; QUAGLIARO et al., 2003; WENDT et al., 2005).

Uma vez formado, o ânion superóxido reage com NO para formar o peroxinitrito, resultando em diminuição da biodisponibilidade do NO. O peroxinitrito é uma molécula altamente tóxica que provoca alterações nos mecanismos celulares e apoptose, culminando em lesão grave de pequenas artérias penianas de resistência (JEREMY et al., 2007; RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008). Além disso, o peroxinitrito é um potente oxidante e o componente primário do estresse nitroxidativo. Em concentrações elevadas (>100 nM), o peroxinitrito pode sofrer clivagem homolítica ou heterolítica para produzir  $\text{NO}_2^+$ ,  $\text{NO}_2$ , OH, radical  $\alpha$ , que são espécies oxidantes altamente reativas e componentes secundários de estresse oxidativo do NO (EVGENOV; LIAUDET, 2005).

Além de todos os mecanismos já citados que levam ao desenvolvimento da DE em indivíduos diabéticos, estudos têm demonstrado que homens com diabetes são significativamente mais propensos a apresentar hipogonadismo, que é caracterizada pela concentração total de testosterona inferior a 300 ng/dL no sangue (CORONA et al., 2006). A testosterona regula praticamente todos os componentes da função erétil, a partir de gânglios pélvicos para o músculo liso e para as células endoteliais dos corpos cavernosos (ISIDORI et al., 2014).

Este hormônio também modula a temporização do processo erétil, que ocorre como uma função do desejo sexual, coordenando a ereção do pênis com o ato sexual (ISIDORI et al., 2014). A relação entre o hipogonadismo e a DE tem sido reforçada por alguns estudos em modelos de diabetes tipo I e II com baixos níveis

de androgênios que demonstraram a diminuição da NOS peniana (VERNET et al., 1995). Também foi observado que a deficiência de testosterona induz alterações bioquímicas que levaram a DE em dois modelos experimentais distintos de animais com DM (ZHANG et al., 2006).

A busca pelo entendimento sobre a função e disfunção sexual tem aumentado nos últimos anos. As respostas sexuais são complexas, por isso foram criados diferentes modelos *in vivo* focados na neurobiologia, psicofisiologia e diferentes componentes funcionais das respostas sexuais masculinas (MCMURRAY; CASEY; NAYLOR, 2006; GAJBHIYE et al., 2015). DM experimental pode ser induzido em animais de laboratório por vários métodos. Um dos métodos utilizados para indução de diabetes tipo 1 em animais ocorre por injeção de drogas diabéticas como aloxana ou estreptozotocina (STZ). Devido à instabilidade da aloxana, a STZ é o agente de escolha para a indução de DM em animais experimentais (IKEBUKURO et al., 2002; LENZEN, 2008; DÍAZ-DÍAZ et al., 2012).

A STZ (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranosose), um análogo citotóxico da glicose, é um agente antineoplásico sintético classificado quimicamente como um antibiótico que está relacionado a outras nitrosureias utilizadas na quimioterapia do câncer (RAKIETEN; RAKIETEN; NADKARNI, 1963; AKBARZADEH et al., 2007; LENZEN, 2008). A STZ tem efeito citotóxico em células  $\beta$ -pancreáticas pela sua ligação de baixa afinidade ao transportador de glicose GLUT2. A STZ inibe a secreção de insulina e provoca DM dependente de insulina (LENZEN, 2008). Ratos que recebem a dose 60 mg/kg de STZ apresentam claramente sintomas de deficiência de insulina, com aparecimento de DM clínica dentro de 2 - 4 dias após sua administração (WEISS, 1982; AKBARZADEH et al., 2007).

Assume-se que a toxicidade da STZ é dependente de sua atividade de alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (BENNETT; PEGG, 1981; WILSON et al., 1988). A transferência do grupo metil da STZ à molécula de DNA provoca danos, que ao longo de uma cadeia de eventos definidos (PIEPER et al., 1999) resulta na fragmentação do DNA (YAMAMOTO; UCHIGATA; OKAMOTO, 1981). Na tentativa de reparação do DNA, a poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) é hiperestimulada e isto diminui o  $\text{NAD}^+$  celular, e, posteriormente, os estoques de ATP (YAMAMOTO; UCHIGATA; OKAMOTO, 1981; SANDLER; SWENNE, 1983). O esgotamento das reservas de energia celular, finalmente, resulta em necrose das células  $\beta$  e no desenvolvimento do DM (LENZEN, 2008).

Indivíduos portadores de DM desenvolvem DE mais grave e de difícil tratamento que pacientes não diabéticos, sendo propensos a exigir tratamentos mais intensos (WALSH et al., 2014). Isto se deve ao fato que muitos homens diabéticos têm neuropatia subclínica, o que reduz a eficácia dos medicamentos orais de primeira escolha (CONDORELLI et al., 2013). Além disto, esta patologia comumente está associada com fatores de risco para DE como hipertensão, hiperlipidemia, sobrepeso e obesidade, síndrome metabólica, tabagismo e sedentarismo (BORTOLOTTI et al., 2001; NICOLOSI et al., 2003; PONHOLZER et al., 2005).

## 2.5 TERAPIAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL

Apesar do progresso considerável, o tratamento da DE em pacientes diabéticos é muitas vezes difícil devido a sua etiologia multifatorial. Conseqüentemente, é necessária uma abordagem global, em que são utilizadas não apenas uma, mas várias modalidades de tratamento para o gerenciamento da DE, ao invés de apenas uma abordagem direcionada ao órgão. Estas terapias são representadas por mudanças no estilo de vida, tratamentos farmacológicos e utilização de dispositivos ou próteses penianas (THORVE et al., 2011). As principais terapias farmacológicas da DE estão resumidas no Quadro 1.

**Quadro 1** – Resumo das terapias farmacológicas da DE em pacientes com diabetes

Terapia	Mecanismo de ação	Indicação
<b>Inibidores de PDE5</b>	Inibem a enzima PDE5, prolongando a atividade do GMPc no músculo liso cavernoso, resultando em aumento do vasorrelaxamento e da rigidez da ereção peniana	Terapia farmacológica de primeira escolha para a DE (contraindicado em usuários de nitrato)
<b>Substâncias vasoativas intracavernosas ou transuretrais:</b> - PGE1 - Fentolamina - Papaverina	- Aumenta a concentração de AMPc, causando relaxamento do músculo liso  - Bloqueador $\alpha$ -adrenérgico  - Inibidor não específico de PDE	Terapia farmacológica utilizada quando os pacientes não respondem aos inibidores da PDE5
<b>Testosterona</b>	Normaliza os níveis de testosterona	Hipogonadismo associado ao diabetes

Fonte: Adaptado de MAIORINO; BELLASTELLA; ESPOSITO, 2014

Inibidores da PDE (iPDE) são considerados a primeira linha na terapia para o tratamento da DE em pacientes diabéticos, entretanto é sabido que cerca de 50% destes pacientes não são responsivos a esta terapia. A sildenafil, a tadalafila e a vardenafila são os principais representantes desta classe terapêutica (BROCK, 2002; MALAVIGE; LEVY, 2009).

A sildenafil foi o primeiro inibidor potente e seletivo da PDE5 comercializado (Viagra<sup>®</sup>, Pfizer Inc.) para a DE masculina (FRANCIS; MORRIS; CORBIN, 2008). Depois disso, foram desenvolvidos compostos mais potentes. A tadalafila (Cialis<sup>®</sup>, Lilly-ICOS) foi sintetizada com maior seletividade para a PDE5 em relação às PDE 1 – 4, com efeito mais duradouro (> 7h) que a sildenafil (DAUGAN et al., 2003). A vardenafila (Levitra<sup>®</sup>, Bayer-GSK) foi sintetizada com maior potência quando comparada aos demais iPDE5 (KERAVIS; LUGNIER, 2012).

Se os agentes orais não podem ser utilizados ou possuem eficácia insuficiente, apesar da reeducação do estilo de vida e da dose adequada, tratamentos de segunda linha devem ser requisitados. Estes tratamentos incluem dispositivos de ereção a vácuo, supositório transuretral e terapia de injeção intracavernosa. Quando há falta de eficácia ou quando há insatisfação com outras modalidades, as próteses penianas são muitas vezes a melhor alternativa para a DE, sendo considerada a terceira linha terapêutica para DE em pacientes diabéticos (BRANT; BELLA; LUE, 2007).

## 2.6 PAPEL DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NA DISFUNÇÃO ERÉTIL

Defesas antioxidantes limitam o dano indiscriminado causado por radicais livres de oxigênio e de nitrogênio (AGARWAL et al., 2006). A homeostase redox da célula é assegurada pelo seu complexo sistema de defesa antioxidante endógeno que inclui diversas enzimas antioxidantes. Dentre estas, destacam-se a superóxido dismutase, catalase, glutatona-peroxidase, compostos não enzimáticos, como proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina e albumina) e sequestradores de baixo peso molecular, como o ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico (POLJSKAK; ŠUPUT; MILISAV, 2013).

A diminuição nos níveis de antioxidantes endógenos e o aumento do estresse oxidativo já foram demonstrados em animais e homens diabéticos. Por isso, o papel da utilização de antioxidantes ou substâncias que inibam a ação de enzimas

produtoras de ROS como terapia para a DE tem sido extensivamente investigada (AGARWAL et al., 2006; MUSICKI; BURNETT, 2007; DECALUWÉ et al., 2014). Estudos têm demonstrado que vários antioxidantes como a vitamina E (YOUNG et al., 2004), o selenato de sódio (GÖÇMEN et al., 2000), o ácido ascórbico (GÜR et al., 2005), o ácido  $\alpha$ -lipóico e gama-linolênico (KEEGAN; COTTER; CAMERON, 2001) melhoraram a disfunção neurogênica e/ou endotelial em corpo cavernoso de animais diabéticos.

Outros estudos demonstraram o efeito aditivo ou sinérgico de substâncias antioxidantes quando associadas aos iPDE5, atingindo uma melhor resposta terapêutica em um menor intervalo de tempo. Esta associação também resultou em um número significativamente maior de pacientes responsivos a terapia, quando comparados com iPDE5 ou antioxidantes administrados isoladamente (VICARI et al., 2010; GOSWAMI et al., 2014; KOVAC et al., 2014).

Terapias baseadas na diminuição do estresse oxidativo podem ser obtidas a partir da utilização de plantas, que consistem em importantes fontes de substâncias antioxidantes a serem utilizadas na medicina moderna (CORDEIRO et al., 2015). A obtenção de substâncias com propriedades terapêuticas é uma das aplicações mais antigas e consolidadas da biodiversidade. A natureza exibe grande variedade química, podendo criar estruturas complexas e, muitas vezes, de difícil reprodução em laboratório (PIMENTEL et al., 2015).

Nos dois últimos séculos, a indústria farmacêutica tem usado substâncias químicas de ocorrência natural, tanto como princípios ativos em si quanto como base para o desenvolvimento de novas moléculas (PIMENTEL et al., 2015). Neste contexto, a utilização de produtos de origem vegetal com ação antioxidante tem gerado interesse de inúmeros pesquisadores e já demonstraram importantes ações sobre a DE em modelos de animais diabéticos (ERTUĞ et al., 2010; MOSTAFA et al., 2013; YU et al., 2013).

A ação dos compostos antioxidantes de origem vegetal sobre a DE de animais diabéticos tem sido demonstrada por vários mecanismos. Dentre estes, já foi evidenciado melhora da função endotelial e preservação do músculo liso (YOON et al., 2013), diminuição da produção de AGEs e ROS (WANG et al., 2015), diminuição da hiperglicemia (GAO et al., 2012), proteção das células endoteliais e musculares e restauração da PKB (LI et al., 2013). Foi observado também a preservação da integridade das células  $\beta$ -pancreáticas (COSKUN et al., 2005),

inibição da super expressão da NADPH oxidase (YANG et al., 2013), aumento da biodisponibilidade do NO (ERTUĞ et al., 2010) e inibição da atividade da PDE5 (DELL'AGLI et al., 2005; RAHIMI et al., 2010).

Uma das classes mais interessantes de compostos vegetais envolvidos no potencial tratamento da DE são os polifenóis (PAVAN et al., 2015). Os polifenóis compreendem um grupo grande e abundante de compostos encontrados em plantas e alimentos, tendo sido identificados mais de 8.000 diferentes representantes. Os polifenóis são moléculas antioxidantes que contêm anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; TSAO, 2010). Sua atividade antioxidante tem sido associada, principalmente, às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que compostos fenólicos promovem o relaxamento de corpo cavernoso em animais saudáveis e diabéticos (ZAMBLE et al., 2006; CHAIYASUT et al., 2011), como também melhoraram e protegem os tecidos eréteis da degeneração induzida pelo estresse oxidativo por meio de mecanismos antioxidantes (SURESH; PRAKASH, 2011). Desta forma, plantas ou produtos de origem natural ricos em polifenóis podem representar importantes fontes de substâncias antioxidantes a serem utilizadas na terapêutica da DE (PAVAN et al., 2015).

## 2.7 *DIOCLEA GRANDIFLORA* MARTIUS EX BENTHAM

*Dioclea grandiflora* é uma planta trepadeira que pertence a família Leguminosae, conhecida popularmente como mucunã, mucunã-de-carço e olho-de-boi. *D. grandiflora* caracteriza-se como um cipó exclusivo da Caatinga e Cerrado do Nordeste brasileiro, revestido de pêlos macios e curtos. Possui inflorescências nas extremidades dos ramos com flores violeta, seu fruto é uma vagem rígida e pilosa, abrigando 3 a 4 sementes que medem cerca de 2,5 cm. Na medicina popular, as sementes são utilizadas no tratamento de problemas na próstata e rins e para dor de dente. Suas folhas e flores são indicadas para uso no tratamento de hérnia umbilical, asma e bronquite (CASTRO; CAVALCANTE, 2010) (Figura 3).

**Figura 3** – Inflorescências da *Dioclea grandiflora* Martius ex Bentham



Fonte: CASTRO; CAVALCANTE, 2010

A investigação fitoquímica de *D. grandiflora* mostrou a presença de várias substâncias, especialmente de flavonoides e lectinas. As lectinas foram isoladas a partir das sementes de *D. grandiflora* (MOREIRA et al., 1983), cuja estrutura foi avaliada e detalhada em diversos estudos posteriores (RICHARDSON et al., 1984; AINOUIZ et al., 1987; GUPTA et al., 1996; RAMOS et al., 1996; DAM et al., 2000; NAGANO et al., 2008; ZAMORA-CABALLERO et al., 2015). As lectinas são proteínas que possuem a habilidade de reconhecimento específico e de se ligar reversivelmente a carboidratos. Desta forma, apresentam várias aplicações, sendo de grande interesse para as indústrias farmacêutica e alimentícia (SOUZA et al., 2013).

Lectinas provenientes das sementes de *D. grandiflora* apresentaram atividade hemaglutinante similar a outras lectinas obtidas de grãos de plantas brasileiras, como *D. guianensis*, *Cratylia floribunda*, *D. violácea*, *D. virgata* e *Canavalia brasiliensis* (ASSREUY et al., 1997). Além disso, as lectinas extraídas das sementes de *D. grandiflora* induziram inflamação cutânea em camundongos, com ulceração hemorrágica e influxo de leucócitos polimorfonucleares e células gigantes (LIMA et al., 1993). Estudos semelhantes demonstraram que estas lectinas também estimulam células T nos linfonodos (BARBOSA et al., 2001) e induzem a produção

de NO por células mononucleares de murinos (ANDRADE et al., 1999). Além da atividade pró-inflamatória, foi observado que as lectinas de *D. grandiflora* também inibem a adesão à superfície dos dentes de cinco diferentes espécies de estreptococos (TEIXEIRA et al., 2006).

Diversos flavonoides foram isolados a partir do extrato da casca da raiz de *D. grandiflora*. O primeiro flavonoide isolado descrito foi a diocleína (5,2',5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavanona), uma flavonona considerada o componente majoritário deste extrato (BHATTACHARYYA; BATISTA; ALMEIDA, 1995). Estudos realizados com a diocleína mostraram diferentes atividades biológicas, principalmente no sistema cardiovascular, como ação vasorrelaxante em aorta de rato por mecanismo dependente de endotélio, pela ativação da via NOS/CGs/GMPc (LEMOS et al., 1999) e independente de endotélio por inibição da proteína cinase C (PKC), inibição dos  $Ca_v$  e da liberação intracelular dos estoques de  $Ca^{2+}$  (TRIGUEIRO et al., 2000).

Em artéria de resistência, a diocleína induziu vasorrelaxamento mediado principalmente pela abertura de canais de  $K^+$ , com consequente efeito hipotensor (CÔRTEZ et al., 2001). A diocleína também induziu aumento do fluxo sanguíneo coronariano (ALMEIDA et al., 2002) e potente inibição da atividade da PDE1 e de outras PDE (2 – 5) em veia safena humana (GONÇALVES et al., 2009). Além de todas estas atividades no sistema cardiovascular, este flavonoide demonstrou ainda atividade antioxidante, inibição de PDE4, efeitos anti-inflamatórios (GUABIRABA et al., 2010) e importante atividade analgésica (BATISTA; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 1995).

O segundo flavonoide isolado do extrato da casca da raiz de *D. grandiflora* foi o dioclenol (3,5,7-trihidroxi-8-metoxi-6-prenilflavanone) (BHATTACHARYYA et al., 1997), o qual apresentou ação anticonvulsivante, ansiolítica (DE ALMEIDA et al., 2009) e antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2000). Em sequência, foi isolada a dioflorina, (2',5,7-triidroxi-8-metoxi-6-prenilflavanona), que também demonstrou atividade analgésica (ALMEIDA et al., 2000).

Estudos posteriores elucidaram a presença de novos compostos encontrados no extrato da casca da raiz da *D. grandiflora*, a citar, agrandol (5,7-diidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona), paraibanol (2',3,5,5',7-pentaidroxi-6-metoxi-8-prenilflavano), diosalol (2',3,5,5',7-pentaidroxi-6-metoxiflavanona),  $\beta$ -amirina e 7,2',5'-tetraidroxi-6-metoxi-8-prenilflavanona (JENKINS et al., 1999). Por fim, foi isolado um novo flavonoide, o floranol (3,5,7,2'-tetraidroxi-6-metoxi-8-

prenilflavanona) que apresentou efeito vasorrelaxante com ação independente de endotélio (LEMOS et al., 2006), como também ação antioxidante por inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BOTELHO et al., 2007).

Além dos estudos realizados com os componentes isolados de *D. grandiflora*, diversos estudos também foram realizados com extratos desta planta (SÁ; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 2013). Foi observado que vários extratos de diferentes partes de *D. grandiflora* apresentaram atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos (DA SILVA et al., 2010). O extrato aquoso das sementes de *D. grandiflora* demonstrou ação depressora do SNC e possível ação hepatotóxica (MATTEI; LEITE; TUFIK, 1995).

Já o extrato hidroalcoólico das sementes de *D. grandiflora* induziu atividade antinociceptiva de ação central. O tratamento com este extrato por 30 dias (500 mg/kg, via intraperitoneal) não apresentou efeito tóxico nem a tolerância característica dos opioides. Seu mecanismo foi sugerido por redução do influxo de  $Ca^{2+}$  no terminal axônico do nervo aferente, com diminuição da atividade da CA, o que resulta na redução dos níveis de AMPc e aumento do efluxo de  $K^+$  (ALMEIDA et al., 2003).

A ação antinociceptiva também foi demonstrada em extratos de outras partes de *D. grandiflora*, como o extrato hidroalcoólico da vagem das sementes, que apresentou efeito antinociceptivo de ação central e ação anti-inflamatória (SÁ et al., 2010). Outros estudos demonstraram que o extrato da vagem desta planta produziu atividade depressora sobre o SNC e efeito sedativo em camundongos, indicando efeito ansiolítico (SILVEIRA E SÁ et al., 2013).

Resultados semelhantes foram encontrados com o extrato aquoso e hidroalcoólico da casca do caule de *D. grandiflora*, que também apresentou ação analgésica central (BEZERRA CAVALCANTI; BOSCO LINDOSO COUTO, 2008). Entretanto, o tratamento com o seu extrato aquoso (62 mg/kg, via intraperitoneal, por sete dias), induziu importante toxicidade renal e hepática (LEONE DE ALMEIDA; DA MOTA, 2005; DE ALMEIDA et al., 2013).

A fração aquosa do extrato etanólico da casca da raiz de *D. grandiflora*, via intraperitoneal, também induziu efeito analgésico dependente de dose, provavelmente por ação central via receptor opioide (BATISTA; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 1995). Os ensaios toxicológicos agudos realizados com o extrato etanólico da casca da raiz de *D. grandiflora* indicaram que a dose necessária

para matar 50% da população teste (DL<sub>50</sub>) via intraperitoneal foi de 753 mg/kg, e que por via oral a DL<sub>50</sub> é superior à dose de 2000 mg/kg. Estes dados representam grande segurança para o seu uso e suporte para estudos de longa duração (RAMALHO et al., 2015).

Como exposto anteriormente, produtos de origem vegetal ricos em polifenóis constituem importantes fontes de novas terapias para a melhora da função erétil em estados patológicos, como o diabetes. Desta forma, torna-se bastante importante a realização de estudos com o extrato hidroalcoólico da casca da raiz da *D. grandiflora* para demonstrar seus possíveis efeitos benéficos sobre a DE, visto que, estes estudos podem contribuir para o desenvolvimento de uma possível nova alternativa terapêutica no combate desta enfermidade.

# *Material e Métodos*

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com cerca de 12 semanas de idade, pesando de 280 – 320g, para os estudos agudos com animais normoglicêmicos. Para os estudos com animais diabéticos e seu controle, tratados por vinte e oito dias, foram utilizados ratos *Wistar* com 8 a 13 semanas de nascidos. Todos os animais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George - UFPB.

Estes animais foram mantidos em condições adequadas de pressão e temperatura ( $21 \pm 1$  °C), sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), com livre acesso à água e ração balanceada (ração do tipo “pellets”, Purina®), conforme recomendações internacionais (WOLFENSOHN; LLOYD, 2003). Todos os protocolos experimentais, bem como a forma de eutanásia dos animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da UFPB, certidão número CEUA N° 1011/11 (Anexo 1).

#### 3.2 OBTENÇÃO DO LIOFILIZADO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DA RAIZ DE *DIOCLEA GRANDIFLORA* MARTIUS EX BENTHAM

O extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *D. grandiflora* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do PgPNSB, do Centro de Ciências da Saúde da UFPB. O extrato foi solubilizado em água destilada, na concentração de 0,1 g/mL, filtrado a vácuo (porosidade 3 µm), congelado por 24 horas na temperatura de –80 °C (*Freezer* Thermo Fisher Scientific, Asheville, LLC, modelo ULT1386-3-D42) e liofilizado em volumes de 20 mL por 48 horas (Liofilizador FreeZone 6 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco), obtendo o LEHDg com cerca de 33,6% de rendimento.

Após a sua preparação, LEHDg foi mantido de 0 a 4 °C, sendo solubilizado apenas momentos antes de sua utilização. Para a realização dos ensaios farmacológicos *in vitro*, LEHDg foi solubilizado em solução de Krebs-Ringer (Quadro 2) ou em solução tampão fosfato de (PBS) (Quadro 3), para os experimentos em cubas para órgãos isolados e microscopia de fluorescência,

respectivamente. Já para os protocolos experimentais *in vivo*, o LEHDg foi solubilizado em solução fisiológica de NaCl 0,9% (solução salina).

### 3.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: sal sódico de heparina, cloridrato de L(-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), 1H-[1,2,4] oxadiazole [4,3,a] quinoxalin-1-ona (ODQ), 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido sal de potássio (PTIO), nitroprussiato de sódio (NPS), dihidroetídio (DHE), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido gálico monohidratado, reagente fenólico Folin-Ciocalteu (FC), 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>), apocinina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido trans cinâmico, 2,5-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido cafeico, rutina, miricetina, quercetina, naringenina, catequina, hesperetina, crisina, todos obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil), cloridrato de xilazina (Syntec; Santana de Parnaíba – SP, Brasil), cloridrato de cetamina (Ceva; Paulínea – SP, Brasil), citrato de sildenafil (Gamma; São Paulo-SP, Brasil), estreptozotocina (STZ) (Cayman Chemical; Ann Arbor – MI, EUA), carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido anídrico acético (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>), ácido clorídrico (HCl), cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), ácido oxálico (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), éter etílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O), ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH) e (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) etanol, todos da Química Moderna (Barueri – SP, Brasil).

Todas as substâncias foram solubilizadas em água de osmose reversa, exceto o PTIO e o ODQ, que foram solubilizados em etanol absoluto e DMSO, respectivamente. As soluções foram mantidas de 0 a 4 °C e somente retiradas no momento de cada experimento.

### 3.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de

potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), todos provenientes da VETEC (Rio de Janeiro - RJ, Brasil). Os quadros 2 e 3, a seguir, demonstram a concentração utilizada de cada substância para as respectivas soluções nutritivas.

**Quadro 2 – Composição da solução de Krebs-Ringer (pH 7,4)**

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,7
$\text{CaCl}_2$	2,5
$\text{MgSO}_4$	1,17
$\text{NaHCO}_3$	25,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,2
Glicose	5,6

Fonte: CLAUDINO et al., 2009

**Quadro 3 – Composição da solução de PBS (pH 7,4)**

Substância	Concentração (mM)
NaCl	161,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{O}$	1,8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	15,8

Fonte: FOLDVARI et al., 1998

### 3.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO LEHDg

Para a identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes em LEHDg, foi realizada a triagem fitoquímica preliminar para detecção de taninos, saponinas, esteroides, alcaloides e flavonoides, conforme descrito por Evans (1989) e Harborne (1998), com modificações.

### 3.5.1 Pesquisa de Alcaloides

Pesou-se 3 mg do LEHDg e o diluiu em 10 mL de água de destilada, alcalinizando-se com 0,8 mL (6 gotas) de NaOH 1%. A seguir foi adicionado 12 mL da mistura de água destilada:clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ; 1:1), a qual foi filtrada com algodão e, em seguida, a camada clorofórmica foi separada em ampola de separação. A solução clorofórmica foi acidificada com 6 mL de HCl 1%, agitando-se e deixando decantar até apresentar-se límpida e, então, foi distribuída a solução ácida sobrenadante em tubos de ensaio. Adicionou-se separadamente aos tubos os reagentes Bouchardat, Mayer, Dragendorff e ácido sílico tungstico, de modo que a presença de alcaloides foi avaliada de acordo com a presença de precipitado.

### 3.5.2 Pesquisa de Esteroides

Pesou-se 3 mg do LEHDg, que foi diluído em 10 mL de água de destilada. A seguir, foi adicionado 2,5 mL de  $\text{CHCl}_3$ , agitou-se e distribuiu-se em tubos de ensaio: 0,12; 0,25 e 0,5 mL. Em cada tubo, foi adicionado 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  e 1 mL de anidrido acético, os quais foram agitados e sobre cada tubo foi adicionado 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , agitando lentamente. Esta mistura foi deixada em repouso por alguns minutos, até a formação de três fases distintas. O aparecimento da cor rosa na fase intermediária confirma a presença de esteroides. Os resultados foram comparados com padrão de colesterol e um padrão negativo.

### 3.5.3 Pesquisa de Taninos

Foi pesado 3 mg do LEHDg, sobre o qual foi adicionado 10 mL de água destilada, seguida por filtração com algodão. Em seguida, esta solução foi distribuída em seis tubos de ensaio, adicionando nos três primeiros, gelatina 0,5% e, nos outros três, cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ; 2%). Na reação da gelatina, a formação de precipitado indica a presença de taninos.

### 3.5.4 Pesquisa de Flavonoides

Em ampola de separação, adicionou-se 3 mg do LEHDg, 15 mL de água destilada e 15 mL de  $\text{CHCl}_3$ , seguindo-se por repouso até a separação das camadas, sendo desprezada a camada clorofórmica. Em seguida, foi adicionado 13 mL de metanol e a solução formada foi distribuída em dois tubos de ensaio. Ao primeiro tubo foi adicionado 0,5 mL de HCl a 10% e uma fita de magnésio, deixando-se reagir. O resultado positivo foi observado pelo aparecimento da coloração rósea. O segundo tubo foi submetido a secagem em banho de aquecimento, a seguir foi adicionado 5 gotas de acetona, 0,05 mg de ácido oxálico e a mesma quantidade de ácido bórico. Esta solução foi secada novamente em banho de aquecimento por 5 minutos e adicionou-se 10 mL de éter etílico, observando em luz ultravioleta (UV) a presença de fluorescência.

### 3.5.5 Pesquisa de Saponinas

Solubilizou-se 3 mg do LEHDg com 10 mL de água destilada, em tubo de ensaio, agitou-se por um minuto e deixou a solução em repouso por dez minutos. O teste é considerado positivo quando a espuma permanece após o repouso.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A análise do conteúdo de fenólicos totais do LEHDg foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), conforme descrito por Montreau (1972), com modificações. Inicialmente, foi feita uma curva padrão de calibração com ácido gálico (9,41 – 0,47  $\mu\text{g/mL}$ , em metanol para análise (P.A.)), um composto fenólico de ocorrência comum. Em seguida, foi realizada a leitura do branco e das amostras do LEHDg em três diferentes concentrações (8,30; 4,15 e 2,07  $\mu\text{g/mL}$ ).

Para as análises de todas as amostras foram adicionados em diferentes tubos 100  $\mu\text{L}$  do padrão (ácido gálico), do branco (metanol, P.A.) ou do LEHDg (diluída em metanol P.A.). Em cada tubo também foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do reagente de FC 10% e, posteriormente, 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (700 mM). Todas as soluções foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Alíquotas das amostras do padrão, do LEHDg ou do branco foram transferidos para microplacas de 96 poços e

as respectivas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (iMark Reader, Bio-Rad) no comprimento de onda de 750 nm.

As análises foram realizadas em triplicata para cálculo da média dos três resultados e os dados foram adquiridos pelo Software Microplat Manager 6. O conteúdo de compostos fenólicos total encontrado em LEHDg foi expresso como equivalente grama do ácido gálico em miligrama pelo peso seco em grama da amostra (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007).

### 3.7 ANÁLISE DO LEHDg POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a análise dos compostos fenólicos presentes em LEHDg foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Neste procedimento foi empregado o módulo de separação (LC-20 AT, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com uma coluna C18 (SUPELCOSIL™ LC-PAH HPLC Column, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e um detector UV-VISÍVEL (Rheodyne, EUA). Foram pesquisados em LEHDg os seguintes padrões: ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido trans cinâmico, 2,5-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido cafeico, rutina, miricetina, quercetina, naringenina, catequina, hesperetina e crisina.

Para a construção das curvas de calibração, os padrões utilizados para este estudo foram diluídos em diferentes concentrações (0,01; 0,03; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 mg/mL). A amostra do LEHDg (5 mg/mL) e os padrões foram eluídos em um sistema gradiente que consiste nas seguintes fases móveis: solvente A (2% de ácido acético, v/v) e solvente B (acetonitrila: metanol, 2:1, v/v), em fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C, o volume de injeção foi de 20 µL e a leitura foi realizada em 280 nm (PRASAD et al., 2009). A área do pico de cada componente quantificado na amostra do LEHDg foi integrado a partir do cromatograma obtido do HPLC, utilizando o software LabSolutions (versão 5.6, Shimadzu Corporation, Japão), e a sua concentração foi calculada a partir da equação obtida da respectiva curva de calibração.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS DPPH•

A capacidade anti-radicalar do LEHDg foi avaliada conforme descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Para a realização deste teste, inicialmente foi feita uma curva padrão com o 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•), um radical livre estável. Foram utilizadas diferentes concentrações de DPPH• (3,94; 7,89; 11,8; 15,77; 19,71; 23,66; 27,60 µg/mL; em metanol P.A.) para obter a equação linear, que foi usada para calcular a sua concentração no meio de reação, determinada pela regressão linear a seguir:

$$A_{490\text{nm}} = 0,01116 [\text{DPPH}^\bullet]_T - 0,01031, \text{ com coeficiente de correlação } r = 0,988$$

O LEHDg ou ácido ascórbico (o controle positivo), foram diluídos com metanol P.A. em diferentes concentrações (33,4; 16,6; 8,3; 4,1; 2,1; 1; 0,52 µg/mL e 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL, respectivamente) e, em seguida, adicionou-se aos tubos DPPH• (17,71 µg/mL, em metanol P.A.). Alíquotas destas amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços e as respectivas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (iMark Reader, Bio-Rad) no comprimento de onda de 430 nm, em diferentes intervalos de tempo para a construção de uma curva cinética. As leituras foram feitas até que não houvesse mais redução dos valores de absorbância, formando um platô, chamado de estado estacionário.

O tempo necessário para atingir o estado estacionário foi utilizado para uma melhor compreensão do comportamento antioxidante do LEHDg e projetar o protocolo sobre a faixa de tempo ideal (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998) (SHARMA; BHAT, 2009). O percentual remanescente da concentração de DPPH• na solução teste ( $[\text{DPPH}^\bullet]_{\text{rem}}$ ) foi calculado como se segue:

$$[\text{DPPH}^\bullet]_{\text{rem}} = \frac{[\text{DPPH}^\bullet]}{[\text{DPPH}^\bullet]_{t=0}} \cdot 100$$

O  $[\text{DPPH}^\bullet]_{\text{rem}}$  no estado estacionário e a concentração das amostras, obtidas a partir da equação linear, foi representada graficamente para obter a concentração responsável por 50% do efeito antioxidante máximo das amostras

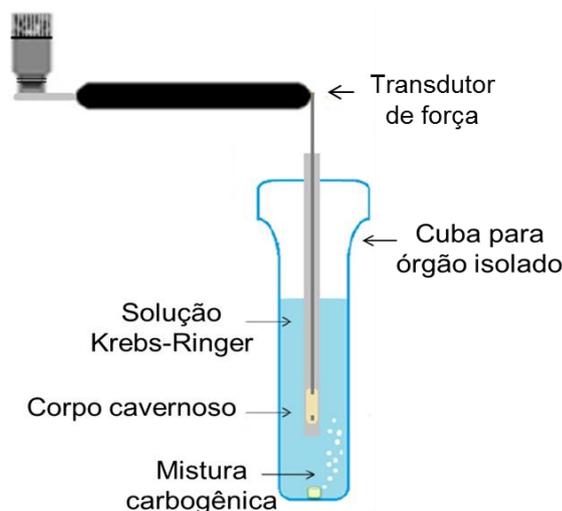
sobre o radical DPPH<sup>•</sup> (CE<sub>50</sub>). As análises foram realizadas em triplicata para cálculo da média dos três resultados e os dados foram adquiridos pelo Software Microplat Manager 6 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012).

### 3.9 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

#### 3.9.1 Ensaios farmacológicos utilizando corpos cavernosos isolados de rato em cubas para órgãos isolados

Após a eutanásia dos animais, o pênis foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer (Quadro 2) para remoção dos tecidos conectivos e remoção parcial da túnica albugínea. Cada pênis forneceu dois segmentos de corpos cavernosos medindo aproximadamente 1,0 x 0,3 x 0,2 cm. As tiras de corpos cavernosos dissecadas foram suspensas por hastes de metal conectadas a um transdutor de força e inseridas dentro de cubas para órgão isolado (Panlab Multi Chamber Organ Baths, ADInstruments), preenchidas com solução Krebs-Ringer (10 mL), à temperatura 37 °C, continuamente gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) para manter o pH constante em torno de 7,4 (Figura 4).

**Figura 4** – Esquema da preparação *in vitro* de corpo cavernoso isolado de rato



Fonte: MACHADO-TABOSA; ASSIS; FURTADO, 2013

A tensão aplicada aos tecidos (0,5 grama-força) foi periodicamente ajustada até obter sua estabilização (cerca de 60 min). Durante este período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos indesejáveis (ITALIANO; CALABRO; PAGANO, 1994). As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (MLT020, ADInstruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (ML870/P, LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália).

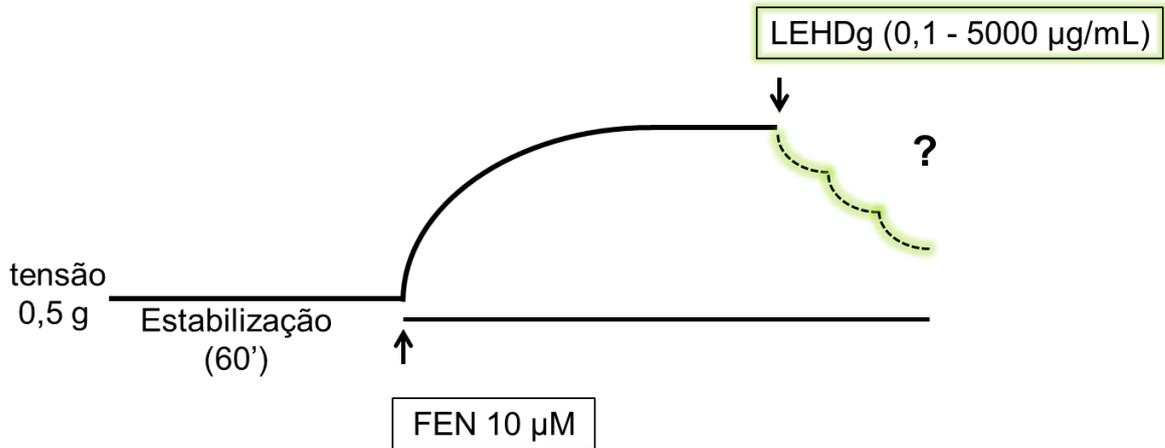
#### 3.9.1.1 Protocolos experimentais para preparações de corpos cavernosos isolados de rato

Para a realização de todos os procedimentos experimentais, após o período de estabilização dos tecidos, a viabilidade e integridade dos corpos cavernosos foram avaliadas pela contração induzida por FEN 10  $\mu$ M, um agonista dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, presentes no músculo liso dos corpos cavernosos (CHRIST et al., 1992). Os tecidos que apresentaram contração igual ou superior a 0,20 g foram considerados aptos e utilizados no estudo, enquanto que os órgãos com contrações inferiores a 0,20 g foram desprezados.

#### 3.9.1.2 Avaliação do efeito relaxante do LEHDg em corpo cavernoso isolado de rato pré-contraído com FEN

Após montagem e verificação da viabilidade dos corpos cavernosos, conforme descrito no item anterior (item 3.9.1.1), foram adicionadas de maneira crescente e cumulativa concentrações do LEHDg (0,1 – 5000  $\mu$ g/mL) sobre o componente tônico das contrações induzidas por FEN (10  $\mu$ M) para obtenção da curva concentração-resposta (Figura 5). A porcentagem de relaxamento induzida por LEHDg foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do extrato, onde a tensão de estabilização e a tensão da contração induzida com FEN (10  $\mu$ M) correspondem a 100% e 0% de relaxamento, respectivamente. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN (10  $\mu$ M). Foram calculados os valores da  $CE_{50}$  (concentração responsável por 50% do efeito máximo) para avaliar a potência e  $E_{m\acute{a}x}$  (efeito máximo) para avaliar a eficácia das curvas individuais.

**Figura 5** – Esquema para avaliação do efeito do LEHDg sobre corpo cavernoso de ratos, pré-contráídos com FEN



Fonte: ASSIS, 2016

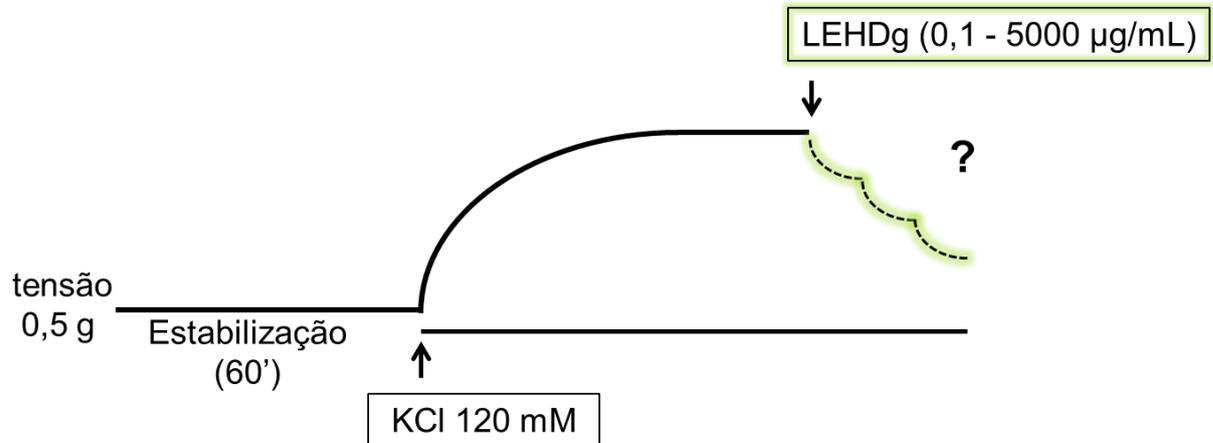
### 3.9.1.3 Avaliação da participação da via NOS/NO/CGs no efeito relaxante do LEHDg em corpo cavernoso isolado de rato pré-contráído com FEN

Como as principais vias de relaxamento do corpo cavernoso são dependentes da ação do NO, foi investigada a participação da via NOS/NO/CGs pelo uso das seguintes ferramentas farmacológicas: L-NAME (300  $\mu\text{M}$ ), um inibidor competitivo inespecífico da enzima NOS (WOODE et al., 2013); PTIO (300  $\mu\text{M}$ ), um sequestrador de NO (AYAJIKI; FUJIOKA; OKAMURA, 2000); e ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da enzima CGs (SCHRAMMEL et al., 1996).

Após a montagem das tiras de corpo cavernoso (item 3.9.1.1), as ferramentas farmacológicas foram adicionadas e incubadas por 30 minutos, em diferentes preparações. A seguir, foi induzida uma contração com FEN (10  $\mu\text{M}$ ) e em seu componente tônico foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do LEHDg (0,1 – 5000  $\mu\text{g/mL}$ ) para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 6). A resposta obtida foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do relaxamento do LEHDg foram avaliadas por meio dos valores de  $CE_{50}$  e  $E_{m\acute{a}x}$ , respectivamente.



**Figura 7** – Esquema para avaliação do efeito do LEHDg sobre corpo cavernoso de ratos, pré-contraídos com solução despolarizante de 120 mM de KCl



Fonte: ASSIS, 2016

### 3.9.2 Avaliação da ação do LEHDg sobre a concentração do ânion superóxido em corpos cavernosos

Após a eutanásia dos animais, o pênis foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer (Quadro 2) para remoção dos tecidos conectivos e remoção parcial da túnica albugínea. Tiras de corpos cavernosos foram dissecadas, cortadas em anéis de 4 – 5 mm de comprimento, incluídas em meio para amostras frescas OCT (meio ótimo de temperatura de corte) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo estocadas (-80 °C) até a realização das análises. A microtomia do tecido foi realizada a -20 °C em criostato (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha), onde foram obtidos cortes com 8 µm de espessura, os quais foram fixados em lâminas apropriadas.

Para a realização da medida do ânion superóxido, as lâminas com os cortes de corpo cavernoso foram lavadas com solução PBS (Quadro 2) e incubadas por 15 minutos com PBS, apocinina 10 µM (um agente antioxidante em tecidos vasculares) (HEUMÜLLER et al., 2008) ou LEHDg nas concentrações de 500 ou 1000 µg/mL. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com a sonda DHE 10 µM durante 30 min a temperatura de 37 °C em câmara úmida, ao abrigo da luz (GROBE et al., 2006; WOJTALA et al., 2013). Os cortes foram lavados com PBS para remoção do excesso de sonda fluorescente e levados imediatamente

ao microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão) para análise. A intensidade de fluorescência foi utilizada para mensurar a concentração do ânion superóxido nos diferentes grupos.

A sonda DHE foi utilizada para avaliar a produção *in situ* do ânion superóxido, nos cortes de corpos cavernosos de ratos. DHE é amplamente utilizado para detecção do ânion superóxido presente no citosol devido à sua capacidade de difusão passiva para o interior das células e alta reatividade. No interior da célula, o DHE é oxidado pelo ânion superóxido, formando um produto intermediário, o 2-hidroxi-etídio (2-OHEt<sup>+</sup>) que intercala com o DNA, levando à exibição de uma fluorescência vermelha. O 2-hidroxi-etídio é excitado em 500 nm e tem um espectro de emissão a 580 nm (WOJTALA et al., 2014).

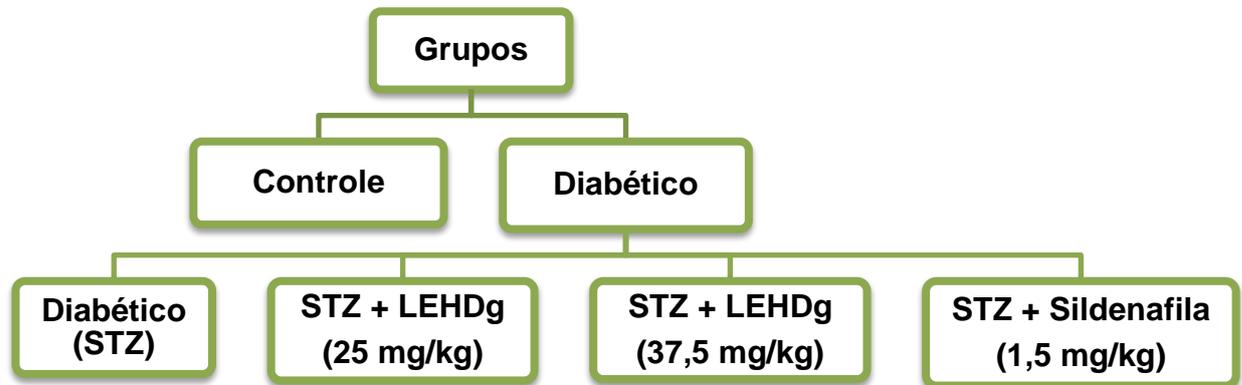
Os dados foram expressos na forma de  $\Delta$  de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{TRATADO} - \text{CONTROLE}) \times 100 / \text{CONTROLE}$$

### 3.10 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LEHDg EM RATOS COM DISFUNÇÃO ERÉTIL INDUZIDA POR DIABETES

Com o intuito de investigar o efeito do LEHDg sobre a DE, foi escolhido o modelo de DE em animais com diabetes induzido por STZ, por este ser um modelo bem caracterizado e bastante utilizado desta enfermidade (CHUNG; DE YOUNG; BROCK, 2011). Para o desenvolvimento do estudo, foram divididos aleatoriamente 40 ratos *Wistar* em cinco grupos com oito animais cada: controle (normoglicêmico), diabético, diabético tratado com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg) e diabético tratado com sildenafil (1,5 mg/kg) (Figura 8). Os grupos controle e diabético receberam apenas solução salina. Todos os tratamentos foram administrados diariamente por via intragástrica (i.g.) em volume padronizado de 5 mL/kg (MACHHOLZ et al., 2011).

**Figura 8** – Esquema dos grupos de animais utilizados para a investigação do efeito do LEHDg sobre a DE de ratos com diabetes induzido por STZ



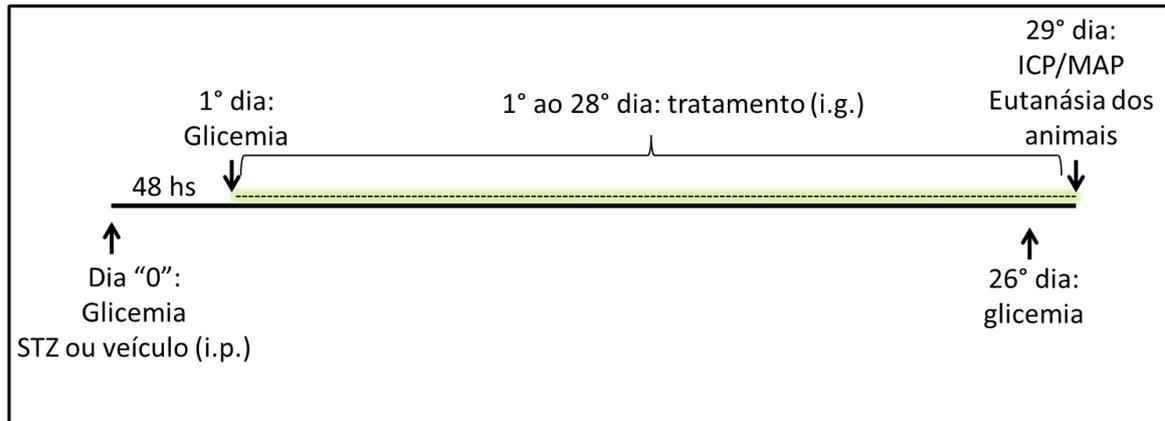
Fonte: ASSIS, 2016

### 3.10.1 Indução do diabetes por STZ

Inicialmente, todos os animais foram submetidos a um jejum de 18 horas. Após este período, os ratos foram pesados individualmente e foi aferida a glicemia. Para isto, os animais foram imobilizados e foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda, de onde foi colhido o sangue da veia caudal. A medida glicêmica foi realizada pelo uso de glicosímetro (Fácil, True Read<sup>®</sup>). A indução do diabetes foi realizada por uma única administração intraperitoneal (i.p.) de STZ (60 mg/kg) solubilizada em tampão citrato (0,01 M; pH 4,5) momentos antes da administração (YANG et al., 2013). Os animais do grupo controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, entretanto receberam a administração apenas do veículo.

Dois dias após a administração da STZ ou veículo, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas para aferição da glicemia e comprovação ou não da indução do diabetes. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram níveis glicêmicos  $\geq 250$  mg/dL (YOON et al., 2013). Após a indução do diabetes, os animais receberam o tratamento por gavagem de acordo com o grupo ao qual pertenciam, durante quatro semanas. O peso dos animais foi monitorado semanalmente e a glicemia foi aferida novamente em torno do 26<sup>o</sup> dia do tratamento (Figura 9).

**Figura 9** – Esquema para indução do diabetes e do tratamento dos animais durante quatro semanas



Fonte: ASSIS, 2016

### 3.10.2 Monitoramento da função erétil *in vivo*

Após 28 dias de tratamento, a função erétil *in vivo* dos animais foi monitorada por meio da pressão intracavernosa (ICP), que é o método mais comum de avaliação da função erétil (MCMURRAY; CASEY; NAYLOR, 2006). Os valores medidos da ICP foram normalizados pela pressão arterial média para evitar variações falsas devido às diferenças entre os animais nesse parâmetro (MAP). Inicialmente, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 75 mg/kg, respectivamente, i.p.). Em seguida, foi feita uma pequena incisão na região cervical, para dissecação e exposição da artéria carótida comum direita, onde foi implantado cateter de polietileno (PE, um segmento de PE-10 soldado a um seguimento de PE-50), para ter acesso à aorta torácica e aferição contínua da MAP.

Para registro da ICP, uma agulha 30G conectada a um cateter PE-10 foi inserida na região da crura do corpo cavernoso esquerdo. A seguir, foi realizada uma incisão abdominal, onde o tecido foi divulsionado até a identificação do gânglio pélvico maior direito, localizado na região dorsolateral da próstata, sobre o qual foi colocado um eletrodo bipolar de bronze (Animal Nerve Stimulating Electrode, MLA0320, ADInstruments) conectado a um estimulador (Stimulus generators built-in PowerLab, ADInstruments). Para medida da ICP e da MAP foram utilizados transdutores de pressão (Disposable BP Transducer, MLT0699, ADInstruments), acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, BELLA VISTA, NSW, AUSTRALIA).

O protocolo experimental foi realizado após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos e sobre o gânglio pélvico maior foram induzidas estimulações elétricas com pulsos de 1 ms, 6 V, em diferentes frequências (0,2; 0,4; 0,6; 1; 2; 4; 8 e 12 Hz), com duração de 45 s para cada frequência para a construção de uma curva frequência-resposta. As alterações de pressão foram registradas em sistema PowerLab<sup>®</sup> de aquisição de dados (software Chart, versão 7.1; ADInstruments, Colorado Springs, CO).

Em cada ciclo cardíaco, o software calculou a MAP e a relação ICP/MAP. Para a construção das curvas frequência-resposta foi utilizado o maior valor de ICP/MAP para cada frequência utilizada. Em todos os experimentos, as curvas foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como média das duas aferições. Após o monitoramento da função erétil, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os respectivos pênis foram imediatamente removidos para estudos posteriores.

As tiras de corpo cavernoso foram divididas em duas partes. A porção do corpo cavernoso mais próxima à crura foi utilizada para estudos de reatividade. A porção mais distal do corpo cavernoso foi incluída em OCT, congelada em nitrogênio líquido e mantida em *freezer* (-80 °C) para a realização dos estudos moleculares.

### **3.10.3 Estudos de reatividade do corpo cavernoso isolado de animais tratados**

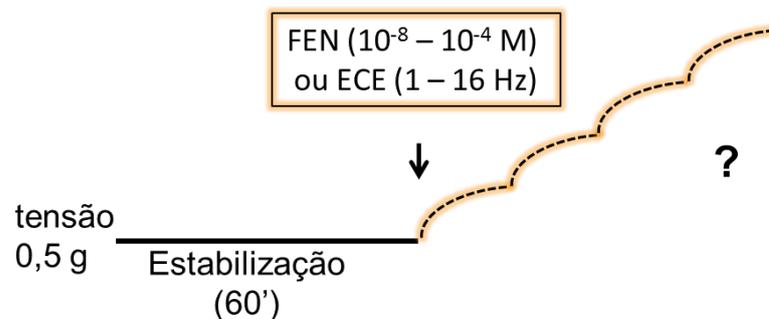
#### **3.10.3.1 Avaliação da resposta contrátil do corpo cavernoso isolado de animais tratados**

Os tecidos foram montados em cubas para órgão isolado conforme metodologia anteriormente citada (item 3.9.1.1). Após o período de estabilização foram realizados os estudos de reatividade. A contratilidade dos corpos cavernosos foi avaliada frente à adição crescente e cumulativa de FEN ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M), um agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico (CHRIST et al., 1992), para a construção de uma curva concentração-efeito. A resposta induzida por FEN foi calculada e expressa pelo  $\Delta$  de contração, ou seja, a subtração da tensão de contração induzida por cada concentração de FEN pelo valor de tensão basal. A eficácia e a potência da resposta mediada pela FEN foi avaliada por meio dos valores de  $E_{m\acute{a}x}$  e de logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do  $E_{m\acute{a}x}$  ( $pD_2$ ), respectivamente.

Além da resposta contrátil induzida pela FEN, também foi avaliada a influência da contratilidade induzida pelas terminações noradrenérgicas presentes nas preparações de corpos cavernosos, via estimulação por campo elétrico (ECE). Para isto, as tiras de corpos cavernosos foram preparadas conforme descrito anteriormente (item 3.9.1.1), entretanto os segmentos foram dispostos entre dois eletrodos de platina (Stimulating Electrode Double Ring MLA0302/8, ADInstruments) e foram estimulados por pulsos elétricos de 50 volts, com duração de 1 ms, em diferentes frequências (1, 2, 4, 8 e 16 Hz) com duração de 10 segundos para cada frequência (Figura 10).

O estímulo elétrico nas preparações de corpos cavernosos na ausência de bloqueadores causa contração, devido principalmente uma descarga adrenérgica. A resposta induzida pelo estímulo elétrico foi calculada e expressa pelo  $\Delta$  de contração, ou seja, a subtração da tensão de contração induzida por cada frequência de pulso pelo valor de tensão basal. A resposta mediada pela ECE foi avaliada comparando os valores médios do  $\Delta$  contração para cada frequência entre os diferentes grupos avaliados.

**Figura 10** – Esquema para avaliação da resposta contrátil do corpo cavernoso isolado de animais tratados durante quatro semanas



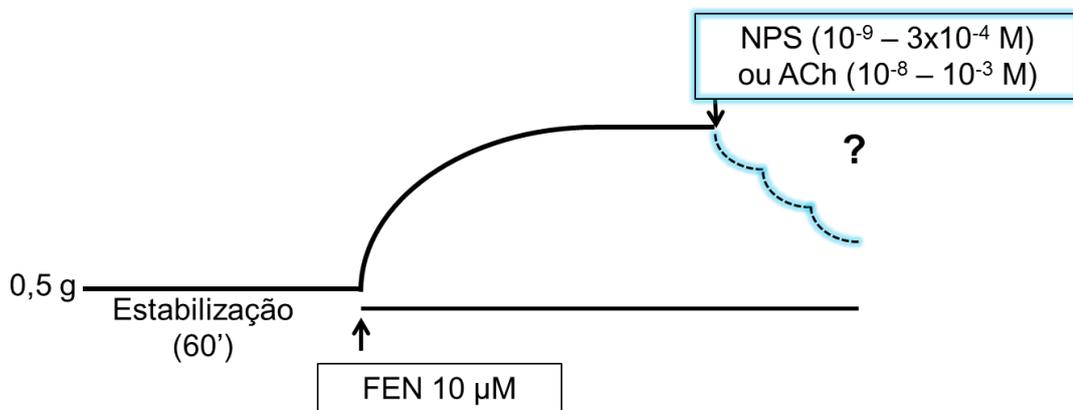
Fonte: ASSIS, 2016

### 3.10.3.2 Investigação da resposta relaxante do corpo cavernoso isolado de animais tratados

A resposta relaxante dos diferentes grupos tratados também foi avaliada. Para isto, as tiras de corpos cavernosos foram preparadas conforme descrito anteriormente (item 3.9.1.1) e sob o componente tônico da contração induzida por FEN (10  $\mu$ M), foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de NPS

( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M), um doador espontâneo de NO (SULLIVAN et al., 1999) ou de ACh ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  M), um agonista muscarínico (Figura 11). A tensão de estabilização e a tensão da contração induzida com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) correspondem a 100% e 0% de relaxamento, respectivamente. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida pela FEN. A eficácia e a potência da resposta mediada pela NPS ou ACh foram avaliadas pelos valores de  $E_{\text{máx}}$  e  $pD_2$ , respectivamente.

**Figura 11** – Esquema para avaliação da resposta relaxante do corpo cavernoso isolado de animais tratados



Fonte: ASSIS, 2016

### 3.10.4 Avaliação da produção do ânion superóxido em tiras de corpos cavernosos

Este protocolo foi utilizado para avaliar a produção *in situ* do ânion superóxido em tiras de corpos cavernosos dos animais tratados por 28 dias. As tiras de corpos cavernosos congeladas em OCT pertencentes aos diferentes grupos tratados por quatro semanas (3.10.2) foram cortadas em criostato ( $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com espessura de  $8 \mu\text{m}$ , os cortes obtidos foram fixados em lâminas apropriadas. Conforme item 3.9.2, as lâminas com os segmentos dos referidos órgãos foram lavadas com PBS e, em seguida, incubadas com o DHE ( $10 \mu\text{M}$ ) durante 30 min, à temperatura de  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em câmara úmida, ao abrigo da luz (GROBE et al., 2006; WOJTALA et al., 2013). A seguir, os cortes foram lavados com PBS para remoção do excesso de sonda fluorescente, e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão) para análise. A análise dos tecidos foi realizada como descrito no item 3.9.2.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média. Para a análise estatística das curvas concentração-resposta foram utilizados os valores de  $CE_{50}$ ,  $E_{máx}$  ou  $pD_2$ , que foram calculados a partir da regressão não linear das respostas obtidas.

Foram realizados os testes “*t*” de *Student* (não pareado) para a comparação entre duas variáveis e análise de variância (ANOVA) “*one-way*” ou “*two-way*” com o pós-teste de Bonferroni para comparação de mais de duas variáveis. Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0<sup>®</sup>.

# *Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

O *screening* fitoquímico do LEHDg revelou a presença de taninos, esteroides, flavonoides e saponinas. Entretanto, não foi detectada a presença de alcaloides.

### 4.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM LEHDg

De acordo com o método de FC, o conteúdo de fenólicos totais encontrado na amostra em estudo foi de  $413,8 \pm 8,0$  mg Eag/g peso seco do LEHDg.

### 4.3 ANÁLISE DO LEHDg POR HPLC

A análise cromatográfica identificou e quantificou dezenove diferentes compostos fenólicos em LEHDg (Tabela 1). Os compostos encontrados em LEHDg com maior concentração foram o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (249,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg), o ácido salicílico (60,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg), o 4-hidroxibenzoico (53,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg), a rutina (28,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg), a catequina (22,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg) e a quercetina (19,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  LEHDg).

**Tabela 1** – Compostos fenólicos identificados e quantificados em LEHDg por HPLC

Composto fenólico	µg do composto fenólico / mg do LEHDg
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	21,2
Ácido 4-hidroxibenzoico	53,0
Ácido p-cumárico	2,2
Ácido salicílico	60,0
Ácido siríngico	5,8
Ácido trans cinâmico	0,6
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	249,0
Ácido vanílico	9,2
Ácido felúrico	17,0
Ácido elágico	7,0
Ácido cafeico	6,4
Rutina	28,0
Miricetina	20,6
Quercetina	19,0
Naringenina	1,2
Catequina	22,2
Hesperetina	0,6
Crisina	1,2
Ácido gálico	1,0

Fonte: ASSIS, 2016

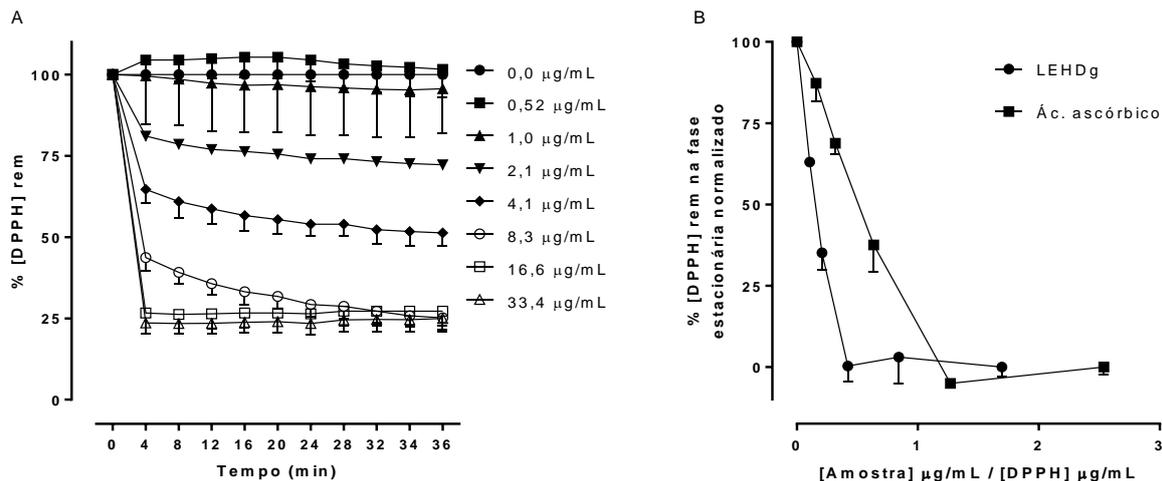
#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS - DPPH<sup>•</sup>

O LEHDg revelou possuir atividade sequestradora de radical livre (DPPH<sup>•</sup>) dependente de concentração, com ação antioxidante máxima na concentração de 8,3 µg/mL ( $\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{rem}} = 33,2 \pm 3,9\%$ ; em cerca 16 min); em todas as concentrações testadas, chegou ao estado estacionário do  $\%[\text{DPPH}]_{\text{rem}}$  em aproximadamente 16 minutos (Figura 12A).

A partir dos valores de  $\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{rem}}$  no estado estacionário e dos valores da concentração do LEHDg obtidos a partir das leituras de absorbância (equação linear ( $A_{490\text{nm}} = 0,01116 [\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{T}} - 0.01031$ )), foi construído o gráfico da figura 12B, o qual

demonstrou a potente atividade antioxidante do LEHDg, com  $CE_{50} = 0,146 \pm 0,004$  [LEHDg]  $\mu\text{g/mL}$  / [DPPH]  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparado ao ác. ascórbico que apresentou  $CE_{50} = 0,503 \pm 0,051$  [ácido ascórbico]  $\mu\text{g/mL}$  / [DPPH]  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 12** – Medida da atividade sequestradora de radical livre (DPPH<sup>•</sup>) por LEHDg



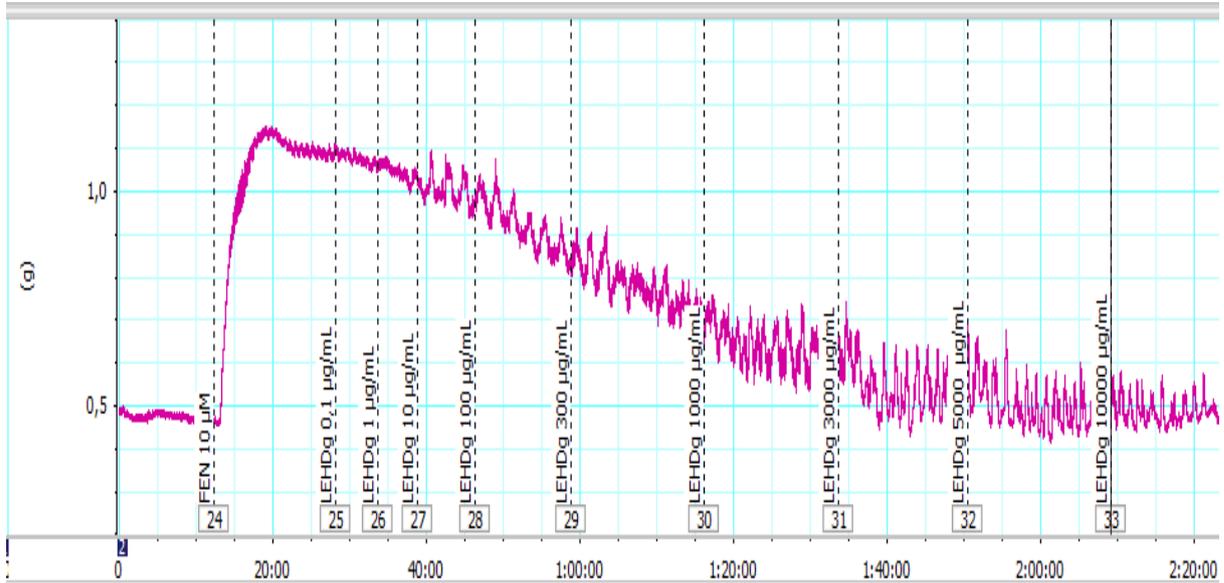
A. Gráfico do  $\%[\text{DPPH}]_{\text{rem}}^{\bullet}$  para diferentes concentrações do LEHDg em função do tempo (min)  
 B. Gráfico do  $\%[\text{DPPH}]_{\text{rem}}^{\bullet}$  normalizado encontrado no estado estacionário em função da concentração do LEHDg ou ácido ascórbico em relação a concentração de DPPH<sup>•</sup>. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m., do experimento realizado em triplicata  
 Fonte: ASSIS, 2016

## 4.5 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

### 4.5.1 Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraindidos por FEN

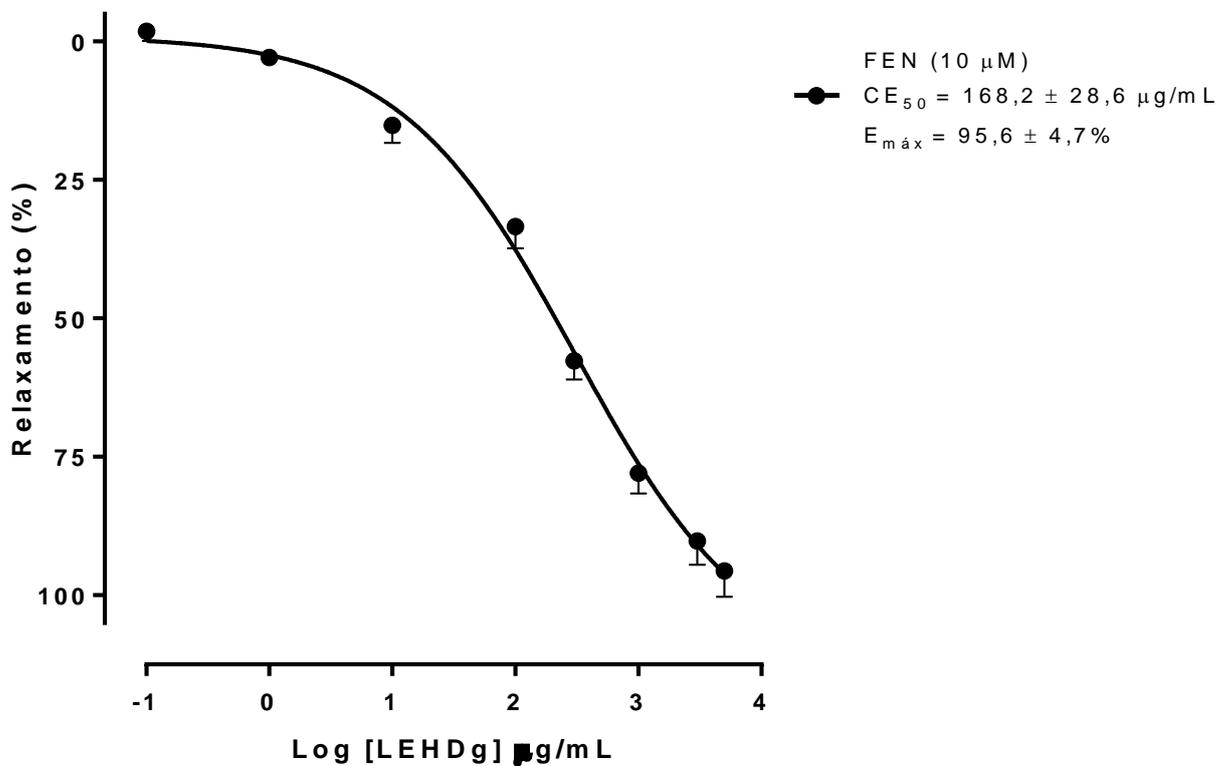
A adição crescente e cumulativa do LEHDg (0,1 – 5000  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a contração tônica induzida por FEN (10  $\mu\text{M}$ ) provocou relaxamento dependente de concentração em tiras de corpos cavernosos de rato ( $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $CE_{50} = 168,2 \pm 28,6$   $\mu\text{g/mL}$ ;  $n = 7$ ) (Figura 13 e 14). O tempo necessário para obtenção das respostas máximas nas diferentes concentrações variou de 4 a 16 minutos. O tempo total de relaxamento máximo foi de aproximadamente 88 minutos.

**Figura 13** – Registro original representativo da resposta relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos de ratos pré-contraídas com FEN



Fonte: ASSIS, 2016

**Figura 14** – Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos

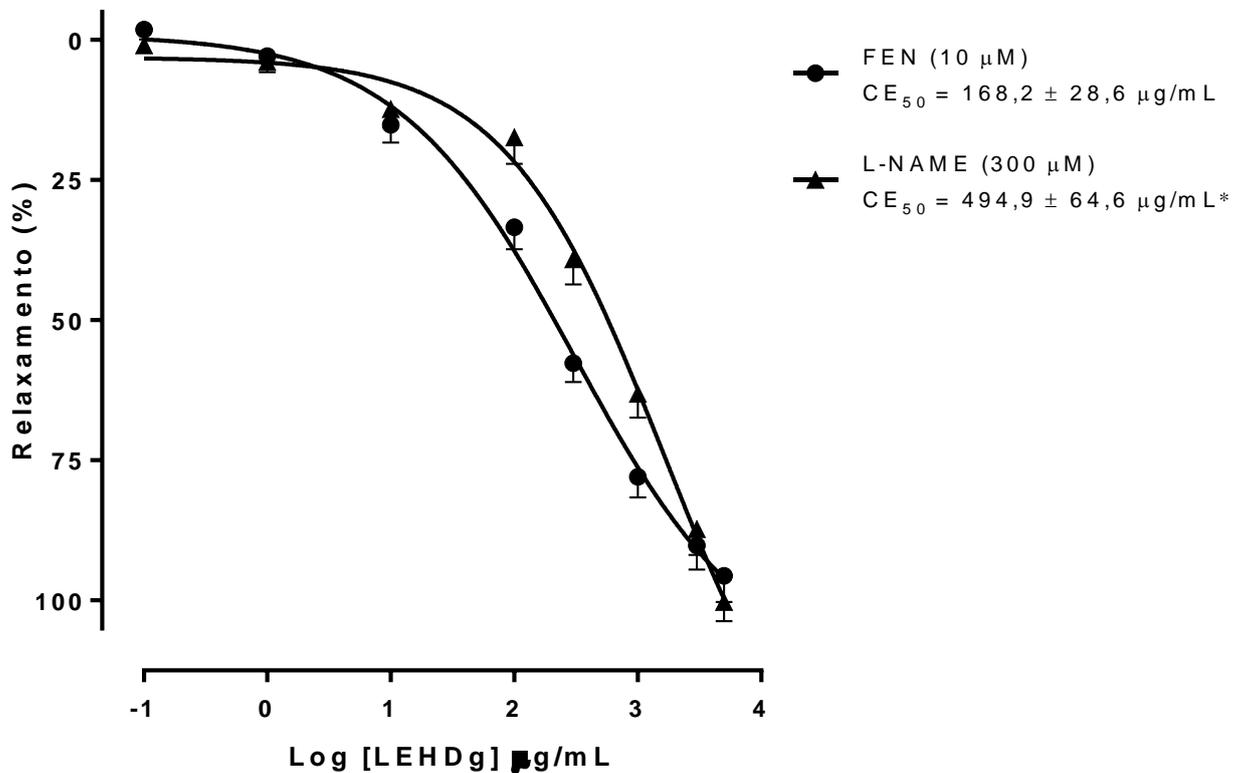


Curva concentração-resposta do efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos  
 Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.5.2 Participação da NOS na resposta relaxante induzida por LEHDg

O tratamento prévio das tiras de corpos cavernosos com L-NAME (300  $\mu$ M), um inibidor inespecífico da enzima NOS (WOODE et al., 2013), atenuou a resposta relaxante induzida por LEHDg. A presença deste inibidor promoveu redução da potência do LEHDg ( $CE_{50} = 494,9 \pm 64,6 \mu\text{g/mL}$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ), sem alteração do seu efeito máximo ( $E_{\text{máx}} = 100,2 \pm 3,5\%$ ;  $n = 6$ ) quando comparado ao controle ( $CE_{50} = 168,2 \pm 28,6 \mu\text{g/mL}$ ;  $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $n = 7$ ) (Figura 15).

**Figura 15** – Envolvimento da NOS no efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos



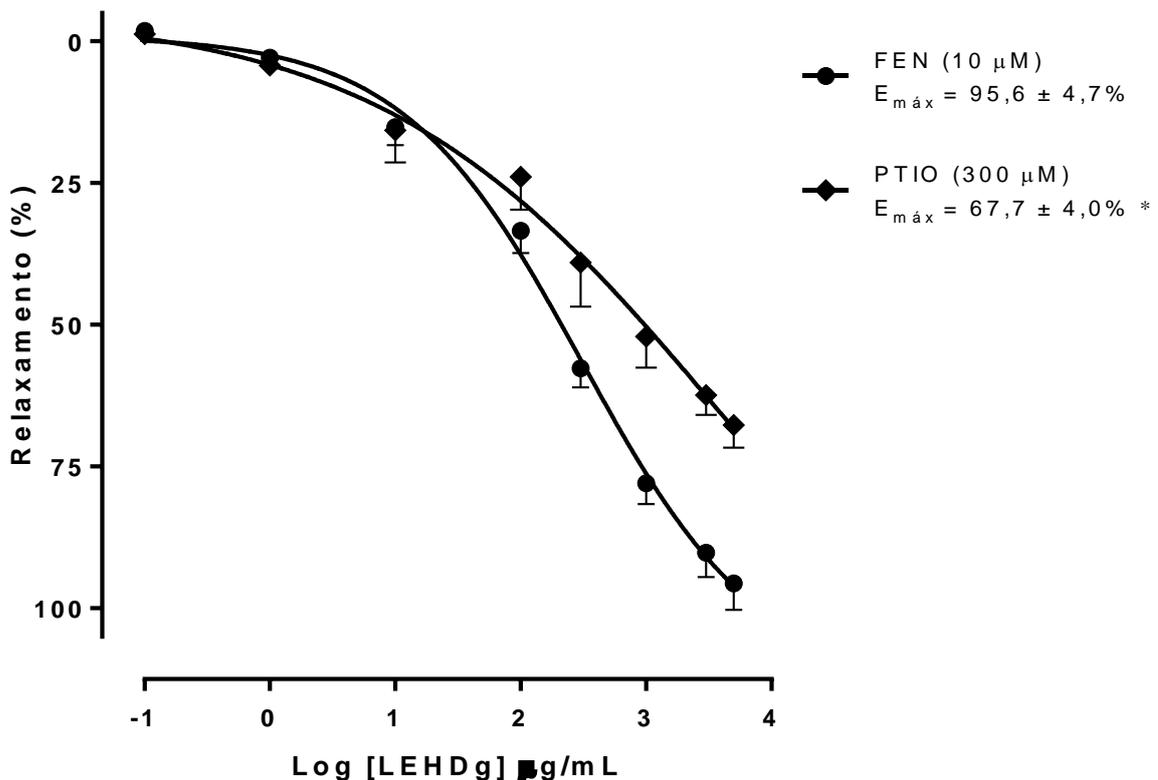
Curvas concentração-resposta do efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN, na ausência ( $n = 7$ ; ●) e na presença de L-NAME 300  $\mu\text{M}$  ( $n = 6$ ; ▲). Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs FEN

Fonte: ASSIS, 2016

### 4.5.3 Participação do NO radicalar (NO<sup>•</sup>) no efeito relaxante induzido por LEHDg

O pré-tratamento das tiras de corpos cavernosos com PTIO (300  $\mu$ M), um sequestrador intracelular do NO na forma radicalar (NO<sup>•</sup>) (AYAJIKI; FUJIOKA; OKAMURA, 2000), causou deslocamento para a direita da curva concentração-resposta do efeito relaxante induzido por LEHDg. A presença deste sequestrador promoveu significativa redução da eficácia do LEHDg ( $E_{m\acute{a}x} = 67,7 \pm 4,0\%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ), sem alteração da sua potência ( $CE_{50} = 260,0 \pm 94,8 \mu\text{g/mL}$ ), quando comparadas ao controle ( $E_{m\acute{a}x} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $CE_{50} = 168,2 \pm 28,6 \mu\text{g/mL}$ ;  $n = 7$ ) (Figura 16).

**Figura 16** – Envolvimento do NO<sup>•</sup> no efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos

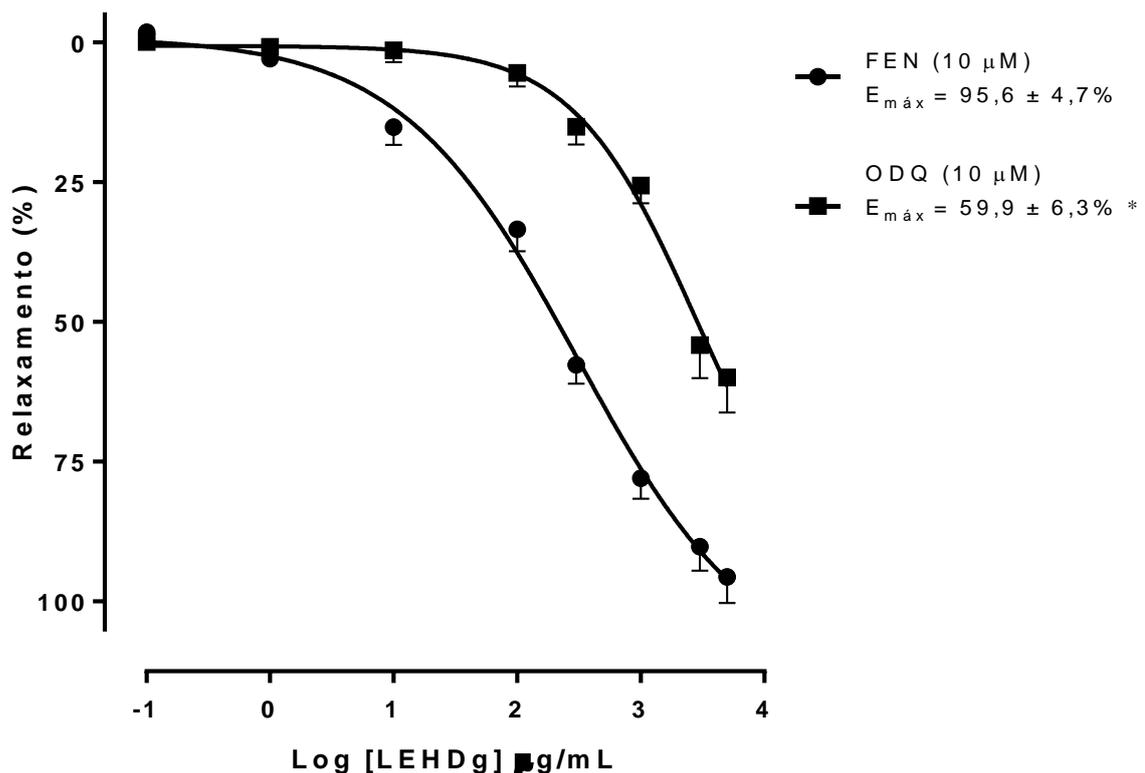


Curvas concentração-resposta do efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN, na ausência ( $n = 7$ ; ●) e na presença de PTIO 300  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ; ◆). Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs FEN  
Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.5.4 Participação da CGs na resposta relaxante induzida por LEHDg

A resposta relaxante induzida por LEHDg foi significativamente inibida, quando as preparações de corpos cavernosos de ratos foram pré-incubados com ODQ (10  $\mu$ M), um inibidor da CGs (SCHRAMMEL et al., 1996). Houve deslocamento da curva para direita, com redução da potência ( $CE_{50} = 890,2 \pm 122,1 \mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,05$ ) e do efeito máximo ( $E_{\text{máx}} = 59,9 \pm 6,3\%$ ;  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), quando comparados ao controle ( $CE_{50} = 168,2 \pm 28,6 \mu\text{g/mL}$ ;  $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $n = 7$ ), respectivamente (Figura 17).

**Figura 17** – Envolvimento da GCs sobre o efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos



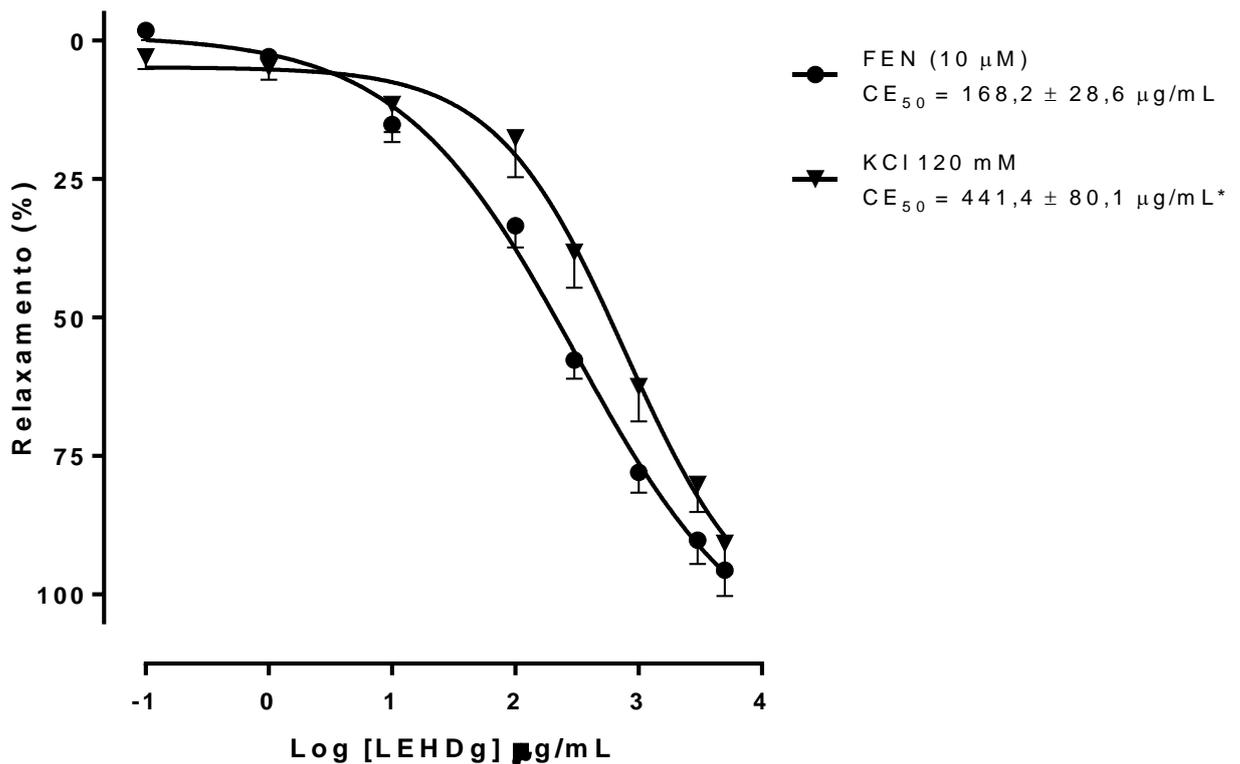
Curvas concentração-resposta do efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN, na ausência ( $n = 7$ ; ●) e na presença de ODQ 10  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ; ■). Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs FEN

Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.5.5 Efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 120 mM

O LEHDg promoveu relaxamento de forma crescente e cumulativa em tiras de corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com solução despolarizante de 120 mM de  $K^+$ . A curva concentração-efeito do LEHDg foi deslocada para a direita, com diminuição da potência ( $CE_{50} = 441,4 \pm 80,1 \mu\text{g/mL}$ ;  $p < 0,05$ ), sem alterações no efeito máximo ( $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $n = 4$ ), quando comparado ao relaxamento induzido por este liofilizado em preparações de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN ( $CE_{50} = 168,2 \pm 28,6 \mu\text{g/mL}$ ;  $E_{\text{máx}} = 95,6 \pm 4,7\%$ ;  $n = 7$ ) (Figura 18).

**Figura 18** – Efeito do LEHDg sobre tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com KCl 120 mM



Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante do LEHDg em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com FEN ( $n = 7$ ; ●) ou com solução despolarizante de 120 mM de KCl ( $n = 4$ ; ▼). Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs FEN

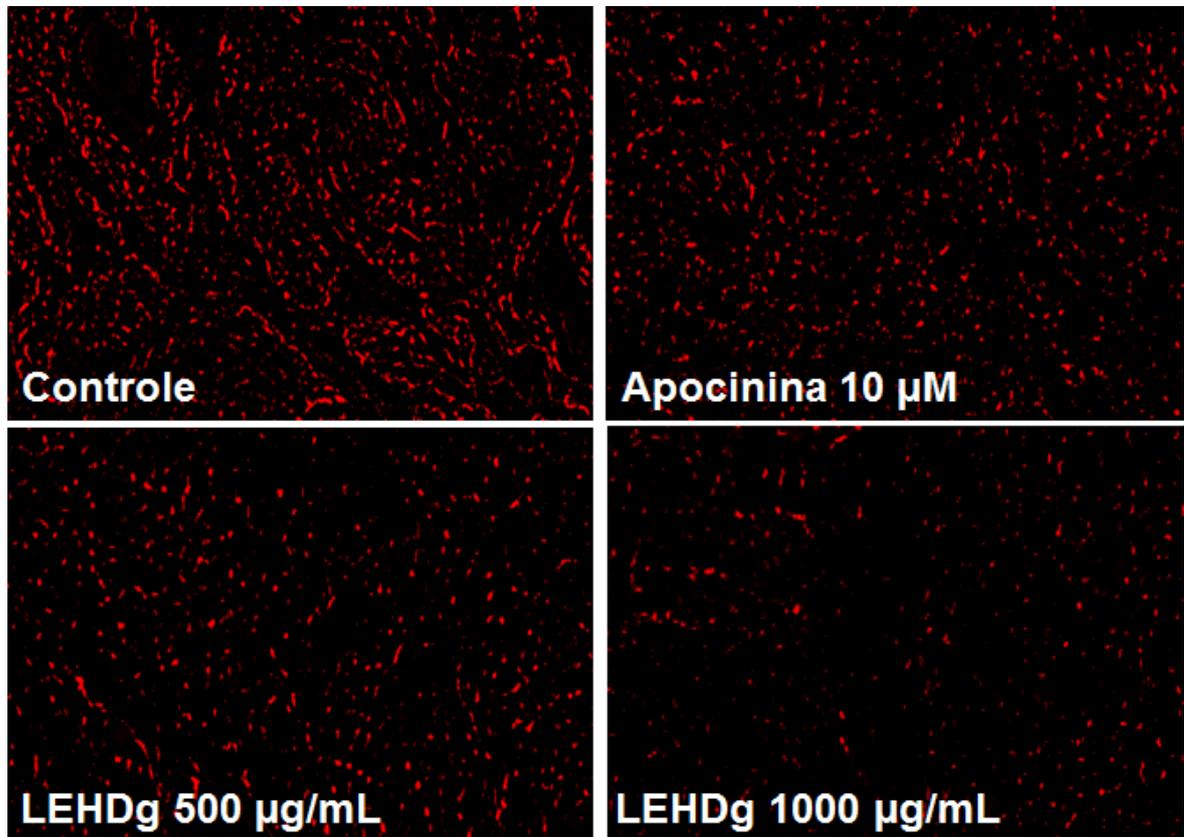
Fonte: ASSIS, 2016

#### **4.5.6 Atividade antioxidante do LEHDg em corpo cavernoso por microscopia de fluorescência**

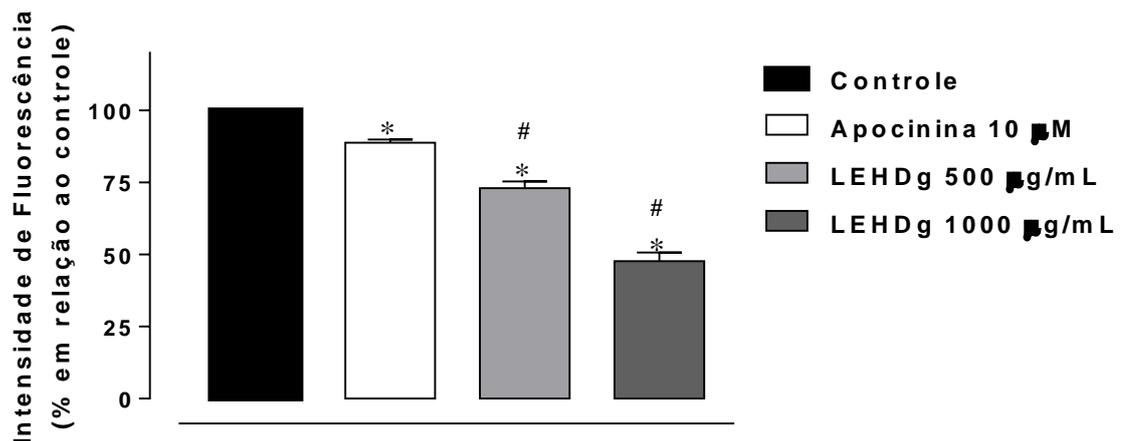
A sonda DHE emite fluorescência basal em cortes de corpos cavernosos isolados de ratos ( $100,0 \pm 0,0\%$ ). A pré-incubação destes tecidos eréteis com apocinina ( $10 \mu\text{M}$ ), LEHDg 500 ou  $1000 \mu\text{g/mL}$  induziu uma diminuição significativa do sinal de fluorescência basal emitida pela sonda DHE ( $88,9 \pm 2,2\%$ ;  $73,1 \pm 4,5\%$ ;  $47,8 \pm 5,4$ ; respectivamente;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle ( $100\%$ ). A ação antioxidante sobre o ânion superóxido induzida pelas duas concentrações do LEHDg (500 ou  $1000 \mu\text{g/mL}$ ) foi significativamente superior ao efeito antioxidante induzido pela apocinina ( $10 \mu\text{M}$ ) e apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

**Figura 19 – Efeito antioxidante do LEHDg em corpo cavernoso**

**A**



**B**



Medida da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE em cortes transversais de corpo cavernoso de rato. A. Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de corpo cavernoso de ratos controle ou pré-tratados com apocinina 10 µM, LEHDg 500 ou 1000 µg/mL (objetiva 10 X). B. Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal de DHE em tiras de corpo cavernoso de ratos controle ou pré-tratados com apocinina 10 µM, LEHDg 500 ou 1000 µg/mL. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle ± e.p.m. (n = 4 para cada grupo). \*p < 0,05 vs controle, # p < 0,05 vs Apocinina  
 Fonte: ASSIS, 2016

## 4.6 EFEITOS DO LEHDg SOBRE A DISFUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS INDUZIDA PELO DIABETES

### 4.6.1 Peso corporal dos diferentes grupos de animais durante o período de tratamento de quatro semanas

No início do tratamento, os animais de todos os grupos estudados apresentaram médias dos pesos corporais semelhantes (200 a 230 g;  $p > 0,05$ ). No decorrer dos 28 dias do estudo, os animais controle apresentaram aumento gradual de seus pesos. Por outro lado, os animais do grupo diabético (STZ) apresentaram diminuição significativa dos seus pesos quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Os grupos de animais diabéticos que receberam tratamentos diários com LEHDg 25 mg/kg, LEHDg 37,5 mg/kg ou sildenafil 1,5 mg/kg nas quatro semanas de estudo, não apresentaram alterações na perda de peso induzido pelo diabetes ( $p > 0,05$ ), mas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle. Não foi encontrada nenhuma diferença entre os pesos corporais dos grupos de animais diabéticos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2 e Figura 20).

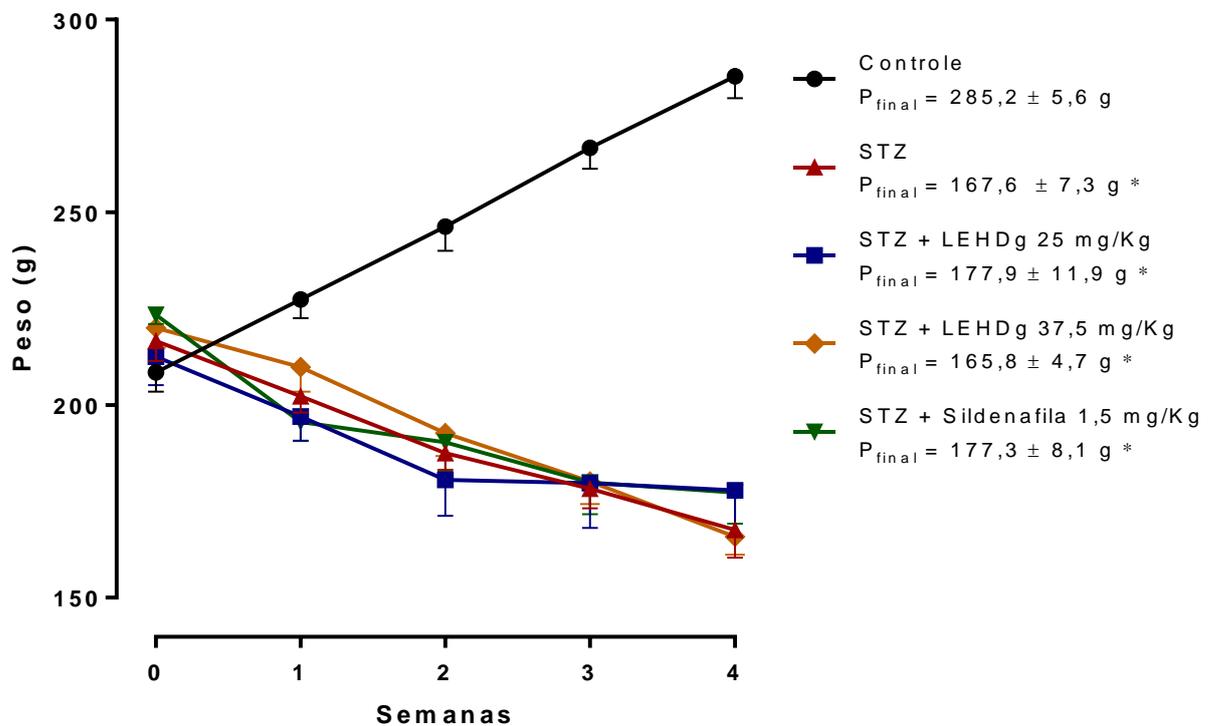
**Tabela 2** – Alteração do peso corporal nos diferentes grupos durante o período de tratamento

Grupos Tempo	Controle (g; n = 8)	STZ (g; n = 8)	STZ + LEHDg 25 (g; n = 7)	STZ + LEHDg 37,5 (g; n = 6)	STZ + Sildenafil (g; n = 7)
<b>1º dia</b>	208,5 ± 5,0	216,6 ± 5,2	212,6 ± 7,4	220,0 ± 5,1	223,4 ± 2,5
<b>1ª semana</b>	227,4 ± 4,8	202,3 ± 4,2	197,0 ± 6,3*	209,8 ± 6,4	195,6 ± 4,9*
<b>2ª semana</b>	246,3 ± 6,3	187,5 ± 4,3*	180,6 ± 9,3*	192,7 ± 5,9*	190,3 ± 7,5*
<b>3ª semana</b>	266,8 ± 5,5	178,3 ± 5,1*	179,7±11,6*	180,2 ± 5,9*	179,9 ± 8,2*
<b>4ª semana</b>	285,3 ± 5,6	167,6 ± 7,3*	177,9±11,9*	165,8 ± 4,7*	177,3 ± 8,0*

Valores médios do peso corporal (g) em relação ao tempo (semanas) dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  vs controle

Fonte: ASSIS, 2016

**Figura 20** – Alteração do peso corporal nos diferentes grupos durante o período de tratamento



Curva que representa os valores médios do peso corporal (g) em relação ao tempo (semanas) dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: controle (n = 8; ●), STZ (n = 8; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 7; ■), STZ +LEHDg 37,5 mg/kg (n = 6; ◆) ou STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 7; ▼). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*p < 0,05 vs controle  
Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.2 Modificação dos níveis glicêmicos no início e no final do tratamento dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas

Inicialmente, no dia “0” (zero), todos os animais foram considerados normoglicêmicos, com valores médios de glicemia de jejum entre 77 a 96 mg/dL. Os grupos de animais que receberam injeção única de STZ (60 mg/kg) apresentaram aumento significativo dos seus níveis glicêmicos ( $\geq 250$  mg/dL; p < 0,05) dois dias após sua administração, quando comparados as suas respectivas glicemias no dia “0” e ao grupo controle.

Após a confirmação da indução do diabetes (1º dia), deu-se início ao tratamento por 28 dias (YOON et al., 2013). No final da 4ª semana do tratamento, as glicemias dos grupos diabéticos permaneceram altas, significativamente superiores aos do grupo controle e as suas respectivas glicemias no dia “0” (p < 0,05). Nenhum dos tratamentos utilizados (sildenafil 1,5 mg/kg, LEHDg 25 ou 37,5 mg/kg)

promoveu alteração nos níveis glicêmicos quando comparados ao grupo diabético ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3 e Figura 21).

**Tabela 3 – Modificação dos níveis glicêmicos durante o período de tratamento**

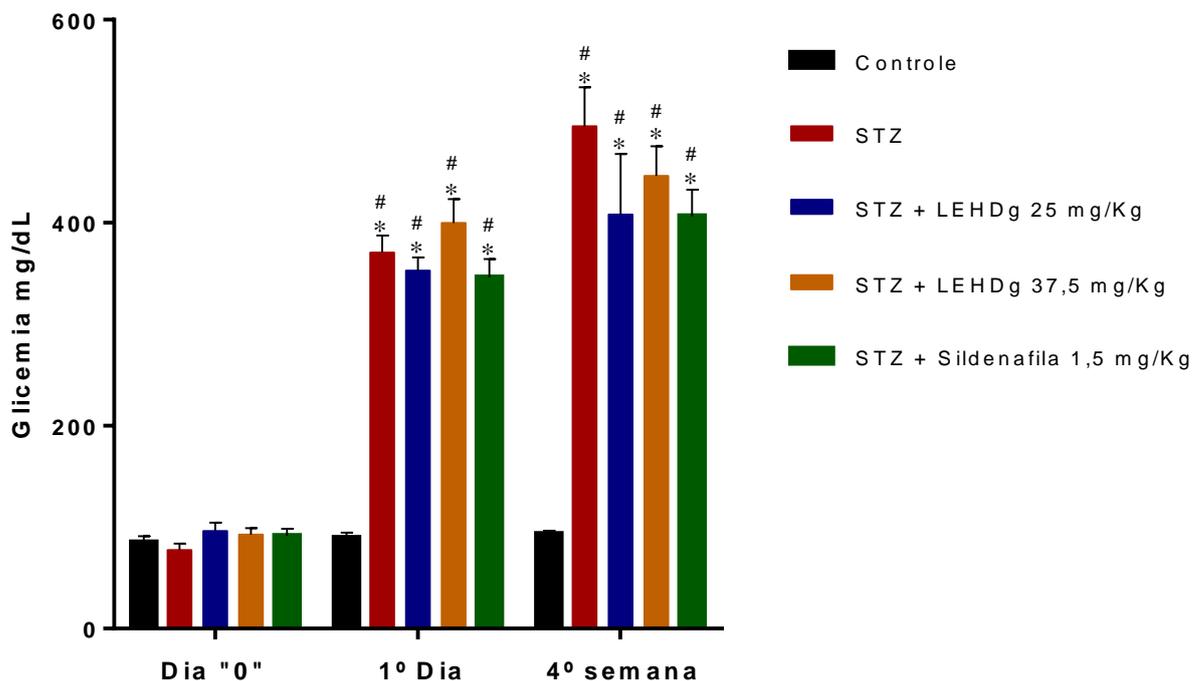
Grupos Tempo	Controle (mg/dL; n=8)	STZ (mg/dL; n=8)	STZ + LEHDg 25 (mg/dL; n=7)	STZ + LEHDg 37,5 (mg/dL; n=8)	STZ + Sildenafil (mg/dL; n=7)
<b>Dia "0"</b>	85,0 ± 5,9	77,3 ± 6,3	96,1 ± 8,1	91,4 ± 6,9	92,5 ± 6,3
<b>1º dia</b>	89,4 ± 5,2	370,6 ± 16,8*#	352,6 ± 13,3*#	399,6 ± 23,7*#	346,1 ± 18,1*#
<b>4ª semana</b>	93,1 ± 3,3	495,0 ± 38,4*#	408,0 ± 59,6*#	446,1 ± 29,3*#	406 ± 26,3*#

Valores médios dos níveis glicêmicos (mg/dL) no início e no final do tratamento dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m.

\* $p < 0,05$  vs controle; # $p < 0,05$  vs respectivo dia "0" de cada grupo

Fonte: ASSIS, 2016

**Figura 21 – Modificação dos níveis glicêmicos durante o período de tratamento**



Valores médios dos níveis glicêmicos (mg/dL) no início e no final do tratamento dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: controle (n = 8), STZ (n = 8), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 7), STZ + LEHDg 37,5 mg/k (n = 8) ou STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 7). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  vs controle; # $p < 0,05$  vs respectivo dia "0" de cada grupo

Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.3 Valores da ICP/MAP dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas

O aumento nas frequências de estimulações sobre o nervo cavernoso, via gânglio pélvico maior, promoveu aumento de ICP/MAP em todos os grupos tratados. Os animais diabéticos apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da ICP/MAP em diferentes frequência (2; 4; 8 e 12 Hz) quando comparados as respectivas ICP/MAP do grupo controle, o que confirma a indução da DE pelo diabetes nos animais que receberam a STZ.

Os tratamentos por quatro semanas dos animais diabéticos com LEHDg 25 mg/kg (2; 4; 8 e 12 Hz) ou 37,5 mg/kg (2; 4 e 12 Hz) promoveram melhoras significativas da função erétil quando comparados ao grupo diabético ( $p < 0,05$ ). Já o tratamento com sildenafil 1,5 mg/kg/dia (2; 4; 8 e 12 Hz;  $p < 0,05$ ) promoveu melhora da função erétil quando comparado ao grupo diabético, sem diferença do grupo controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4 e Figura 22). Não foram encontradas diferenças nas medidas de ICP/MAP entre os grupos tratados com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg;  $p > 0,05$ ).

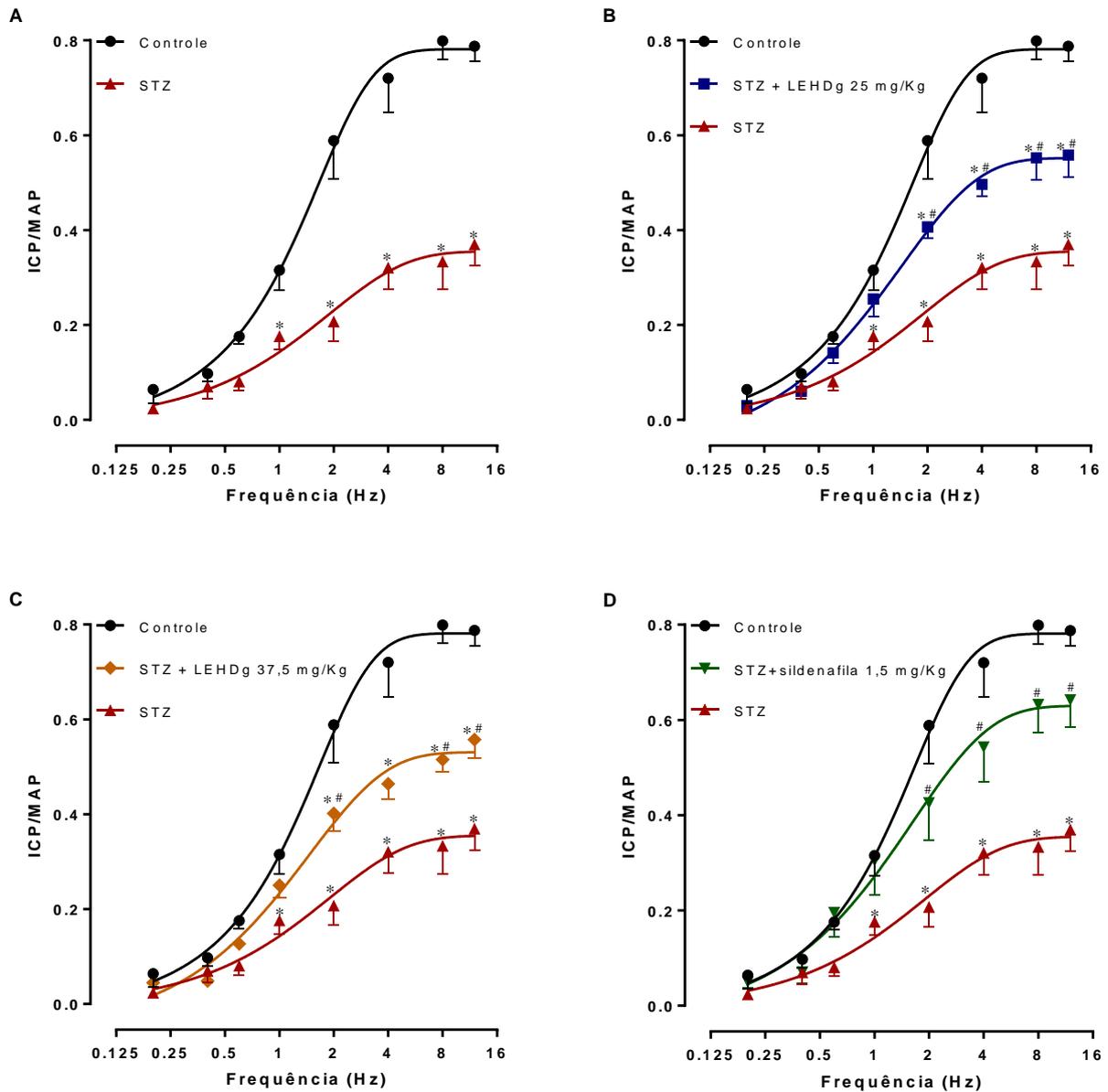
**Tabela 4 – Variação da ICP/MAP dos diferentes grupos após tratamento**

Grupos Frequência	Controle (n = 5)	STZ (n = 7)	STZ + LEHDg 25 (n = 5)	STZ + LEHDg 37,5 (n = 5)	STZ + Sildenafil (n = 5)
<b>1 Hz</b>	0,32 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,31 ± 0,07
<b>2 Hz</b>	0,59 ± 0,08	0,20 ± 0,04*	0,41 ± 0,03*#	0,40 ± 0,04*#	0,43 ± 0,08#
<b>4 Hz</b>	0,72 ± 0,07	0,32 ± 0,04*	0,50 ± 0,03*#	0,46 ± 0,03*	0,54 ± 0,07#
<b>8 Hz</b>	0,80 ± 0,04	0,33 ± 0,06*	0,55 ± 0,05*#	0,52 ± 0,03*#	0,63 ± 0,06#
<b>12 Hz</b>	0,79 ± 0,03	0,37 ± 0,04*	0,56 ± 0,05*#	0,56 ± 0,04*#	0,64 ± 0,06#

Valores de ICP/MAP em função de diversas frequências (Hz) de estimulação do gânglio pélvico maior nos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. \* $p < 0,05$  vs controle; # $p < 0,05$  vs STZ.

Fonte: ASSIS, 2016

**Figura 22 – Variação da ICP/MAP dos diferentes grupos após tratamento**



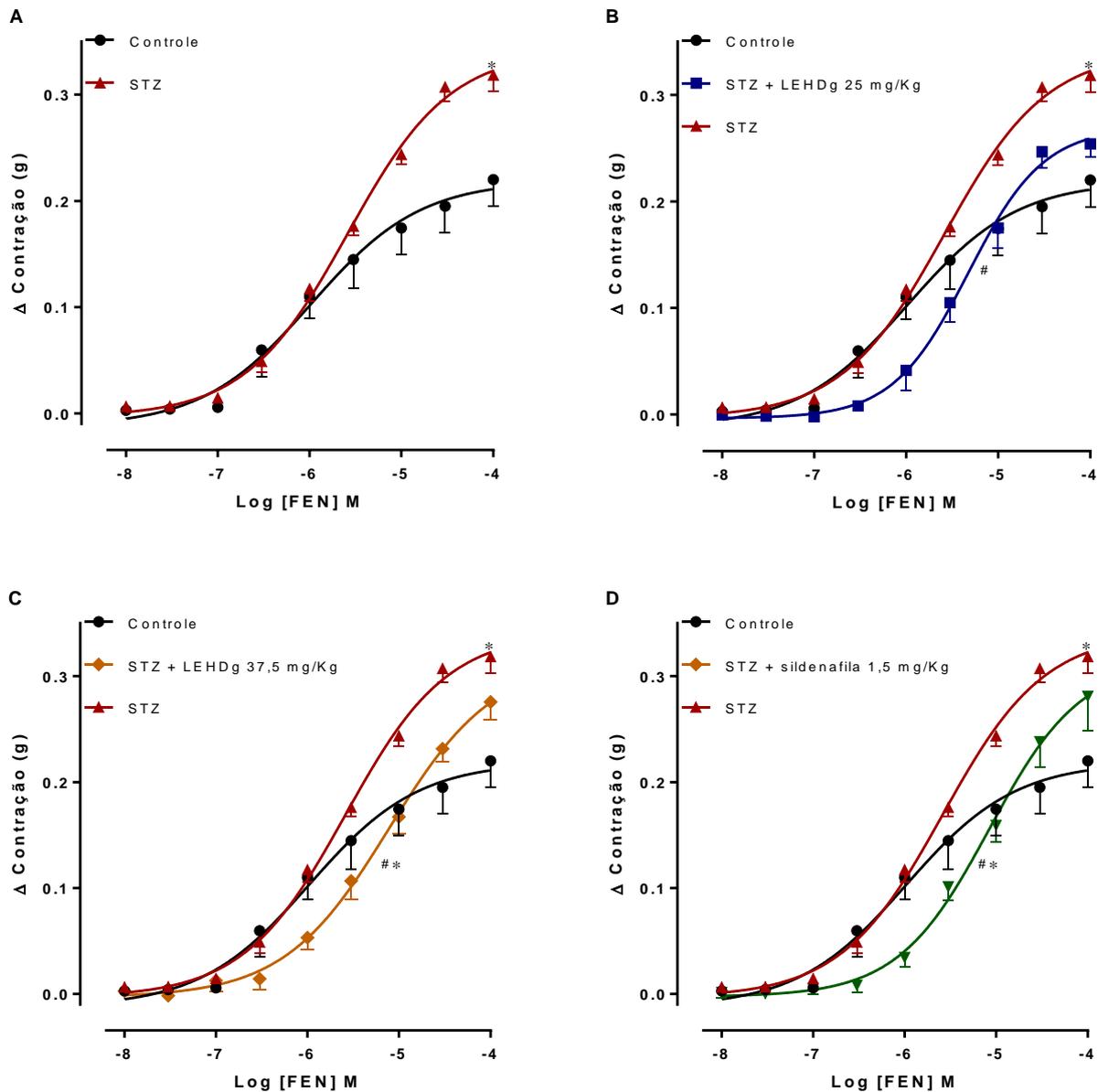
Curva de ICP/MAP em função de diversas frequências (Hz) de estimulação do gânglio pélvico maior nos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: ratos controle (n = 5; ●), diabético (STZ; n = 7; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 5; ■), STZ + LEHDg 37,5 mg/kg (n = 5; ◆) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 5; ▼). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. \*p < 0,05 vs controle; #p < 0,05 vs STZ  
 Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.4 Efeito contrátil de FEN em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas

A adição crescente de FEN ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M) promoveu contração dependente de concentração em tiras de corpo cavernoso isoladas dos ratos de todos os grupos estudados. O aumento significativo da resposta contrátil induzida pela FEN foi observado nos animais diabéticos ( $E_{m\acute{a}x} = 0,32 \pm 0,02$  g;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle ( $E_{m\acute{a}x} = 0,22 \pm 0,03$  g;  $n = 5$ ).

O tratamento por 28 dias dos animais diabéticos com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg) ( $pD_2 = 5,38 \pm 0,07$ ,  $n = 6$ ;  $pD_2 = 5,32 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ ; respectivamente;  $p < 0,05$ ) ou sildenafil 1,5 mg/kg ( $pD_2 = 5,25 \pm 0,07$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) promoveu atenuação significativa da potência da hipercontratibilidade induzida pela FEN quando comparada ao grupo diabético ( $pD_2 = 5,65 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ ). Não foram encontradas diferenças nas respostas contráteis da FEN entre os tratamentos com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg) e sildenafil 1,5 mg/kg ( $p > 0,05$ ) (Figura 23).

**Figura 23** – Variabilidade do efeito contrátil de FEN em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento



Curvas concentração-resposta para FEN ( $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M) em tiras de corpo cavernoso isolado dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: ratos controle (n = 5; ●), diabético (STZ; n = 6; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 6; ■), STZ + LEHDg 37,5 mg/kg (n = 5; ◆) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 6; ▼). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \*p < 0,05 vs controle; #p < 0,05 vs STZ

Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.5 Resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas

A ECE em diferentes frequências (1; 2; 4; 8 e 16 Hz) induziu efeito contracturante em tiras de corpo cavernoso isolados dos ratos de todos os grupos estudados. Os animais diabéticos apresentaram maior contratilidade nestas preparações frente a todas as ECE's de forma significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas às respostas obtidas pelo grupo controle. Efeito semelhante foi observado com os animais diabéticos tratados por quatro semanas com LEHDg (25 mg/kg) ou sildenafil 1,5 mg/kg, que também apresentaram hipercontratilidade em todas as frequências utilizadas e não apresentaram alteração deste efeito quando comparadas ao grupo diabético ( $p > 0,05$ ).

O tratamento dos animais diabéticos por 28 dias com LEHDg 37,5 mg/kg promoveu atenuação significativa do aumento da contratilidade induzido pela ECE ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo diabético, embora não tenha reduzido a valores semelhantes ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5 e Figura 24).

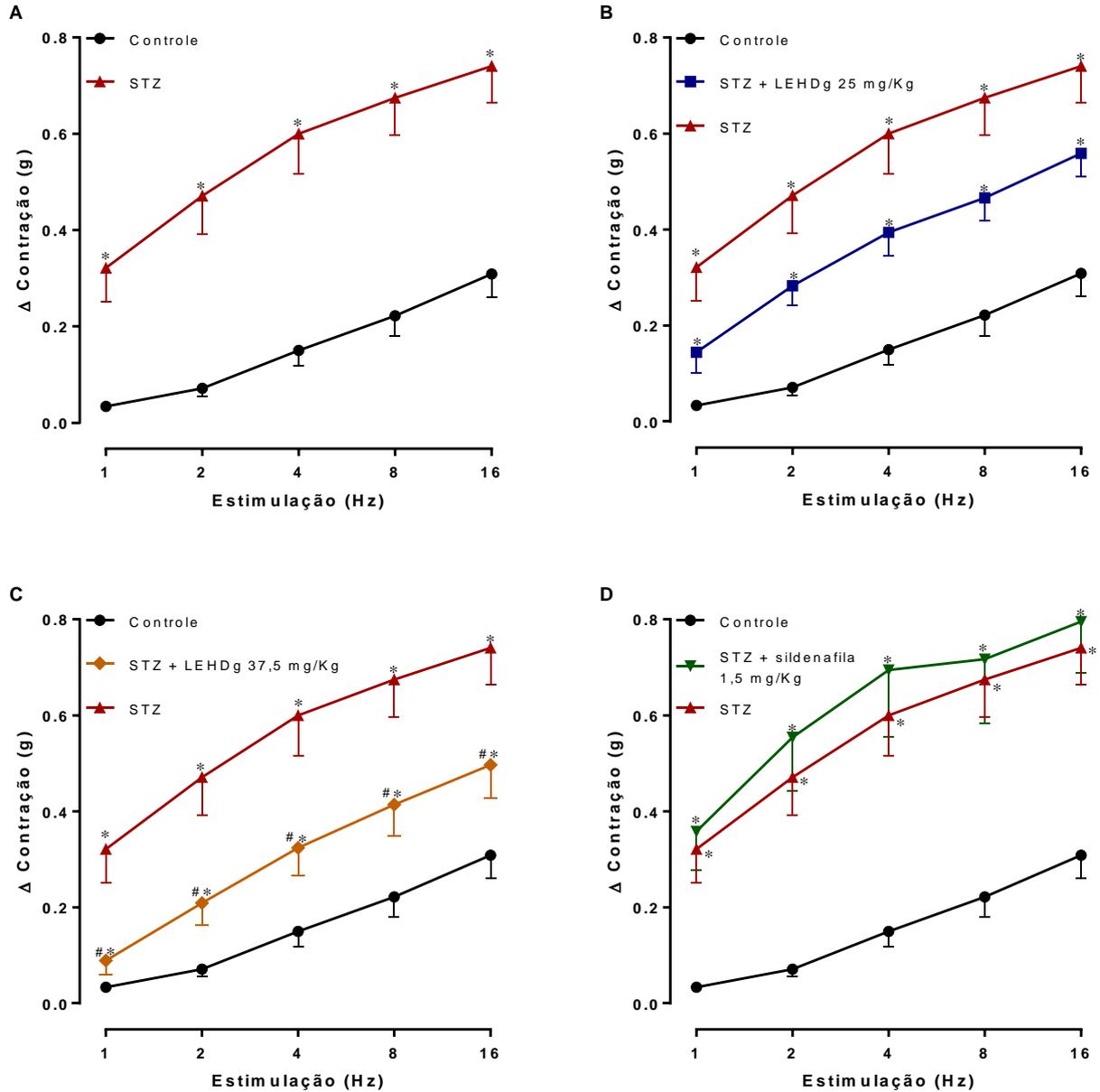
**Tabela 5** – Alteração da resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento

Grupos Frequência	Controle (g; n = 7)	STZ (g; n = 6)	STZ + LEHDg 25 (g; n = 6)	STZ + LEHDg 37,5 (g; n = 6)	STZ + Sildenafil (g; n = 8)
<b>1 Hz</b>	0,03 ± 0,01	0,32 ± 0,07*	0,15 ± 0,04*	0,09 ± 0,03*#	0,36 ± 0,08*
<b>2 Hz</b>	0,07 ± 0,01	0,47 ± 0,08*	0,28 ± 0,04*	0,21 ± 0,04*#	0,55 ± 0,11*
<b>4 Hz</b>	0,15 ± 0,03	0,60 ± 0,08*	0,39 ± 0,05*	0,32 ± 0,06*#	0,69 ± 0,14*
<b>8 Hz</b>	0,22 ± 0,04	0,67 ± 0,07*	0,47 ± 0,05*	0,41 ± 0,07*#	0,72 ± 0,13*
<b>16 Hz</b>	0,31 ± 0,05	0,74 ± 0,08*	0,56 ± 0,05*	0,50 ± 0,07*#	0,80 ± 0,11*

Valores do  $\Delta$  de contração (g) induzido pela estimulação por campo elétrico (Hz) em tiras de corpos cavernosos dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. \* $p < 0,05$  vs controle; # $p < 0,05$  vs STZ

Fonte: ASSIS, 2016

**Figura 24** – Alteração da resposta contrátil da estimulação por campo elétrico em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento



Curvas estimulação-resposta (1 – 16 Hz) em tiras de corpos cavernosos dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: ratos controle (n = 7; ●), diabético (STZ; n = 6; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 6; ■), STZ + LEHDg 37,5 mg/Kg (n = 6; ◆) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 8; ▼). Os dados estão representados como médias ± e.p.m. \*p < 0,05 vs controle; #p < 0,05 vs STZ

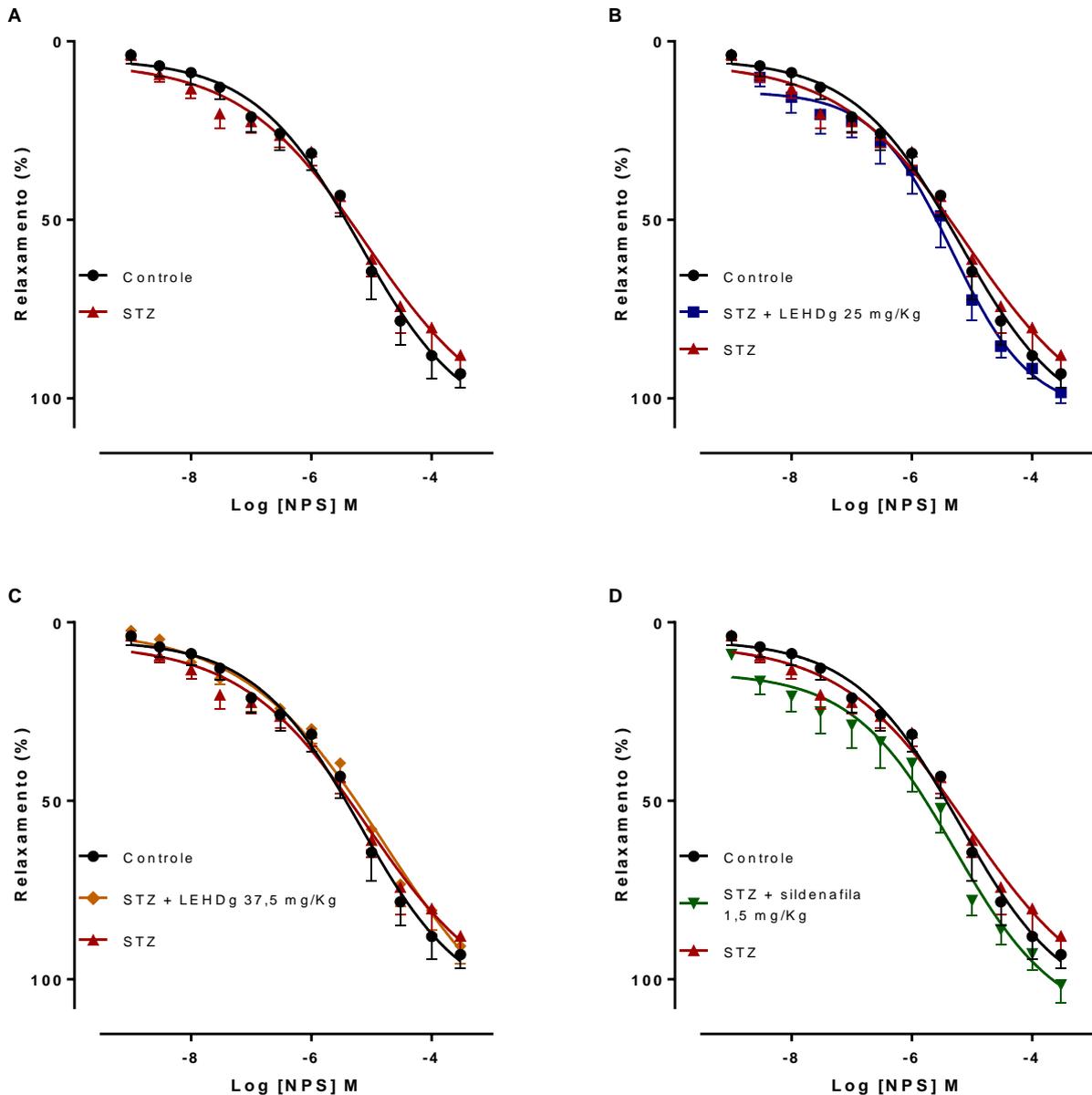
Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.6 Efeito relaxante de NPS em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas

Diferentes concentrações de NPS ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M), um doador espontâneo de NO, induziu relaxamento dependente de concentração em preparações de corpos cavernosos de ratos de todos os grupos estudados. O estabelecimento da hiperglicemia por quatro semanas nos animais diabéticos não induziu nenhuma alteração significativa no relaxamento induzido por NPS ( $E_{m\acute{a}x} = 87,9 \pm 5,3\%$ ;  $pD_2 = 5,7 \pm 0,1$ ;  $n = 6$ ;  $p > 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle ( $E_{m\acute{a}x} = 93,1 \pm 3,9\%$ ;  $pD_2 = 5,6 \pm 0,2$ ;  $n = 6$ ).

Os diferentes tratamentos dos animais diabéticos por quatro semanas, com LEHDg 25 mg/kg ( $E_{m\acute{a}x} = 98,3 \pm 3,0\%$ ;  $pD_2 = 5,7 \pm 0,3$ ;  $n = 5$ ), LEHDg 37,5 mg/kg ( $E_{m\acute{a}x} = 90,7, \pm 5,0$ ;  $pD_2 = 5,5 \pm 0,2$  ;  $n = 5$ ) ou sildenafil 1,5 mg/kg ( $E_{m\acute{a}x} = 101, \pm 5,2\%$ ;  $pD_2 5,7 \pm 0,2$ ;  $n = 5$ ) não promoveram alterações quando comparadas aos grupos diabético ou controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 25).

**Figura 25** – Efeito relaxante de NPS em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento



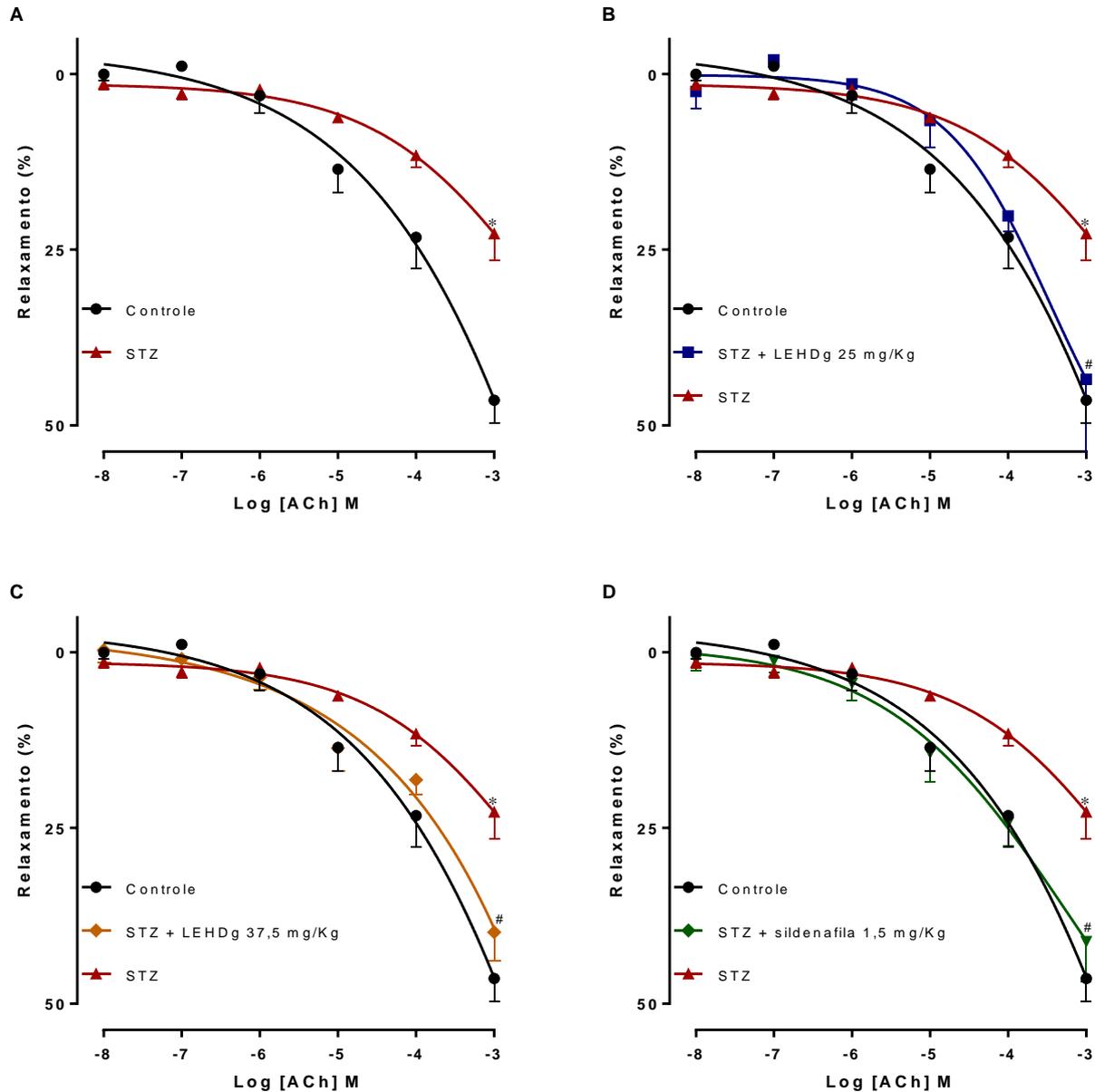
Curvas concentração-resposta para NPS ( $10^{-9}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M) em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas. Grupos: ratos controle (n = 6; ●), diabético (STZ; n = 6; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 5; ■), STZ + LEHDg 37,5 mg/kg, (n = 5; ◆) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 5; ▼). Os dados estão representados como médias  $\pm$  e.p.m.  
Fonte: ASSIS, 2016

#### 4.6.7 Relaxamento induzido pela ACh em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas

A adição crescente e cumulativa de concentrações de ACh ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  M), um agonista dos receptores muscarínicos, promoveu efeito relaxante dependente de concentração em preparações de corpos cavernosos dos ratos de todos os grupos tratados. Em animais diabéticos, foi observada uma diminuição significativa do efeito relaxante induzido pela ACh ( $E_{m\acute{a}x} = 22,7 \pm 3,9\%$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle ( $E_{m\acute{a}x} = 46,4 \pm 3,3\%$ ;  $n = 5$ ).

O tratamento dos animais diabéticos com LEHDg, nas doses de 25 ou 37,5 mg/kg, ou com sildenafil 1,5 mg/kg, promoveu aumento do efeito relaxante da ACh de forma significativa ( $E_{m\acute{a}x} = 43,4 \pm 7,0\%$ ,  $n = 5$ ;  $E_{m\acute{a}x} = 39,8 \pm 4,1\%$ ,  $n = 5$ ;  $E_{m\acute{a}x} = 41,4 \pm 6,7\%$ ,  $n = 6$ ; respectivamente,  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo diabético, de forma semelhante ao controle. Não foram encontradas diferenças nos relaxamentos induzidos pela ACh entre os tratamentos com sildenafil 1,5 mg/kg, LEHDg 25 ou 37,5 mg/kg ( $p > 0,05$ ) ( Figura 26).

**Figura 26 –** Variação do relaxamento induzido pela ACh em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos após tratamento



Curvas concentração-resposta para ACh ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  M) em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais tratados por quatro semanas. Grupos: ratos controle (n = 5; ●), diabético (STZ; n = 5; ▲), STZ + LEHDg 25 mg/kg, (n = 5; ■), STZ + LEHDg 37,5 mg/kg, (n = 6; ◆) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 6; ▼). Os dados estão representados como médias  $\pm$  e.p.m. \*p < 0,05 vs controle; #p < 0,05 vs STZ

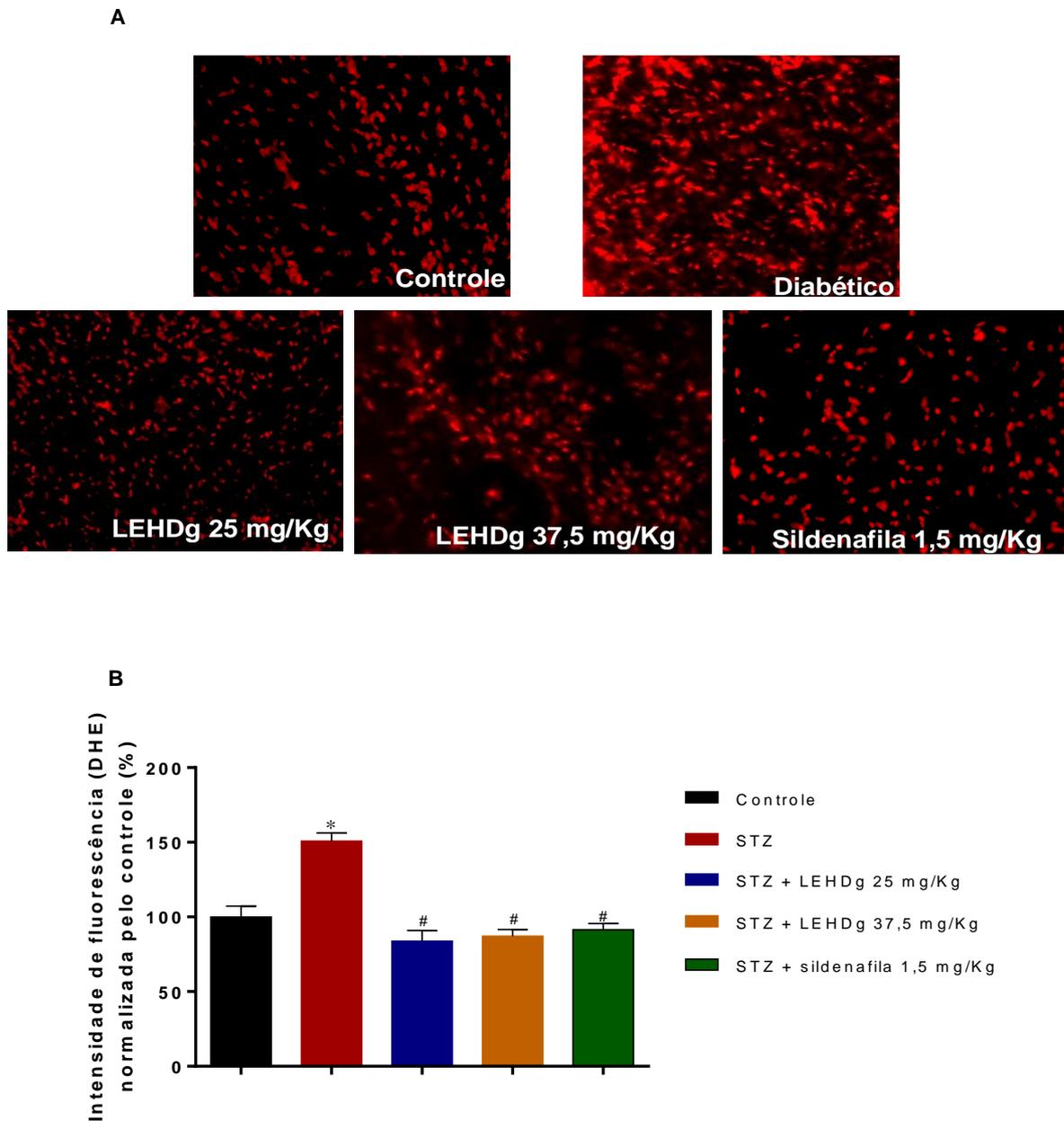
Fonte: ASSIS, 2016

#### **4.6.8 Intensidade de fluorescência da sonda DHE em tiras de corpo cavernoso dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas**

A sonda DHE emite fluorescência basal em cortes de corpos cavernosos de todos os grupos de ratos tratados por quatro semanas. A indução do diabetes com STZ promoveu o aumento significativo do estresse oxidativo no grupo de animais diabéticos ( $150,7 \pm 5,6\%$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle ( $100,0 \pm 8,4\%$ ;  $n = 4$ ).

O tratamento dos animais diabéticos com LEHDg 25 ou 37,5 mg/kg ( $83,8 \pm 7,1\%$ ;  $87,1 \pm 4,5\%$ ; respectivamente;  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) promoveu redução significativa da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE quando comparado ao grupo diabético. De forma semelhante, o tratamento com sildenafil 1,5 mg/kg também reduziu a produção do ânion superóxido ( $91,5 \pm 4,1\%$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ) nos corpos cavernosos quando comparado ao grupo de animais diabéticos. Estes três tratamentos apresentaram intensidade de fluorescência basal semelhante aos animais normoglicêmicos e não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ) (Figura 27).

**Figura 27 – Efeito antioxidante de LEHDg em corpos cavernosos de animais diabéticos**



Medida da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE em cortes transversais de corpo cavernoso de rato dos diferentes grupos de animais após tratamento de quatro semanas. Grupos: controle (n = 7), diabéticos (STZ; n = 4), STZ + LEHDg 25 mg/kg (n = 4); STZ + LEHDg 37,5 mg/kg (n = 4) e STZ + sildenafil 1,5 mg/kg (n = 4) A. Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de corpo cavernoso de animais tratados por quatro semanas (objetiva 10 X). B. Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal (%) de DHE em cortes histológicos de corpo cavernoso dos diferentes grupos tratados por quatro semanas. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle  $\pm$  e.p.m. \*p < 0,05 vs controle, # p < 0,05 STZ

Fonte: ASSIS, 2016

*Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar a ação do LEHDg sobre a função erétil de ratos saudáveis, bem como a ação deste composto sobre a DE induzida pelo diabetes e os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos. O principal achado deste estudo foi que o LEHDg possui ação relaxante em tiras de corpos cavernosos de rato, mediada provavelmente pela via NOS/NO/CGs e pela sua potente atividade antioxidante. Em modelos animais de DE induzido por diabetes, LEHDg melhorou a função erétil de forma semelhante à sildenafil, aumentando o relaxamento dependente de endotélio, diminuindo a hipercontratibilidade e o estresse oxidativo, os quais estão patologicamente alterados em tecidos eréteis neste modelo de disfunção.

O interesse em doenças relacionadas ao sexo, principalmente a DE, continua crescendo ao longo dos anos. Apesar do sucesso da terapia oral com os iPDE5 nas últimas décadas, é importante perceber que eles nem sempre são eficazes e mesmo quando o tratamento é bem sucedido, estes agentes só restauram temporariamente as respostas sexuais (MALAVIGE; LEVY, 2009). Desta forma, são necessárias mais investigações na busca e desenvolvimento de novas opções de tratamento que possam potencialmente curar ou pelo menos atenuar a progressão do problema. O uso de produtos de origem vegetal pode representar pontos de partida importantes e, por isso, estão sendo estudados para demonstrar seu potencial no tratamento da DE.

Entre os vários exemplos relatados na literatura, extratos de plantas que contêm polifenóis parecem ser bastante promissores no tratamento da DE (PAVAN et al., 2015). Os polifenóis são um dos mais numerosos e ubíquos grupos de metabólitos de plantas, cuja ocorrência em vegetais é extremamente variável, estando presentes em ambas as dietas humana e animal. O crescente interesse em compostos fenólicos de origem vegetal vem aumentando devido à sua capacidade antioxidante e suas possíveis implicações benéficas para a saúde humana (BRAVO, 1998). De um modo geral, estes compostos podem proteger os constituintes celulares do dano oxidativo e assim limitar o risco de várias doenças associadas (D ARCHIVIO et al., 2007).

Neste contexto, o extrato da casca da raiz da *D. grandiflora* destaca-se por apresentar inúmeras atividades biológicas, bem como baixa toxicidade aguda e

grande tolerabilidade (RAMALHO et al., 2015). Estes dados, em conjunto, fornecem suporte para a avaliação de suas possíveis ações benéficas em enfermidades, em que os seus efeitos biológicos ainda não foram estudados, como é o caso da DE.

Inicialmente, foi realizada a caracterização fitoquímica do LEHDg. Para isto, foram feitos testes específicos para a detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes em LEHDg. Nestes testes, foi demonstrada a presença de taninos, esteroides, flavonoides e saponinas. Dentre as classes de metabólitos secundários presentes neste liofilizado, os taninos e os flavonoides são bem caracterizados como compostos ricos em polifenóis (ANGELO; JORGE, 2007), sugerindo que este extrato pode apresentar determinado grau de concentração fenólica.

A presença de compostos fenólicos foi investigada pela determinação de fenólicos totais pelo método de FC. Esta análise tem sido considerada como um método padrão para a quantificação do conteúdo de fenólicos totais em diferentes substâncias com ações biológicas. Este teste se baseia na reação dos compostos fenólicos com o reagente FC, uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, que inicialmente apresentam cor amarela. Esta reação ocorre devido à transferência de elétrons dos compostos fenólicos, em meio alcalino, para o fosfomolibdato e fosfotungstato, havendo a mudança de coloração para o azul (MONTREAU, 1972; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1999).

De acordo com este método, o conteúdo de fenólicos totais encontrado em LEHDg é considerado de alto teor, quando comparados a outros extratos do gênero *Dioclea*, como o extrato metanólico da folha de *D. reflexa* ( $41,58 \pm 0,15$  mg EAG/g extrato) que foi cerca de dez vezes menor do que LEHDg (EDEWOR; AKPOR; OWA; 2014). Estudos têm demonstrado que componentes polifenólicos derivados de plantas são antioxidantes mais eficazes *in vitro* do que as vitaminas E ou C, e, portanto, podem contribuir ainda mais para os efeitos protetores *in vivo* (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Para a confirmação do perfil de compostos fenólicos recorre-se habitualmente a metodologias cromatográficas. Dentre estas técnicas, HPLC é uma das mais relevantes, por ser um processo bastante eficiente e rápido, sendo a técnica de separação e quantificação mais utilizada para a determinação de compostos bioativos (SILVEIRA, 2013).

A análise cromatográfica do LEHDg demonstrou a presença de pelo menos dezenove compostos fenólicos. Alguns destes compostos fenólicos encontrados já são reportados na literatura por apresentarem ação benéfica sobre a função erétil, como o ácido elágico (GOSWAMI et al., 2014); a quercetina (ERTUĞ et al., 2010); e a naringenina (ROY et al., 2013). Outros estudos demonstraram a presença destes compostos fenólicos em derivados vegetais que também apresentaram ação benéfica sobre a função erétil, como ácido cafeico, rutina e p-cumárico presentes no suco de romã (*Punica granatum*) (OZTEKIN et al., 2014); o ácido gálico, catequina, quercetina, ácido elágico e rutina presentes no extrato das folhas da *Moringa oleífera* (OBOH et al., 2015); e catequina presente no chá verde (*Camellia sinensis*) (NEVES et al., 2008).

Além dos compostos fenólicos identificados em LEHDg neste estudo, dados da literatura também demonstraram diversos outros componentes no extrato hidroalcoólico da casca da raiz da *D. grandiflora*. Dentre estes, pode-se citar os flavonoides diocleína, dioclenol, dioflorina, agrandol, paraibanol, diosalol e floranol (SÁ; ALMEIDA; BHATTACHARYYA, 2013). Todos estes dados reforçam o grande número de compostos fenólicos presentes em LEHDg, que juntos podem ser responsáveis por apresentar importantes atividades biológicas.

Uma vez demonstrada a presença e a identificação de diferentes compostos fenólicos em LEHDg, passou-se a investigar se este liofilizado possui atividade antioxidante, que é uma característica desta classe de compostos. Para isto, foi realizada uma análise *in vitro* da medida da atividade sequestradora de radicais de DPPH<sup>•</sup>, um método muito utilizado para verificar a capacidade antioxidante de uma amostra (OLIVEIRA et al., 2009).

O teste de DPPH<sup>•</sup>, que determina a atividade sequestradora de radicais livres de extratos de plantas, é baseado na capacidade do composto antioxidante em doar um átomo de hidrogênio e, assim, reduzir o radical livre estável (DPPH<sup>•</sup>), que tem um elétron de valência desemparelhado. Esta redução é evidenciada pela mudança de cor da solução de violeta para amarela (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004). A redução da leitura de absorvância do radical DPPH<sup>•</sup> é inibida na presença de antioxidantes e esta redução na absorvância está relacionada com a eficácia anti-radicalar da amostra (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

Desta forma, LEHDg demonstrou sua atividade anti-radicalar ao reduzir o  $\%[\text{DPPH}]_{\text{rem}}$  em várias concentrações, já atingindo o efeito sequestrador de radical livre máximo na concentração de 8,3  $\mu\text{g/mL}$ , em aproximadamente 16 minutos com a obtenção do estado estacionário. Este liofilizado também apresentou potente  $\text{CE}_{50}$  quando comparado ao ácido ascórbico, um potente agente redutor, amplamente conhecido por sua atividade antioxidante (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os resultados encontrados demonstraram que LEHDg contém compostos fenólicos e apresenta potente atividade antioxidante. Vários estudos têm mostrado que sequestradores convencionais de radicais livres, como a vitamina E, o tempol e o selenato podem restaurar a função erétil por meio da modulação do sequestro de ROS, reduzindo o estresse oxidativo e a degeneração do tecido cavernoso (DECALUWÉ et al., 2014). Além disso, foi descrito que compostos fenólicos como o resveratrol, presente no vinho, e o ácido elágico, apresentaram ação relaxante no músculo liso de corpo cavernoso, o que também pode contribuir para a melhora da função erétil (BOYDENS et al., 2015; OZTEKIN et al., 2015).

Desta forma, foi investigado se LEHDg também possui ação relaxante em preparações de corpos cavernosos isolados de rato. Nestes experimentos, foi observado que este liofilizado promoveu atividade relaxante dependente de concentração nestas preparações pré-contraídas com FEN. O relaxamento de corpo cavernoso foi demonstrado por drogas já utilizadas para o tratamento da DE, como a sildenafil, a tadalafila e a vardenafila (BALLARD et al., 1998; TOQUE et al., 2009), sugerindo assim, que LEHDg pode promover ação benéfica sobre a função erétil. O relaxamento de corpo cavernoso tem como principal mediador fisiológico o NO, um importante neurotransmissor ou mensageiro intercelular (BURNETT et al., 1992; BREDDT, 1999). O NO é formado nas terminações nervosas e em células endoteliais presentes nos corpos cavernosos, a partir da ação enzimática da nNOS e eNOS, respectivamente. Ambas as nNOS e eNOS estão presentes no pênis e são as principais fontes de NO durante a ereção peniana (ANDERSSON, 2011).

Com o intuito de investigar se esta enzima estaria envolvida no efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpos cavernosos, foi utilizado o L-NAME, um inibidor não específico desta enzima. Na presença do L-NAME, o relaxamento induzido por LEHDg apresentou atenuação de sua potência, sem

alteração do efeito máximo, o que sugere a participação da NOS no efeito relaxante induzido por este liofilizado.

Após a sua formação pela NOS, o NO desempenha um papel crucial no início e na manutenção da ereção peniana, promovendo o relaxamento das artérias e do músculo liso cavernoso (MUSICKI; BURNETT, 2007). Diante disto, para investigar o papel deste importante mensageiro celular no efeito relaxante induzido por LEHDg, foi realizado o pré-tratamento das preparações de corpo cavernoso com PTIO, um sequestrador do NO<sup>•</sup>. Nestas preparações, o efeito relaxante induzido por este liofilizado foi significativamente atenuado, sugerindo a participação do NO<sup>•</sup> no efeito relaxante induzido por LEHDg.

Torna-se importante salientar que a ação antioxidante do LEHDg, mostrada em resultados anteriores, também pode promover o aumento da biodisponibilidade do NO via redução de ROS, contribuindo para o relaxamento induzido por este liofilizado. Também tem sido sugerido que outros compostos com ação antioxidante, como a quercetina, promovem aumento da biodisponibilidade do NO em tiras de corpo cavernoso (ERTUĞ et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

A ação do NO no músculo liso cavernoso e nas artérias que irrigam este tecido é mediada pela ativação da CGs, que é a principal molécula efetora ativada pelo NO em corpo cavernoso (NIMMEGEERS et al., 2008). Esta enzima é responsável pela conversão enzimática do GTP em GMPc (NAKANE et al., 2002). A CGs existe como um heterodímero  $\alpha\beta$ , dos quais duas isoformas de cada subunidade têm sido caracterizadas ( $\alpha1/\alpha2$  e  $\beta1/\beta2$ ). Estudos sugeriram que o heterodímero  $\alpha1\beta1$  da CGs é predominantemente expresso em corpo cavernoso e o mais importante, sendo responsável pelo relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso (DECALUWÉ et al., 2010).

Desta forma, o próximo passo da investigação da participação da via NOS/NO/CGs no efeito relaxante induzido por LEHDg foi avaliar se a CGs estaria envolvida em seu efeito relaxante. Com este intuito, as preparações de corpos cavernosos de ratos foram pré-tratadas com ODQ, um inibidor irreversível desta enzima. A presença do ODQ promoveu redução significativa do efeito relaxante induzido por LEHDg, sugerindo a participação deste efetor no mecanismo relaxante induzido por este liofilizado. Outras substâncias como osthola, isolada da *Cnidium monnier* (CHEN et al., 2000), também promove seu efeito relaxante em corpos cavernosos por ativação da via NOS/CGs.

Estes últimos resultados, em conjunto, sugerem que LEHDg produz o seu efeito relaxante em preparações de corpos cavernosos, pelo menos em parte, via ativação da NOS. A ativação desta enzima, por sua vez, estaria produzindo NO que atuaria ativando a CGs. Este efector levaria a ativação de diversos eventos intracelulares no músculo liso das trabéculas e artérias dos corpos cavernosos, promovendo o seu relaxamento (GHALAYINI; 2004).

Após investigar a participação da via NOS/NO/CGs no efeito relaxante induzido por LEHDg em tiras de corpo cavernoso de rato pré-contraídas com FEN, também foi investigado o efeito deste liofilizado frente a outro agente contracturante, a solução despolarizante de 120 mM de KCl. Soluções que apresentam alta concentração de  $K^+$  extracelular impedem o efluxo desse íon, levando a despolarização da membrana plasmática. Por sua vez, a despolarização gerada permite a abertura dos  $Ca_v$ , promovendo a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula e, conseqüente, contração muscular (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003).

Nestas condições, LEHDg promoveu efeito relaxante dependente de concentração em tiras de corpo cavernoso de rato. O efeito relaxante induzido por este liofilizado apresentou redução da potência sem alteração do efeito máximo quando comparado ao seu efeito relaxante em preparações pré-contraídas com FEN, um agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico. Dados da literatura demonstram que substâncias que promovem efeito relaxante envolvendo a via do NO em corpo cavernoso, como a ioimbina e o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) apresentaram efeito atenuado mediante este agente contracturante, visto que esta via envolve a ativação de canais para  $K^+$  (FREITAS, 2007; DI VILLA BIANCA et al., 2009).

Está descrito que a biodisponibilidade do NO é reduzida devido a sua oxidação pelas ROS. Estas espécies reativas levam a redução do relaxamento por diminuição dos níveis de GMPc, produzido a partir da CGs, e aumento das vias contracturantes em corpos cavernosos (BIVALACQUA et al., 2004; TSAI; JIANG, 2010). Desta forma, passou-se a avaliar se a ação relaxante do LEHDg em preparações de corpos cavernosos também estaria relacionada com a redução destas espécies reativas.

Nestes experimentos, o pré-tratamento dos tecidos com LEHDg nas concentrações de 500 ou 1000  $\mu g/mL$  promoveu redução da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE quando comparada ao controle e ao controle positivo (apocinina), o que sugere que os efeitos biológicos do LEHDg podem estar

associados a redução basal de ROS. A concentração de 1000 µg/mL foi escolhida por representar a concentração submáxima do efeito relaxante do LEHDg em preparações de corpo cavernoso e, a concentração de 500 µg/mL por ser a sua metade. Este resultado corrobora os resultados anteriores deste estudo, em que LEHDg demonstrou potente atividade anti-radicalar frente ao radical DPPH<sup>•</sup>.

Estudos com compostos isolados do extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *D. grandiflora* também demonstraram importantes ações antioxidantes. Dentre estes, pode-se citar o floranol, que apresentou atividade antioxidante via quelação de íons metálicos (Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>), prevenindo a oxidação da LDL (BOTELHO et al., 2007); e a diocleína, que reduziu fortemente a concentração de ROS em ensaios de quimiluminescência de lucigenina (GUABIRABA et al., 2010).

Diante dos promissores efeitos antioxidantes do LEHDg e das suas ações sobre as preparações de corpos cavernosos isolados de ratos, foi investigado se este liofilizado promoveria ação benéfica também sobre a DE induzida pelo diabetes, que é caracterizada pelos altos níveis de estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia persistente e crônica (BAYNES; THORPE, 1996). Sabe-se que o DM é altamente associado a um risco aumentado de desenvolvimento de DE em pacientes do sexo masculino, pois esta enfermidade tem o potencial para alterar muitos componentes da resposta erétil (BACON et al., 2002).

O DM pode causar DE por meio de uma série de alterações fisiopatológicas que incluem a disfunção endotelial, mudanças estruturais / funcionais no músculo liso cavernoso, neuropatia e alterações hormonais (HATZIMOURATIDIS; HATZICHRISTOU, 2009). Um dos modelos animais que mimetizam estas alterações é o induzido por STZ. Este modelo tem sido utilizado em vários estudos por apresentar as alterações clínicas do diabetes tipo 1 com mais precisão do que os do tipo 2 (SOUDAMANI et al., 2005; YU et al., 2013).

Para testar a hipótese de que LEHDg pode promover efeito benéfico sobre a DE no diabetes, esta doença foi induzida pela administração de STZ após jejum de 18 horas. Este jejum prolongado foi necessário, pois a STZ compete fracamente com a glicose pelos receptores GLUT2 nas células β-pancreáticas e, desta forma, os níveis glicêmicos tornam-se menores que no jejum habitual de 12 horas (LENZEN, 2008). Após a confirmação da indução do diabetes, estes animais receberam diferentes tratamentos por 28 dias. Para o tratamento com LEHDg, foram utilizadas as doses de 25 ou 37,5 mg/kg, que correspondem a aproximadamente

10% e 15%, respectivamente, da  $DL_{50}$  via intraperitoneal do extrato hidroalcoólico da casca da raiz de *D. grandiflora* (RAMALHO et al., 2015).

Além dos tratamentos com LEHDg, um grupo de animais diabéticos recebeu sildenafil 1,5 mg/kg, como controle positivo por ser uma droga padrão no tratamento da DE. A dose de sildenafil escolhida (1,5 mg/kg) corresponde aproximadamente a dose de 100 mg administrada em um humano adulto com cerca de 70 kg. Esta dose já apresentou efeitos benéficos neste modelo de disfunção em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (ALVES, 2012).

No início dos tratamentos, foram considerados diabéticos apenas os animais que receberam STZ e apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL. Os altos níveis glicêmicos comprovaram a indução do diabetes nestes animais, segundo critério utilizado por Coskun et al. (2005). A glicemia dos animais diabéticos tratados com salina e as respectivas drogas, após o período de quatro semanas, permaneceram altas. Estes dados comprovam que em todo o período de tratamento os animais que receberam STZ mantiveram-se diabéticos e que nenhum dos tratamentos utilizados reduziu esta hiperglicemia.

O peso dos animais foi monitorado ao longo do período de tratamento de quatro semanas. Neste período, foi observado que os animais normoglicêmicos apresentaram ganho de peso corporal contínuo ao longo deste tratamento, enquanto que todos os grupos de animais diabéticos apresentaram redução gradual e significativa do peso quando comparados ao seu peso inicial e ao grupo controle. Os diferentes tratamentos utilizados não alteraram a redução do peso apresentado pelo grupo de animais diabéticos. Resultados semelhantes foram demonstrados em outros estudos com animais diabéticos, em que o tratamento com substâncias fenólicas não promoveram alterações na perda de peso induzido pelo diabetes (ZHANG et al., 2011; YU et al., 2013).

A indução da DE destes animais foi caracterizada por meio da medida de ICP/MAP, que é o método mais comum de avaliação da função erétil em animais (MCMURRAY; CASEY; NAYLOR, 2006). A estimulação elétrica do nervo cavernoso via gânglio pélvico maior promove descarga nitrérgica que induz o relaxamento do corpo cavernoso com consequente elevação da ICP (LI et al., 2011). A DE foi comprovada nos animais diabéticos pela diminuição significativa deste parâmetro quando comparados ao grupo controle. Este resultado é observado em outros estudos, demonstrando que 30 dias após a indução do diabetes pela STZ foram

suficientes para induzir alteração da função erétil nestes animais (OHMASA et al., 2011; WANKEU-NYA et al., 2014).

O tratamento dos animais diabéticos com LEHDg nas doses de 25 ou 37,5 mg/kg restaurou parcialmente a função erétil em algumas frequências de estimulação, quando comparados aos grupo de animais diabéticos. O tratamento com sildenafil também melhorou a função erétil quando comparado com o grupo de animais diabéticos, apresentando efeito semelhante ao grupo controle, o que corrobora os dados relatados na literatura (BAI; AN, 2015). Estes resultados demonstram que os tratamentos com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg) ou com sildenafil produzem efeitos benéficos sobre a DE induzida pelo diabetes em ratos.

Além da medida da função erétil dos grupos estudados, este trabalho avaliou a reatividade das tiras de corpos cavernosos dos diferentes grupos de animais tratados frente a agentes contracturantes e relaxantes. Estes resultados são importantes, visto que a função erétil é um processo hemodinâmico, que depende do relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. O controle do tônus deste músculo é regulado principalmente por processos eletrofisiológicos mediados pela neurotransmissão simpática, parassimpática e NANC, cujo desequilíbrio está intimamente relacionado com a DE (DÍAZ-DÍAZ et al., 2012).

A reatividade dos corpos cavernosos à FEN foi significativamente superior no grupo de animais diabéticos quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma hipersensibilidade destes tecidos a este agente contracturante, o que corrobora os estudos apresentados por Ohmasa e cols. (2011). Esta hipercontratibilidade encontrada em tecidos cavernosos de ratos diabéticos pode ser explicada devido a super-regulação de vias de sinalização contracturantes, como aumento nos níveis de receptores de mediadores vasoconstritores e da via RhoA/ROCK (CHIOU; LIU; JUAN, 2010; TOQUE et al., 2013). Estas alterações podem estar relacionadas com diversos processos fisiopatológicos, como o aumento do estresse oxidativo e da disfunção endotelial (CHEITLIN, 2004; THORVE et al., 2011).

O tratamento por 28 dias dos animais diabéticos com LEHDg nas doses de 25 ou 37,5 mg/kg, ou com sildenafil, promoveu redução da potência contrátil induzida pela FEN, quando comparada ao grupo de animais diabéticos. Estes dados sugerem que os tratamentos supracitados podem estar reduzindo a hipercontratibilidade característica do corpo cavernoso de animais diabéticos e, conseqüentemente, melhorando a função erétil destes animais. Resultados

semelhantes foram demonstrados por outros extratos com propriedades antioxidantes, como o edaravona, cujo tratamento por 28 dias induziu redução da hipercontratibilidade adrenérgica em ratos diabéticos (OHMASA et al., 2011).

Em preparações de corpo cavernoso, o estímulo por campo elétrico induz descarga das terminações colinérgicas, NANC e noradrenérgicas, entretanto, na ausência de bloqueadores, a descarga noradrenérgica se sobressai promovendo a contração do tecido cavernoso (ALVES, 2012). A avaliação deste parâmetro é importante porque a noradrenalina liberada por estes nervos é o principal neurotransmissor responsável pela manutenção do estado flácido do pênis (ITALIANO; CALABRO; PAGANO, 1994; DEAN; LUE, 2005).

A noradrenalina, lançada a partir de nervos noradrenérgicos, estimula receptores noradrenérgicos presentes no músculo liso dos vasos penianos e dos corpos cavernosos. A contração produzida por este neurotransmissor envolve entrada de  $Ca^{2+}$  na célula muscular através dos canais do tipo L, bem como pelos mecanismos de sensibilização ao  $Ca^{2+}$  mediadas pela PKC, tirosina-cinases e ROCK (ANDERSSON, 2011).

De forma semelhante à FEN, o grupo de animais diabéticos apresentou aumento da hipercontratibilidade frente à ECE em diferentes frequências, quando comparados ao grupo controle. Este efeito pode estar relacionado à super-regulação das vias contráteis; à neuropatia autonômica, normalmente manifestada pela exacerbação da atividade simpática; e à maior sensibilidade dos receptores noradrenérgicos presentes nos corpos cavernosos de indivíduos diabéticos (PERIN, MAULE, QUADRI; 2001; ANDERSSON, 2011).

O tratamento dos animais diabéticos com LEHDg 25 mg/kg ou sildenafil não induziu melhora significativa desta hipercontratibilidade quando comparados aos grupos de animais diabéticos. Apenas o tratamento com LEHDg 37,5 mg/kg promoveu redução significativa deste efeito contrátil induzida pela descarga noradrenérgica. A redução desta hipercontratibilidade pode melhorar o fluxo sanguíneo reduzido característico no pênis de animais diabéticos, promovendo assim, a melhora da função erétil nestes animais (CARNEIRO et al., 2010).

O relaxamento produzido pelo NPS em tiras de corpo cavernoso de rato não foi alterado pela DE induzida pelo diabetes e não apresentou diferença estatística em nenhum dos tratamentos utilizados quando comparados ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a maquinaria relaxante do músculo liso das trabéculas dos

corpos cavernosos permaneceu funcionalmente inalterada em todos os grupos estudados. Outros estudos com modelos de animais diabéticos também demonstraram que o relaxamento mediado pelo NPS não apresentou alterações entre os diferentes grupos tratados (GHASEMI; SADEGHIPOUR; DEHPOUR, 2007; CARNEIRO et al., 2008; YILMAZ et al., 2014).

Por outro lado, em preparações de corpo cavernoso de animais diabéticos pré-contraídas com FEN, o relaxamento induzido pela ACh foi significativamente reduzido quando comparado ao grupo controle. Achados semelhantes foram encontrados por Ohmasa et al. (2011), que também observaram redução do relaxamento mediado pela ACh em corpos cavernosos de ratos diabéticos. O efeito inibitório sobre a ação relaxante deste mediador sugere o desenvolvimento da disfunção endotelial nos tecidos eréteis dos animais.

Os tratamentos com LEHDg (25 ou 37,5 mg/kg) promoveram restauração desta resposta endotelial quando comparado ao grupo diabético, de forma semelhante ao grupo controle, sem apresentar diferenças entre si. Estes resultados sugerem que estes dois tratamentos induziram recuperação funcional do endotélio presente nos corpos cavernosos de ratos diabéticos, o que pode contribuir para a melhora da função erétil destes animais. Diferentes substâncias antioxidantes também demonstraram melhora da função endotelial dos corpos cavernosos e na função erétil de animais diabéticos, como a vitamina E, o selenato de sódio e o extrato rico em compostos fenólicos das folhas da *Psidium guajava* (GÖÇMEN et al., 2000; CHEN; PENG, 2010).

Resultados semelhantes foram observados nos animais diabéticos tratados com sildenafil, que também restaurou a função endotelial quando comparados aos animais diabéticos. Os resultados induzidos pela sildenafil estão de acordo com dados da literatura, que demonstram que a sua administração crônica pode melhorar o relaxamento do corpo cavernoso por ação dependente de endotélio, como também as funções eréteis alteradas por mecanismos fisiopatológicos, dentre estes, o diabetes (OUDOT et al., 2010; OHMASA et al., 2011).

Já se sabe que o DM pode danificar as células endoteliais presentes nos corpos cavernosos e assim prejudicar a resposta vascular do pênis. No diabetes, as mudanças estruturais nas células endoteliais são acompanhadas por alterações funcionais que resultam na redução do relaxamento dependente de endotélio do músculo liso dos corpos cavernosos (DÍAZ-DÍAZ et al., 2012). Fatores associados à

disfunção endotelial no diabetes incluem defeitos na expressão e atividade da eNOS; desacoplamento da eNOS; alteração da produção e/ou ação de hormônios, fatores de crescimento e citocinas; aumento da geração e da atividade de agentes contracturantes como a RhoA/ROCK e aumento do estresse oxidativo (MUSICKI; BURNETT, 2007).

O aumento do estresse oxidativo, por sua vez, está caracterizado pela presença em grande quantidade dos radicais superóxidos nos tecidos eréteis de indivíduos diabéticos. O ânion superóxido reage com o NO para formar peroxinitrito, resultando numa diminuição da biodisponibilidade deste mediador. Além disso, o peroxinitrito é um composto altamente tóxico para as células vasculares e neurônios, levando a disfunção mitocondrial, dano oxidativo ao DNA e apoptose (PAPAHARALAMBUS; GRIENDLING, 2007; DÍAZ-DÍAZ et al., 2012).

Diante do exposto e dos nossos resultados iniciais, que demonstraram potente atividade antioxidante do LEHDg, foi investigado se este liofilizado estaria promovendo seus efeitos benéficos sobre a DE por reduzir o estresse oxidativo em cortes histológicos de corpos cavernosos de ratos diabéticos.

Nestes experimentos, o grupo de animais diabéticos apresentou significativo aumento da intensidade de fluorescência pela sonda DHE quando comparado ao controle, sugerindo que a indução do diabetes por quatro semanas aumentou os níveis basais do ânion superóxido nos tecidos eréteis destes animais. O aumento da intensidade de fluorescência da sonda DHE em corpos cavernosos de animais diabéticos também foi observado no estudo realizado por Yang e cols. (2013). O tratamento com as duas doses estudadas do LEHDg, assim como a sildenafil, reduziu de forma significativa os níveis de fluorescência basal da sonda DHE quando comparados aos animais diabéticos, apresentando níveis de ânion superóxido semelhantes ao controle.

Esta diminuição do estresse oxidativo do LEHDg em tecidos eréteis de animais diabéticos ocorreu provavelmente devido ao seu teor de compostos fenólicos e por sua capacidade antioxidante. É importante salientar que esta redução do estresse oxidativo induzida por LEHDg pode estar relacionada com a melhora da função endotelial e muscular de ratos com DE induzida pelo diabetes, observada em resultados anteriores. Entretanto, mais estudos serão necessários para elucidar a participação de outras vias de sinalização no mecanismo de ação induzido por este liofilizado.

Estes resultados, em conjunto, demonstram que LEHDg é um extrato que contém compostos fenólicos e potente atividade antioxidante, capaz de promover relaxamento em preparações de corpos cavernosos provavelmente pela ativação da via NOS/NO/CGs. Além disto, o tratamento de animais com DE induzido pelo diabetes, nas duas doses estudadas do LEHDg, promoveu melhora da função erétil, como também, induziu aumento do relaxamento dependente de endotélio, diminuição da hipercontratilidade e redução do estresse oxidativo em preparações de corpos cavernosos destes animais.

Desta forma, pode-se afirmar que o LEHDg demonstrou importantes ações sobre a função erétil de ratos e que o mesmo apresenta grande potencial como uma nova alternativa terapêutica no tratamento da DE. Entretanto, mais estudos serão necessários para elucidar a participação de outras vias de sinalização no mecanismo de ação induzido por este liofilizado. Também é imprescindível a realização de estudos clínicos que, aliados aos demais resultados obtidos, podem contribuir para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico.

*Conclusão*

---

## 6 CONCLUSÃO

- LEHDg é um extrato rico em compostos fenólicos, com potente atividade antioxidante em corpo cavernoso;
- LEHDg promove relaxamento de tiras de corpos cavernosos de ratos de maneira dependente de concentração;
- A ativação da via NOS/NO/CGs está envolvida no efeito relaxante em preparações de corpos cavernosos de ratos;
- Este extrato promove melhora da função erétil em ratos com DE induzida pelo diabetes;
- LEHDg induz diminuição da hipercontratilidade a FEN e a ECE, como também a restauração da resposta relaxante dependente de endotélio em corpos cavernosos de animais diabéticos;
- LEHDg reduz o estresse oxidativo presente nos tecidos cavernosos com DE induzida pelo diabetes.

*Perspectivas*

---

## **7 PERSPECTIVAS**

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o potencial terapêutico do LEHDg no tratamento da DE. O próximo passo será a investigação dos mecanismos moleculares relacionados à melhora da função erétil observada no tratamento com LHEDg, visando, posteriormente, iniciar testes clínicos para o desenvolvimento de um fitoterápico para o tratamento deste distúrbio.

# *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

ABDO, C. H. N.; OLIVEIRA JR, W.; SCANAVINO, M. D. T.; MARTINS, F. G. Disfunção erétil: resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 424-9, 2006.

AGARWAL, A.; NANDIPATI, K. C.; SHARMA, R. K.; ZIPPE, C. D.; RAINA, R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 335-347, 2006.

AINOUZ, I. L.; MOREIRA, R. A.; CAMPOS, F. D.; RICHARDSON, M.; BEGBIE, R.; STEWART, J. C.; WATT, W. B.; PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1435-1440, 1987.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.

AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; MEHRABI, M.; JAMSHIDI, S.; FARHANGI, A.; VERDI, A. A.; MOFIDIAN, S.; RAD, B. L. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007.

ALDERTON, W.; COOPER, C.; KNOWLES, R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALMEIDA, A. P.; CÔRTEZ, S. F.; FERREIRA, A. J.; LEMOS, V. N. S. Increase on the coronary flow induced by dioclein in isolated rat heart. **Life Sciences**, v. 70, n. 10, p. 1121-1128, 2002.

ALMEIDA, E.; ALMEIDA, R.; NAVARRO, D.; BHATTACHARYYA, J.; SILVA, B.; BIRNBAUM, J. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 1-4, 2003.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; DE F. AGRA, M.; ALMEIDA, E. R.; MAJETICH, G.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of dioclenol and dioflorin isolated from *Dioclea grandiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 5, p. 394-395, 2000.

ALVES, M.A.S.G. Efeito da fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. e milonina sobre a função erétil de ratos. 2012

ANDERSSON, K.-E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 811-859, 2011.

ANDERSSON, K.-E.; STIEF, C. G. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. **World Journal of Urology**, v. 15, n. 1, p. 14-20, 1997.

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

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, May 25 1999.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ASSREUY, A. M.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201-10, 1997.

AYAJIKI, K.; FUJIOKA, H.; OKAMURA, T. Mechanisms underlying endothelium-dependent, nitric oxide/prostacyclin-independent, acetylcholine-induced relaxation in canine corpus cavernosum. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4-5, p. 448-451, 2000.

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

BACON, C. G.; HU, F. B.; GIOVANNUCCI, E.; GLASSER, D. B.; MITTLEMAN, M. A.; RIMM, E. B. Association of type and duration of diabetes with erectile dysfunction in a large cohort of men. **Diabetes Care**, v. 25, n. 8, p. 1458-1463, 2002.

BAI, Y.; AN, R. Resveratrol and sildenafil synergistically improves diabetes-associated erectile dysfunction in streptozotocin-induced rats. **Life Sciences**, 2015.

BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **The Journal of Urology**, v. 159, n. 6, p. 2164-2171, 1998.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; DE FREITAS, L. A.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-8, Jul 2001.

BASKERVILLE, T. A.; DOUGLAS, A. J. Interactions between dopamine and oxytocin in the control of sexual behaviour. **Progress in Brain Research**, v. 170, p. 277-290, 2008.

BATISTA, J.; ALMEIDA, R.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 3, p. 207-210, 1995.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. The role of oxidative stress in diabetic complications. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 3, n. 4, p. 277-284, 1996.

BELLAMY, T. C.; WOOD, J.; GARTHWAITE, J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 507-510, 2002.

BENNETT, R. A.; PEGG, A. E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Research**, v. 41, n. 7, p. 2786-2790, 1981.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 517-529, 2003.

BEZERRA CAVALCANTI, J.; BOSCO LINDOSO COUTO, G. O. Ação analgésica central da *Dioclea grandiflora* em camundongos. 2008.

BHATTACHARYYA, J.; BATISTA, J. S.; ALMEIDA, R. N. Dioclein, a flavanone from the roots of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 277-278, 1995.

BHATTACHARYYA, J.; MAJETICH, G.; SPEARING, P.; ALMEIDA, R. N. Dioclenol, a minor flavanonol from the root-bark of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 385-387, 1997.

BIVALACQUA, T. J.; CHAMPION, H. C.; USTA, M. F.; CELLEK, S.; CHITALEY, K.; WEBB, R. C.; LEWIS, R. L.; MILLS, T. M.; HELLSTROM, W. J.; KADOWITZ, P. J. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 24, p. 9121-9126, 2004.

BIVALACQUA, T. J.; USTA, M. F.; CHAMPION, H. C.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. **Journal of Andrology**, v. 24, n. S6, p. S17-S37, 2003.

BORTOLOTTI, A.; FEDELE, D.; CHATENOU, L.; COLLI, E.; COSCELLI, C.; LANDONI, M.; LAVEZZARI, M.; SANTEUSANIO, F.; PARAZZINI, F. Cigarette smoking: a risk factor for erectile dysfunction in diabetics. **European Urology**, v. 40, n. 4, p. 392-6; discussion 397, 2001.

BOTELHO, F. V.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; LEMOS, V. S.; PIMENTA, A. M.; CALADO, H. D.; MATENCIO, T.; MIRANDA, C. T.; PEREIRA-MAIA, E. C. Physicochemical study of floranol, its copper (II) and iron (III) complexes, and their inhibitory effect on LDL oxidation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 6, p. 935-943, 2007.

BOYDENS, C.; PAUWELS, B.; DECALUWÉ, K.; BROUCKAERT, P.; VAN DE VOORDE, J. Relaxant and Antioxidant Capacity of the Red Wine Polyphenols, Resveratrol and Quercetin, on Isolated Mice Corpora Cavernosa. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 12, n. 2, p. 303-312, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRANT, W. O.; BELLA, A. J.; LUE, T. F. Treatment options for erectile dysfunction. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 465-479, 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRETT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 577-596, 1999.

BROCK, G. Oral agents: first-line therapy for erectile dysfunction. **European Urology Supplements**, v. 1, n. 8, p. 12-18, 2002.

BROCK, G.; HSU, G.-L.; NUNES, L.; VON HEYDEN, B.; LUE, T. F. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. **The Journal of Urology**, v. 157, n. 1, p. 276-281, 1997.

BURNETT, A. L.; LOWENSTEIN, C. J.; BREDT, D. S.; CHANG, T.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401-403, 1992.

CARNEIRO, F.S.; GIACHINI, F.R.C.; LIMA, V.V.; CARNEIRO, Z.N.; LEITE, R.; INSCHO, E.W.; TOSTES, R.C.; 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, n. 5, p. 1156-1166, 2008.

CARNEIRO, F.S.; GIACHINI, F.R.C.; CARNEIRO, Z.N.; LIMA, V.V.; ERGUL, A.; WEBB, R.C.; TOSTES, R.C. Erectile dysfunction in young non-obese type II diabetic Goto-Kakizaki rats is associated with decreased eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 11, p. 3620-3634, 2010.

CARTLEDGE, J.; EARDLEY, I.; MORRISON, J. Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. **Journal of the British Association of Urological Surgeons**, v. 87, n. 4, p. 394-401, 2001.

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. Flores da caatinga. **Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido (INSA)**, 2010.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CHAIYASUT, C.; KUSIRISIN, W.; LAILERD, N.; LERTTRAKARNNON, P.; SUTTAJIT, M.; SRICHAIRATANAKOOL, S. Effects of phenolic compounds of fermented Thai indigenous plants on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

CHANG, S.; HYPOLITE, J. A.; VELEZ, M.; CHANGOLKAR, A.; WEIN, A. J.; CHACKO, S.; DISANTO, M. E. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase-1 activity in the corpus cavernosum smooth muscle of diabetic rabbits. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4, p. R950-R960, 2004.

CHEITLIN, M. D. Erectile dysfunction: the earliest sign of generalized vascular disease?. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 2, p. 185-186, 2004.

CHEN, J.; CHIOU, W.-F.; CHEN, C.-C.; CHEN, C.-F. Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue *in vitro*. **The Journal of Urology**, v. 163, n. 6, p. 1975-1980, 2000.

CHEN, K.-C.; PENG, R. Y. Polyphenolics-Rich *Psidium guajava* Budding Leaf Extract Can Reverse Diabetes-Induced Functional Impairment of Cavernosal Smooth Muscle Relaxation in Rats. **Research Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 2010.

CHIOU, W. F.; LIU, H. K.; JUAN, C. W. Abnormal protein expression in the corpus cavernosum impairs erectile function in type 2 diabetes. **Journal of the British Association of Urological Surgeons**, v. 105, n. 5, p. 674-680, 2010.

CHITALEY, K.; WINGARD, C. J.; WEBB, R. C.; BRANAM, H.; STOPPER, V. S.; LEWIS, R. W.; MILLS, T. M. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 119-122, 2001.

CHRIST, G. J.; SCHWARTZ, C. B.; STONE, B. A.; PARKER, M.; JANIS, M.; GONDRE, M.; VALCIC, M.; MELMAN, A. Kinetic characteristics of alpha 1-adrenergic contractions in human corpus cavernosum smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 263, n. 1, p. H15-H19, 1992.

CHUNG, E.; DE YOUNG, L.; BROCK, G. B. Investigative Models in Erectile Dysfunction: A State-of-the-Art Review of Current Animal Models. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 8, n. 12, p. 3291-3305, 2011.

CONDORELLI, R. A.; CALOGERO, A. E.; FAVILLA, V.; MORGIA, G.; JOHNSON, E. O.; CASTIGLIONE, R.; SALEMI, M.; NICOLETTI, C.; DUCA, Y.; DI MAURO, M. Arterial erectile dysfunction: different severities of endothelial apoptosis between diabetic patients "responders" and "non responders" to sildenafil. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 234-240, 2013.

CORDEIRO, V. S. C.; DE CARVALHO, L. C. R. M.; DE BEM, G. F.; DA COSTA, C. A.; DE SOUZA, M. A. V.; SOUSA, P. J. C.; ROCHA, V. N.; CARVALHO, J. J.; DE MOURA, R. S.; RESENDE, A. C. *Euterpe oleracea* Mart. extract prevents vascular remodeling and endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 8, n. 3, p. 6-16, 2015.

CORONA, G.; MANNUCCI, E.; PETRONE, L.; RICCA, V.; BALERCIA, G.; MANSANI, R.; CHIARINI, V.; GIOMMI, R.; FORTI, G.; MAGGI, M. Association of hypogonadism and type II diabetes in men attending an outpatient erectile

dysfunction clinic. **International Journal of Impotence Research**, v. 18, n. 2, p. 190-197, 2006.

CÔRTEZ, S. F.; REZENDE, B. A.; CORRIU, C.; MEDEIROS, I. A.; TEIXEIRA, M. M.; LOPES, M. J.; LEMOS, V. S. Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 6, p. 849-858, 2001.

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 117-123, 2005.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DA SILVA, L. L. S.; DE OLIVEIRA LIMA, E.; DO NASCIMENTO, S. C.; DA MOTA, D. L.; DA SILVA, N. H.; DE ALMEIDA, E. R.; DA SILVA, M. G. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth., Fabaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

DAM, T. K.; ROY, R.; DAS, S. K.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin. Thermodynamic analysis of the "multivalency effect". **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14223-30, May 12 2000.

DAUGAN, A.; GRONDIN, P.; RUAULT, C.; LE MONNIER DE GOUVILLE, A.-C.; COSTE, H.; LINGET, J. M.; KIRILOVSKY, J.; HYAFIL, F.; LABAUDINIÈRE, R. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2, 3, 6, 7, 12, 12a-hexahydropyrazino [1', 2': 1, 6] pyrido [3, 4-b] indole-1, 4-dione analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 21, p. 4533-4542, 2003.

DE ALMEIDA, E.; XAVIER, H.; CHAVES, T.; COUTO, G. L.; ARAGÃO-NETO, A.; SILVA, A.; DA SILVA, L. S. Anxiolytic and anticonvulsant effects of dioclenol flavonoid isolated from stem bark of *Dioclea grandiflora* on mice. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 2, n. 4, p. 44-52, 2009.

DE ALMEIDA, L. L.; DA MOTA, D. L.; DA SILVA, L. L. S.; DE ALMEIDA, V. D. C. F. Efeito do extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. nos rins de

camundongos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013.

DE TEJADA, I. S.; ANGULO, J.; CELLEK, S.; GONZÁLEZ-CADAVID, N.; HEATON, J.; PICKARD, R.; SIMONSEN, U. Pathophysiology of erectile dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 2, n. 1, p. 26-39, 2005.

DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 379-395, 2005.

DECALUWÉ, K.; NIMMEGEERS, S.; THOONEN, R.; BUYS, E.; BROUCKAERT, P.; VAN DE VOORDE, J. *In vitro* and *in vivo* studies on the importance of the soluble guanylyl cyclase  $\alpha 1$  subunit in penile erection. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 5, p. 643-650, 2010.

DECALUWÉ, K.; PAUWELS, B.; BOYDENS, C.; VAN DE VOORDE, J. Treatment of erectile dysfunction: new targets and strategies from recent research. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 146-157, 2014.

DELL'AGLI, M.; GALLI, G. V.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; BOSISIO, E. *In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1960-1965, 2005.

DEROGATIS, L. R.; BURNETT, A. L. The epidemiology of sexual dysfunctions. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 5, n. 2, p. 289-300, 2008.

DI VILLA BIANCA, R. D. E.; SORRENTINO, R.; MAFFIA, P.; MIRONE, V.; IMBIMBO, C.; FUSCO, F.; DE PALMA, R.; IGNARRO, L. J.; CIRINO, G. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 11, p. 4513-4518, 2009.

DÍAZ-DÍAZ, E.; SALINAS, C. A.; TIMOSSO, C. M.; LARREA, F.; LEÓN, M. C.; ARZUAGA, N. O.; DÍAZ, R. A. G. **Erectile Dysfunction: a Chronic Complication of the Diabetes Mellitus**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535101994.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

DONG, J.-Y.; ZHANG, Y.-H.; QIN, L.-Q. Erectile dysfunction and risk of cardiovascular disease: meta-analysis of prospective cohort studies. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 13, p. 1378-1385, 2011.

EARDLEY, I.; CARTLEDGE, J. Tadalafil (Cialis) for men with erectile dysfunction. **International Journal of Clinical Practice**, v. 56, n. 4, p. 300-304, 2002.

EDEWOR, T.; AKPOR, O.; OWA, S. Quantification of the Total Phenolic and Flavonoid Contents, and Antibacterial Activity of *Dioclea Reflexa*. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, n. 6, p. 1875-1880, 2014.

ERTUĞ, P. U.; OLGUNER, A. A.; ÖĞÜLENER, N.; ŞINGIRIK, E. Protective effect of quercetin, a polyphenolic compound, on mouse corpus cavernosum. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 223-232, 2010.

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**, v. 28, n. 5, p. 1201-1203, 2005.

EVANS, W. Trease and Evan's textbook of pharmacognosy. **Cambridge**, p. 546, 1989.

EVGENOV, O. V.; LIAUDET, L. Role of nitrosative stress and activation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular failure associated with septic and hemorrhagic shock. **Current Vascular Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 293-299, 2005.

FEDELE, D.; COSCELLI, C.; SANTEUSANIO, F.; BORTOLOTTI, A.; CHATENOU, L.; COLLI, E.; LANDONI, M.; PARAZZINI, F. Erectile dysfunction in diabetic subjects in Italy. Gruppo Italiano Studio Deficit Erettile nei Diabetici. **Diabetes Care**, v. 21, n. 11, p. 1973-1977, 1998.

FELDMAN, H. A.; GOLDSTEIN, I.; HATZICHRISTOU, D. G.; KRANE, R. J.; MCKINLAY, J. B. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of Massachusetts Male Aging Study. **Journal of Urology**, v. 151, n. 1, p. 54-61, 1994.

FENG, J.; ITO, M.; ICHIKAWA, K.; ISAKA, N.; NISHIKAWA, M.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 37385-37390, 1999.

FOLDVARI, M.; OGUEJIOFOR, C.; AFRIDI, S.; KUDEL, T.; WILSON, T. Liposome encapsulated prostaglandin E 1 in erectile dysfunction: Correlation between *in vitro* delivery through foreskin and efficacy in patients. **Urology**, v. 52, n. 5, p. 838-843, 1998.

FRANCIS, S.; MORRIS, G.; CORBIN, J. Molecular mechanisms that could contribute to prolonged effectiveness of PDE5 inhibitors to improve erectile function. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, n. 4, p. 333-342, 2008.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525-563, 2010.

FREITAS, F. C. M. Ação sobre a via nitrérgica, e sobre os canais de cloreto e de potássio ATP dependentes, como mecanismo adicional de ação da ioimbina no relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso de humanos: estudo *in vitro*. 2007.

GAJBHIYE, S. V.; JADHAV, K. S.; MARATHE, P. A.; PAWAR, D. B. Animal models of erectile dysfunction. **Indian Journal of Urology: Journal of the Urological Society of India**, v. 31, n. 1, p. 15, 2015.

GHASEMI, M.; SADEGHIPOUR, H.; DEHPOUR, A.R. Anandamide improves the impaired nitric oxide-mediated neurogenic relaxation of the corpus cavernosum in diabetic rats: involvement of cannabinoid CB1 and vanilloid VR1 receptors. **Journal of the British Association of Urological Surgeons**, v. 100, n. 6, p. 1385-1390, 2007.

GAO, J.-X.; LI, Y.; ZHANG, H.-Y.; HE, X.-L.; BAI, A.-S. Lycopene ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 3, p. 256-259, 2012.

GHALAYINI, I. F. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, n. 6, p. 459-69, Dec 2004.

GIUGLIANO, F.; MAIORINO, M.; BELLASTELLA, G.; GICCHINO, M.; GIUGLIANO, D.; ESPOSITO, K. Determinants of erectile dysfunction in type 2 diabetes. **International Journal of Impotence Research**, v. 22, n. 3, p. 204-209, 2010.

GIULIANO, F. A.; LERICHE, A.; JAUDINOT, E. O.; DE GENDRE, A. S. Prevalence of erectile dysfunction among 7689 patients with diabetes or hypertension, or both. **Urology**, v. 64, n. 6, p. 1196-1201, 2004.

GÖÇMEN, C.; SEÇILMIŞ, A.; KUMCU, E. K.; ERTUĞ, P. U.; ÖNDER, S.; DIKMEN, A.; BAYSAL, F. Effects of vitamin E and sodium selenate on neurogenic and endothelial relaxation of corpus cavernosum in the diabetic mouse. **European Journal of Pharmacology**, v. 398, n. 1, p. 93-98, 2000.

GONÇALVES, R. L.; LUGNIER, C.; KERAVIDIS, T.; LOPES, M. J.; FANTINI, F. A.; SCHMITT, M.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. The flavonoid dioclein is a selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 1 (PDE1) and a cGMP-dependent protein kinase (PKG) vasorelaxant in human vascular tissue. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, n. 1, p. 78-83, 2009.

GOSWAMI, S. K.; VISHWANATH, M.; GANGADARAPPA, S. K.; RAZDAN, R.; INAMDAR, M. N. Efficacy of ellagic acid and sildenafil in diabetes-induced sexual dysfunction. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. Suppl 3, p. S581, 2014.

GROBE, A. C.; WELLS, S. M.; BENAVIDEZ, E.; OISHI, P.; AZAKIE, A.; FINEMAN, J. R.; BLACK, S. M. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 6, p. L1069-L1077, 2006.

GUABIRABA, R.; CAMPANHA-RODRIGUES, A. L.; SOUZA, A. L.; SANTIAGO, H. C.; LUGNIER, C.; ALVAREZ-LEITE, J.; LEMOS, V. S.; TEIXEIRA, M. M. The flavonoid dioclein reduces the production of pro-inflammatory mediators *in vitro* by inhibiting PDE4 activity and scavenging reactive oxygen species. **European Journal of Pharmacology**, v. 633, n. 1, p. 85-92, 2010.

GUAY, A. T. ED 2: erectile dysfunction= endothelial dysfunction. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 453-463, 2007.

GUERIT, J.; OPSOMER, R.-J. Bit-mapped imaging of somatosensory evoked potentials after stimulation of the posterior tibial nerves and dorsal nerve of the penis/clitoris. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section**, v. 80, n. 3, p. 228-237, 1991.

GÜMÜŞ, B.; VATANSEVER, H. S.; MÜEZZINOĞLU, T.; MÜFTÜOĞLU, S.; KAYMAZ, F.; BÜYÜKSU, C. Histopathological effects of sildenafil citrate on rat corpus cavernosum. **Acta Histochemica**, v. 106, n. 1, p. 37-45, 2004.

GUPTA, D.; OSCARSON, S.; RAJU, T. S.; STANLEY, P.; TOONE, E. J.; BREWER, C. F. A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, n. 2, p. 320-326, 1996.

GÜR, S.; KARAHAN, S. T.; ÖZTÜRK, B.; BADILLI, M. Effect of ascorbic acid treatment on endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from middle-aged non-insulin dependent diabetic rats. **International Journal of Urology**, v. 12, n. 9, p. 821-828, 2005.

GUZIK, T. J.; MUSSA, S.; GASTALDI, D.; SADOWSKI, J.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K. M. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes *mellitus*. Role of NAD (P) H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 105, n. 14, p. 1656-1662, 2002.

HAKIM, L. S.; GOLDSTEIN, I. Diabetic sexual dysfunction. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 379-400, 1996.

HANNAN, J. L.; BLASER, M. C.; OLDFIELD, L.; PANG, J. J.; ADAMS, S. M.; PANG, S. C.; ADAMS, M. A. Morphological and Functional Evidence for the Contribution of the Pudendal Artery in Aging-Induced Erectile Dysfunction. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 10, p. 3373-3384, 2010.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. Springer Science & Business Media, 1998. ISBN 0412572702.

HATZIMOURATIDIS, K.; HATZICHRISTOU, D. Erectile dysfunction and diabetes *mellitus*. **Insulin**, v. 4, n. 2, p. 114-122, 2009.

HELLSTROM, W. Clinical applications of centrally acting agents in male sexual dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p. S17-S23, 2008.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; SCHMIDT, H. H.; BUSSE, R.; SCHRÖDER, K.; BRANDES, R. P. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-217, 2008.

HOLMES, G. M.; CHAPPLE, W. D.; LEIPHEIMER, R. E.; SACHS, B. D. Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 6, p. 1235-1246, 1991.

HSIEH, C.-H.; LIU, S.-P.; HSU, G.-L.; CHEN, H.-S.; MOLODYSKY, E.; CHEN, Y.-H.; YU, H.-J. Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: Clinical implications for physicians and surgeons. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 18, n. 7, p. RA118, 2012.

HSU, G. L. Hypothesis of human penile anatomy, erection hemodynamics and their clinical applications. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 2, p. 225-234, 2006.

HSU, G. L.; HSIEH, C. H.; WEN, H. S.; CHEN, Y. C.; CHEN, S. C.; MOK, M. S. Penile venous anatomy: an additional description and its clinical implication. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 6, p. 921-927, 2003.

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

IKEBUKURO, K.; ADACHI, Y.; YAMADA, Y.; FUJIMOTO, S.; SEINO, Y.; OYAIZU, H.; HIOKI, K.; IKEHARA, S. Treatment of streptozotocin-induced diabetes *mellitus* by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats<sup>1</sup>. **Transplantation**, v. 73, n. 4, p. 512-518, 2002.

ISIDORI, A. M.; BUVAT, J.; CORONA, G.; GOLDSTEIN, I.; JANNINI, E. A.; LENZI, A.; PORST, H.; SALONIA, A.; TRAISH, A. M.; MAGGI, M. A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment—a systematic review. **European Urology**, v. 65, n. 1, p. 99-112, 2014.

ITALIANO, G.; CALABRO, A.; PAGANO, F. A simplified *in vitro* preparation of the corpus cavernosum as a tool for investigating erectile pharmacology in the rat. **Pharmacological Research**, v. 30, n. 4, p. 325-334, 1994.

JENKINS, T.; BHATTACHARYYA, J.; MAJETICH, G.; TENG, Q.; DE FATIMA, A. M.; ALMEIDA, R. Flavonoids from the root-bark of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 723-730, 1999.

JEREMY, J.; JONES, R.; KOUPPARIS, A.; HOTSTON, M.; PERSAD, R.; ANGELINI, G.; SHUKLA, N. Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. **International Journal of Impotence Research**, v. 19, n. 3, p. 265-280, 2007.

JIN, L.; BURNETT, A. X. A. L. RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. **Clinical Science**, v. 110, p. 153-165, 2006.

JOHANNES, C. B.; ARAUJO, A. B.; FELDMAN, H. A.; DERBY, C. A.; KLEINMAN, K. P.; MCKINLAY, J. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, v. 163, n. 2, p. 460-463, 2000.

JUNG, J.; JO, H. W.; KWON, H.; JEONG, N. Y. Clinical Neuroanatomy and Neurotransmitter-Mediated Regulation of Penile Erection. **International Neurourology Journal**, v. 18, n. 2, p. 58-62, 2014.

KALTER-LEIBOVICI, O.; WAINSTEIN, J.; ZIV, A.; HARMAN-BOHEM, I.; MURAD, H.; RAZ, I. Clinical, socioeconomic, and lifestyle parameters associated with erectile dysfunction among diabetic men. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1739-1744, 2005.

KAMM, K. E.; STULL, J. T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, n. 593-620, 1985.

KEEGAN, A.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. Corpus cavernosum dysfunction in diabetic rats: effects of combined  $\alpha$ -lipoic acid and  $\gamma$ -linolenic acid treatment. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 17, n. 5, p. 380-386, 2001.

KELLY, D. Expansion of the tunica albuginea during penile inflation in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 3, p. 253-265, 1999.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1288-1305, 2012.

KOVAC, J. R.; DEYOUNG, L.; LEHMANN, K. J.; CHUNG, E.; BROCK, G. B. The effects of combined free radical scavenger and sildenafil therapy on age-associated erectile dysfunction: An animal model. **Urology Annals**, v. 6, n. 4, p. 314, 2014.

KUBIN, M.; WAGNER, G.; FUGL-MEYER, A. R. Epidemiology of erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 15, n. 1, p. 63-71, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins basic pathology**. Elsevier Health Sciences, 2012. ISBN 1455737879.

KÜTHE, A.; WIEDENROTH, A.; MÄGERT, H.-J.; ÜCKERT, S.; FORSSMANN, W. G.; STIEF, C. G.; JONAS, U. Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. **The Journal of Urology**, v. 165, n. 1, p. 280-283, 2001.

LAM, D. W.; LEROITH, D. The worldwide diabetes epidemic. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 19, n. 2, p. 93-96, 2012.

LASKER, G. F.; PANKEY, E. A.; KADOWITZ, P. J. Modulation of soluble guanylate cyclase for the treatment of erectile dysfunction. **Physiology**, v. 28, n. 4, p. 262-269, 2013.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD (P) H oxidases: specific features, expression, and regulation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 2, p. R277-R297, 2003.

LEMOS, V. S.; CÔRTEZ, S. F.; DOS SANTOS, M. H.; ELLENA, J.; MOREIRA, M. E.; DORIGUETTO, A. C. Structure and vasorelaxant activity of floranol, a flavonoid isolated from the roots of *Dioclea grandiflora*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 6, p. 635-645, 2006.

LEMOS, V. S.; FREITAS, M. R.; MULLER, B.; LINO, Y. D.; QUEIROGA, C. E.; CÔRTEZ, S. F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, n. 1, p. 41-46, 1999.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LEONE DE ALMEIDA, L.; DA MOTA, L. Estudo morfoquantitativo dos rins de camundongos (*Mus musculus*) tratados com extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth. (Fabaceae). 2005.

LI, H.; HE, W.-Y.; LIN, F.; GOU, X. Panax notoginseng saponins improve erectile function through attenuation of oxidative stress, restoration of Akt activity and protection of endothelial and smooth muscle cells in diabetic rats with erectile dysfunction. **Urologia Internationalis**, v. 93, n. 1, p. 92-99, 2013.

LI, W. J.; PARK, K.; PAICK, J. S.; KIM, S. W. Chronic Treatment with an Oral Rho-Kinase Inhibitor Restores Erectile Function by Suppressing Corporal Apoptosis in Diabetic Rats. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 8, n. 2, p. 400-410, 2011.

LIMA, M. S.; ALBUQUERQUE, D. A.; IBANEZ, O. M.; SANT'ANNA, O. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 599-603, Oct-Dec 1993.

LIN, C. S.; XIN, Z. C.; WANG, Z.; LIN, G.; LUE, T. F. Molecular Yin and Yang of erectile function and dysfunction. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, n. 3, p. 433-440, 2008.

LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T. P.; FRANÇA-SILVA, M. S.; DO NASCIMENTO, R. J.; DE JESUS OLIVEIRA, E.; FRANÇA, K. C.; ANTUNES, A. A.; NAKAO, L. S.; AITA, C. A.; BRAGA, V. A. Uncovering the vasorelaxant effect induced by Vale do São Francisco red wine: A role for nitric oxide. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 6, p. 696-701, 2011.

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

MACHHOLZ, E.; MULDER, G.; RUIZ, C.; CORNING, B. F.; PRITCHETT-CORNING, K. R. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 67, p. 900-911, 2011.

MAIORINO, M. I.; BELLASTELLA, G.; ESPOSITO, K. Diabetes and sexual dysfunction: current perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 7, p. 95, 2014.

MALAVIGE, L. S.; LEVY, J. C. Erectile dysfunction in diabetes *mellitus*. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1232-1247, 2009.

MAS, M.; ESCRIG, A.; GONZALEZ-MORA, J. L. *In vivo* electrochemical measurement of nitric oxide in corpus cavernosum penis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 119, n. 2, p. 143-150, 2002.

MATSUI, H.; A SOPKO, N.; L HANNAN, J.; J BIVALACQUA, T. Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 5, p. 411-419, 2015.

MATTEI, R.; LEITE, J. R.; TUFIK, S. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* Martius Ex Benth. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 1, p. 687-692, 1995.

MCCULLOCH, D.; CAMPBELL, I.; WU, F.; PRESCOTT, R.; CLARKE, B. The prevalence of diabetic impotence. **Diabetologia**, v. 18, n. 4, p. 279-283, 1980.

MCKINLAY, J. The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, p. S6-S11, 2000.

MCMURRAY, G.; CASEY, J. H.; NAYLOR, A. M. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S2, p. S62-S79, 2006.

MELLER, S. M.; STILP, E.; WALKER, C. N.; MENA-HURTADO, C. The link between vasculogenic erectile dysfunction, coronary artery disease, and peripheral artery disease: role of metabolic factors and endovascular therapy. **Journal of Invasive Cardiology**, v. 25, n. 6, p. 313-9, Jun 2013.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.; VAN BEEK, T. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MING, X.-F.; VISWAMBHARAN, H.; BARANDIER, C.; RUFFIEUX, J.; KAIBUCHI, K.; RUSCONI, S.; YANG, Z. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. **Molecular and Cellular biology**, v. 22, n. 24, p. 8467-8477, 2002.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MOINPOUR, C. M.; LOVATO, L. C.; THOMPSON, I. M.; WARE, J. E.; GANZ, P. A.; PATRICK, D. L.; SHUMAKER, S. A.; DONALDSON, G. W.; RYAN, A.; COLTMAN, C. A. Profile of men randomized to the prostate cancer prevention trial: baseline health-related quality of life, urinary and sexual functioning, and health behaviors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1942-1953, 2000.

MONTREAU, F. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la methode Folin-Ciocalteu. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, v. 24, p. 397-404, 1972.

MORANO, S. Pathophysiology of diabetic sexual dysfunction. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, n. 3 Suppl, p. 65-69, 2002.

MOREIRA, E. D.; LBO, C. F. L.; DIAMENT, A.; NICOLOSI, A.; GLASSER, D. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. **Urology**, v. 61, n. 2, p. 431-436, 2003.

MOREIRA JR, E. D.; ABDO, C. H. N.; TORRES, E. B.; LÔBO, C. F. L.; FITTIPALDI, J. A. S. Prevalência e fatores de risco da disfunção erétil no Brasil: resultados do estudo multicêntrico de comportamento sexual. **Revista Brasileira de Medicina**; v. 58, n. 7, p. 515-522, 2001.

MOREIRA, R. A.; BARROS, A. C.; STEWART, J. C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, v. 158, n. 1, p. 63-9, Jun 1983.

MORELLI, A.; VIGNOZZI, L.; MAGGI, M.; ADORINI, L. Farnesoid X receptor activation improves erectile dysfunction in models of metabolic syndrome and diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 8, p. 859-866, 2011.

MOSTAFA, T.; SABRY, D.; ABDELAAL, A.; MOSTAFA, I.; TAYMOUR, M. Cavernous antioxidant effect of green tea, epigallocatechin-3-gallate with/without sildenafil citrate intake in aged diabetic rats. **Andrologia**, v. 45, n. 4, p. 272-277, 2013.

MUNDY, A.; HEALY, J. Muscles and fasciae of the perineum: true pelvis, pelvic floor and perineum. Gray's Anatomy. 39th **Editory London: Elsevier Churchill Livingstone**, p. p1365-71, 2005.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; ULLRICH, V.; MÜLSCH, A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 8, p. 1551-1557, 2005.

MUSICKI, B.; BURNETT, A. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 19, n. 2, p. 129-138, 2007.

MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. eNOS function and dysfunction in the penis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 2, p. 154-165, 2006.

NAGANO, C.; CALVETE, J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B.; SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, p. 417-428, 2008.

NAKANE, M.; HSIEH, G.; MILLER, L.; CHANG, R.; TERRANOVA, M.; MORELAND, R.; KOLASA, T.; BRIONI, J. Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: synergism of nitric oxide and YC-1. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 2, p. 121-127, 2002.

NARUMIYA, S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. **Journal of Biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 215-228, 1996.

NEHRA, A.; MORELAND, R. B. Neurologic erectile dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 289-308, 2001.

NEVES, D.; ASSUNÇÃO, M.; MARQUES, F.; ANDRADE, J.; ALMEIDA, H. Does regular consumption of green tea influence expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in aged rat erectile tissue? Possible implications for vasculogenic erectile dysfunction progression. **Age**, v. 30, n. 4, p. 217-228, 2008.

NICOLOSI, A.; MOREIRA, E. D.; SHIRAI, M.; TAMBI, M. I. B. M.; GLASSER, D. B. Epidemiology of erectile dysfunction in four countries: cross-national study of the prevalence and correlates of erectile dysfunction. **Urology**, v. 61, n. 1, p. 201-206, 2003.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**. v. 270, n.1, p. 83-90, 1993.

NIMMEGEERS, S.; SIPS, P.; BUYS, E.; DECALUWÉ, K.; BROUCKAERT, P.; VAN DE VOORDE, J. Role of the soluble guanylyl cyclase  $\alpha$ 1-subunit in mice corpus cavernosum smooth muscle relaxation. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, n. 3, p. 278-284, 2008.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A.O.; Ademosun, A.O.; OLASEHINDE, T.A.; OYELEYE, S.I.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L. Phenolic Extract from *Moringa oleifera* Leaves Inhibits Key Enzymes Linked to Erectile Dysfunction and Oxidative Stress in Rats' Penile Tissues. **Biochemistry Research International**, v. 2015, 2015.

OHMASA, F.; SAITO, M.; TSOUNAPI, P.; DIMITRIADIS, F.; INOUE, S.; SHOMORI, K.; SHIMIZU, S.; KINOSHITA, Y.; SATOH, K. Edaravone Ameliorates Diabetes-Induced Dysfunction of NO-Induced Relaxation in Corpus Cavernosum Smooth Muscle in the Rat. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1638-1649, 2011.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OUDOT, A.; BEHR-ROUSSEL, D.; LE COZ, O.; POIRIER, S.; BERNABE, J.; ALEXANDRE, L.; GIULIANO, F. How Does Chronic Sildenafil Prevent Vascular Oxidative Stress in Insulin-Resistant Rats? **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 1pt1, p. 79-88, 2010.

OZTEKIN, Ç. V.; GUR, S.; ABDULKADIR, N.; KARTAL, M.; KARABAKAN, M.; AKDEMIR, A.; GÖKKAYA, C.; CETINKAYA, M. Analysis of pomegranate juice components in rat corpora cavernosal relaxation. **International Journal of Impotence Research**, v. 26, n. 2, p. 45-50, 2014.

PAPAHARALAMBUS, C. A.; GRIENDLING, K. K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 2, p. 48-54, 2007.

PASKALOGLU, K.; ŞENER, G.; AYANĞOLU-DÜLGER, G. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta

and corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 345-354, 2004.

PAVAN, V.; MUCIGNAT-CARETTA, C.; REDAELLI, M.; RIBAUDO, G.; ZAGOTTO, G. The Old Made New: Natural Compounds against Erectile Dysfunction. **Archiv der Pharmazie**, 2015.

PENSON, D.; LATINI, D.; LUBECK, D.; WALLACE, K.; HENNING, J.; LUE, T. Comprehensive Evaluation of Erectile Dysfunction (ExCEED) database. Do impotent men with diabetes have more severe erectile dysfunction and worse quality of life than the general population of impotent patients? Results from the Exploratory Comprehensive Evaluation of Erectile Dysfunction (ExCEED) database. **Diabetes Care**, v. 26, n. 4, p. 1093-9, 2003.

PERIN, P.C.; MAULE, S.; QUADRI, R. Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension. **Clinical and experimental hypertension**, v. 23, n. 1-2, p. 45-55, 2001.

PIEPER, A. A.; VERMA, A.; ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 171-181, 1999.

PIMENTEL, V. P.; VIEIRA, V. A. M.; MITIDIERI, T. L.; OLIVEIRA, F. F. S.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES, Rio de Janeiro**, n. 43, p. 41-89, 2015.

POLJSK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

PONHOLZER, A.; TEMML, C.; MOCK, K.; MARSZALEK, M.; OBERMAYR, R.; MADERSBACHER, S. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire. **European Urology**, v. 47, n. 1, p. 80-86, 2005.

PRASAD, K. N.; YANG, B.; YANG, S.; CHEN, Y.; ZHAO, M.; ASHRAF, M.; JIANG, Y. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2009.

PUROHIT, R.; BECKETT, S. D. Penile pressures and muscle activity associated with erection and ejaculation in the dog. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 231, n. 5, p. 1343-1348, 1976.

QUAGLIARO, L.; PICONI, L.; ASSALONI, R.; MARTINELLI, L.; MOTZ, E.; CERIELLO, A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells the role of protein kinase C and NAD (P) H-oxidase activation. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2795-2804, 2003.

RAHIMI, R.; GHIASI, S.; AZIMI, H.; FAKHARI, S.; ABDOLLAHI, M. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; future perspective of new drugs. **Cytokine**, v. 49, n. 2, p. 123-129, 2010.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.; NADKARNI, M. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemotherapy Reports. Part 1**, v. 29, p. 91-98, 1963.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S.; OLIVEIRA, P. J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. **Current Diabetes Reviews**, v. 4, n. 1, p. 46-54, 2008.

RAMALHO, J. A.; GORGONIO, I. F.; LIRA, A. B.; ALVES, M. F.; RAMALHO, L. D. S. N.; CARDOSO, R. B.; DIAS, G. E. N.; GUEDES, E. J. R. C. E.; OLIVEIRA, K. M.; DE ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda em Ratos *Wistar* Tratados com o Extrato Etanólico de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth (Fabaceae)(EEDg). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 18, n. 4, p. 279-286, 2015.

RAMOS, M. V.; MOREIRA RDE, A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S.; ROUGE, P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 761-6, Nov-Dec 1996.

RERIANI, M.; FLAMMER, A. J.; LI, J.; PRASAD, M.; RIHAL, C.; PRASAD, A.; LENNON, R.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Microvascular endothelial dysfunction predicts the development of erectile dysfunction in men with coronary atherosclerosis without critical stenoses. **Coronary Artery Disease**, v. 25, n. 7, p. 552-557, 2014.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. D.; MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; BEGBIE, R.; WATT, W. B.; PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major alpha subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **European Journal of Biochemistry**, v. 144, n. 1, p. 101-11, 1984.

ROY, S.; RAHAMAN, N.; AHMED, F.; METYA, S.; SANNIGRAHI, S. Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative stress in streptozotocin

induced diabetic rats: naringenin prevents diabetic rat testicular damage. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, n. 3, p. 195-208, 2013.

SÁ, R. D. C. D. S.; OLIVEIRA, L. E. G. D.; NÓBREGA, F. F. D. F.; BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, R. N. D. Antinociceptive and toxicological effects of *Dioclea grandiflora* seed pod in mice. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

SÁ, R. D. C. D. S. E.; ALMEIDA, R. N. D.; BHATTACHARYYA, J. Pharmaceutical properties and toxicology of *Dioclea grandiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 659-667, 2013.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, n. 6, p. 407-412, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANDLER, S.; SWENNE, I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets *in vitro*. **Diabetologia**, v. 25, n. 5, p. 444-447, 1983.

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

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009.

SILVEIRA, A. L. C. Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia. 2013.

SILVEIRA E SÁ, R. D. C. D.; OLIVEIRA, L. E. G. D.; FONSECA, D. V. D.; BHATTACHARYYA, J.; SALVADORI, M. G. D. S. S.; ALMEIDA, R. N. D. Central Nervous System effects of *Dioclea grandiflora* pods on mice. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 5, p. 446-456, 2013.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.

SOPKO, N. A.; HANNAN, J. L.; BIVALACQUA, T. J. Understanding and targeting the Rho kinase pathway in erectile dysfunction. **Nature Reviews Urology**, 2014.

SOUDAMANI, S.; YUVARAJ, S.; MALINI, T.; BALASUBRAMANIAN, K. Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 287, n. 2, p. 1281-1289, 2005.

SOUZA, M. F.; OSUNA, J. T. A.; DA SILVA, A. H. B.; DA SILVA, A. B. Biometria de sementes de mucunã (*Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth.). [http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/download/biblioteca/46\\_0740.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/download/biblioteca/46_0740.pdf). 31 Ago. 2013.

SULLIVAN, M.; KEOGHANE, S.; MILLER, M. Vascular risk factors and erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 87, n. 9, p. 838-845, 2001.

SULLIVAN, M. E.; THOMPSON, C. S.; DASHWOOD, M. R.; KHAN, M. A.; JEREMY, J. Y.; MORGAN, R. J.; MIKHAILIDIS, D. P. Nitric oxide and penile erection: Is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 658-665, 1999-08-15 00:00:00 1999.

SURESH, S.; PRAKASH, S. Effect of *Mucuna pruriens* (Linn.) on Oxidative Stress-Induced Structural Alteration of Corpus Caverosum in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 8, n. 7, p. 1943-1956, 2011.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; DE OLIVEIRA, T. M.; CUNHA, R. M.; HAVT, A.; MARTINS, J. L.; PINTO, V. P.; GONCALVES, R. B.; CAVADA, B. S. *In vitro* inhibition of streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 111-6, Jul 2006.

THOMAS, M. C. Advanced glycation end products. **Contributions to Nephrology**, v. 170, p. 66-74, 2011.

THORVE, V. S.; KSHIRSAGAR, A. D.; VYAWAHARE, N. S.; JOSHI, V. S.; INGALE, K. G.; MOHITE, R. J. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 25, n. 2, p. 129-136, 2011.

TOQUE, H. A.; PRIVIERO, F.B; TEIXEIRA, C.E.; CLAUDINO, M.A.; BARACAT, J.S.; FREGONESI, A.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative relaxing effects of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in human corpus cavernosum: contribution of endogenous nitric oxide release. **Urology**, v. 74, n. 1, p. 216-221, 2009.

TOQUE, H. A.; NUNES, K. P.; YAO, L.; LIAO, J. K.; WEBB, R. C.; CALDWELL, R. B.; CALDWELL, R. W. Activated Rho Kinase Mediates Diabetes-Induced Elevation of Vascular Arginase Activation and Contributes to Impaired Corpora Cavernosa Relaxation: Possible Involvement of p38 MAPK Activation. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 10, n. 6, p. 1502-1515, 2013.

TRIGUEIRO, F.; CORTES, S.; ALMEIDA, R.; LEMOS, V. Endothelium-independent Vasorelaxant Effect of Dioclein, a New Flavonoid Isolated from *Dioclea grandiflora*, in the Rat Aorta. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 11, p. 1431-1434, 2000.

TRUSSELL, J.; LEGRO, R. S. Erectile dysfunction: does insulin resistance play a part? **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 4, p. 771-778, 2007.

TSAI, M.-H.; JIANG, M. J. Reactive oxygen species are involved in regulating  $\alpha$ 1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n. 67, p. 1-10, 2010.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, 2010.

VERNET, D.; CAI, L.; GARBAN, H.; BABBITT, M. L.; MURRAY, F. T.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. F. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5709-5717, 1995.

VICARI, E.; LA VIGNERA, S.; CONDORELLI, R.; CALOGERO, A. E. Endothelial antioxidant administration ameliorates the erectile response to PDE5 regardless of the extension of the atherosclerotic process. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1247-1253, 2010.

VLACHOPOULOS, C. V.; TERENCE-PRINTZIOS, D. G.; IOAKEIMIDIS, N. K.; AZNAOURIDIS, K. A.; STEFANADIS, C. I. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with erectile dysfunction a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 6, n. 1, p. 99-109, 2013.

WALSH, T. J.; HOTALING, J. M.; SMITH, A.; SAIGAL, C.; WESSELLS, H. Men with diabetes may require more aggressive treatment for erectile dysfunction.

**International Journal of Impotence Research**, v. 26, n. 3, p. 112-115, 05//print 2014.

WANG, L.; XU, Y.; LI, H.; LEI, H.; GUAN, R.; GAO, Z.; XIN, Z. Antioxidant icaricide II combined with insulin restores erectile function in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 5, p. 960-969, 2015.

WANKEU-NYA, M.; WATCHO, P.; NGUELEFACK, T.; CARRO-JUAREZ, M.; TAPONDJOU, L.; KAMANYI, A. Effects of *Dracaena arborea* (Dracaenaceae) on sexual dysfunction in 4 weeks hyperglycemic male rats. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 8, p. 609-619, 2014.

WEISS, R. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. **Cancer Treatment Reports**, v. 66, n. 3, p. 427, 1982.

WENDT, M. C.; DAIBER, A.; KLESCHYOV, A. L.; MÜLSCH, A.; SYDOW, K.; SCHULZ, E.; CHEN, K.; KEANEY, J. F.; LASSÈGUE, B.; WALTER, U. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91 phox homologues nox1 and nox4. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 3, p. 381-391, 2005.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS-ASHMAN, H.; REDDI, A. Differentiation of mesenchymal tissues during phallic morphogenesis with emphasis on the os penis: roles of androgens and other regulatory agents. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 873-881, 1991.

WILLIAMS, P.; WARWICH, R. Gray's anatomy 36 th. **Editorial London: Elsevier Churchill Livingstone**, v. 198, p. 197-2003, 1980.

WILLIAMSON, J. R.; CHANG, K.; FRANGOS, M.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; KAWAMURA, T.; NYENGAARD, J. R.; VAN DEN ENDEN, M.; KILO, C.; TILTON, R. G. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 801-813, 1993.

WILSON, G. L.; HARTIG, P. C.; PATTON, N. J.; LEDOUX, S. P. Mechanisms of nitrosourea-induced  $\beta$ -cell damage: activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. **Diabetes**, v. 37, n. 2, p. 213-216, 1988.

WOJTALA, A.; BONORA, M.; MALINSKA, D.; PINTON, P.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Methods in Enzymology**, v. 542, p. 243-262, 2013.

\_\_\_\_\_. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. **Conceptual Background and Bioenergetic/Mitochondrial Aspects of Oncometabolism**, v. 542, p. 243-262, 2014.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2003. 427.

WOODE, E.; AMISSAH, F.; AGYAPONG, G.; AINOOSON, G. K. Myorelaxant effect of an alcoholic extract of *Sphenocentrum jollyanum* roots in rabbit aortic strip and corpus cavernosum. **Pharmacologia**, v. 4, n. 5, 2013.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature**, v. 294, p. 284 - 286, 1981.

YANG, C. C.; JIANG, X. Clinical autonomic neurophysiology and the male sexual response: an overview. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. S3, p. 221-228, 2009.

YANG, J.; WANG, T.; RAO, K.; ZHAN, Y.; CHEN, R. B.; LIU, Z.; LI, M. C.; ZHUAN, L.; ZANG, G. H.; GUO, S. M. S-allyl cysteine restores erectile function through inhibition of reactive oxygen species generation in diabetic rats. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 487-494, 2013.

YEN, G.-C.; DUH, P.-D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307-313, 2002.

YETIK-ANACAK, G.; SORRENTINO, R.; LINDER, A.; MURAT, N. Gas what: NO is not the only answer to sexual function. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 6, p. 1434-1454, 2015.

YOON, B. I.; HONG, C.; LEE, J. H.; KIM, S. J.; KIM, H. S.; HA, U. S.; HWANG, S.-Y.; KIM, S. W. The effects of new herbal formula (KBMSI-2) on penile erection and expression of nitric oxide synthase isoforms in streptozotocin-induced diabetic rat model. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, p. 1-6, 2013.

YOUNG, L.; YU, D.; BATEMAN, R. M.; BROCK, G. B. Oxidative Stress and Antioxidant Therapy: Their Impact in Diabetes-Associated Erectile Dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 5, p. 830-836, 2004.

YU, W.; WAN, Z.; QIU, X.-F.; CHEN, Y.; DAI, Y.-T. Resveratrol, an activator of SIRT1, restores erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 15, n. 5, p. 646, 2013.

YILMAZ, D.; BAYATLI, N.; UN, O.; KADOWITZ, P.J.; SIKKA, S.C.; GUR, S. The effect of intracavernosal avanafil, a newer phosphodiesterase-5 inhibitor, on neonatal type 2 diabetic rats with erectile dysfunction. **Urology**, v. 83, n. 2, p. 508. e7-508. e12, 2014.

ZALBA, G.; BEAUMONT, J.; SAN JOSÉ, G.; FORTUÑO, A.; FORTUÑO, M. A.; DIEZ, J. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 56, n. 1, p. 57-64, 2000.

ZAMBLE, A.; CARPENTIER, M.; KANDOUSSI, A.; SAHPAZ, S.; PETRAULT, O.; OUK, T.; HENNUYER, N.; FRUCHART, J.-C.; STAELS, B.; BORDET, R. *Paullinia pinnata* extracts rich in polyphenols promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 599-608, 2006.

ZAMORA-CABALLERO, S.; PEREZ, A.; SANZ, L.; BRAVO, J.; CALVETE, J. J. Quaternary structure of *Dioclea grandiflora* lectin assessed by equilibrium sedimentation and crystallographic analysis of recombinant mutants. **FEBS Letters**, v. 589, n. 18, p. 2290-6, Aug 19 2015.

ZHANG, W.; WANG, Y.; YANG, Z.; QIU, J.; MA, J.; ZHAO, Z.; BAO, T. Antioxidant treatment with quercetin ameliorates erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 215-218, 2011.

ZHANG, X. H.; FILIPPI, S.; MORELLI, A.; VIGNOZZI, L.; LUCONI, M.; DONATI, S.; FORTI, G.; MAGGI, M. Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 3, n. 2, p. 253-266, 2006.

*Anexo*

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**  
**CERTIDÃO – 2º VIA**

João Pessoa, 29 de setembro de 2015.

CEUA Nº 1011/11

Ilmo(a). **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

Departamento **Departamento de Farmácia - CCS - UFPB**

Orientando(a) : **Valéria Lopes de Assis – (Doutorado)**

Ref.: **2º Via da Certidão CEUA Nº 1011/11.**

Conforme solicitado por vossa senhoria, estamos emitindo 2º via da certidão CEUA Nº 1011/11 com entrada em **04/11/2011**. Relativo a projeto intitulado: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA CASCA DA UVA Vitis vinífera L. DO VALE DO SÃO FRANCISCO EM DOIS MODELOS DE DISFUNÇÃO ERÉTIL INDUZIDOS POR L-NAME E ESTREPTOZOTOCINA.**

Os demais dados da certidão original seguem tal como estão, não havendo alterações na quantidade de animais ou de suas linhagens. Caso alguns animais já tenham sido utilizados, estes deverão ser descontados do montante relatado na certidão original.

Com previsão original de utilizar: **152 Ratos**

Para serem utilizados no período de **04/11/11 a 04/06/15**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis-Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB