

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O CONTROLE
AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR EM RATOS NORMOTENSOS**

VANESSA CAPUANO

UBERABA, MG, 2007

VANESSA CAPUANO

**EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O CONTROLE
AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR EM RATOS NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Clínica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Junho, 2007

VANESSA CAPUANO

Dissertação intitulada “*Efeito do Citrato de Sildenafil sobre o Controle Autonômico Cardiovascular em Ratos Normotensos*”, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Uberaba, 11 de junho de 2007.

Dedicatória

*À minha mãe, Adair, pelos incansáveis anos de dedicação,
e pela força em todos os momentos de minha vida.*

Agradecimentos

Na realização deste trabalho de mestrado estiveram envolvidas várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste. Agradeço a todas elas pela convivência, auxílio, compreensão e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, humildade e simplicidade, pelo exemplo de profissionalismo, por todos os desafios lançados, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e incentivo, e por ter confiado e acreditado na minha capacidade e força de trabalho.

Aos professores da Disciplina de Fisiologia, Luiz Carlos, Edson, Aldo e Simone, pelo convívio e pela aprendizagem que me proporcionaram.

Aos técnicos e funcionários da Disciplina de Fisiologia, Ana Maria, Margareth, Donizete e Glauco, pela amizade, atenção, auxílio, apoio e cuidado com os animais no biotério.

Aos meus amigos Octávio, Karime, Igor, Ricardo, Alethéia, Marcus Paulo, Patrícia, Elizabete, Marília, Maria de Lourdes, Lucas, Ana Paula, Tiago e Gustavo, pela agradável convivência, pela paciência e compreensão, e pelo companheirismo e apoio, em todos os momentos.

Aos amigos da Disciplina de Bioquímica, Geraldo Garcia e Marco Túlio, pela prontidão e assistência prestada.

Aos animais, que mesmo sem querer ou entender o porquê, foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À minha mãe, pela paciência, carinho e apoio.

A Deus, pela realização de mais um sonho.

À FAPEMIG e FUNEPU pelo auxílio financeiro.

Resumo

RESUMO

O citrato de sildenafil (Viagra[®]) é um fármaco amplamente utilizado e eficaz no tratamento atual da disfunção erétil. Vários estudos clínicos, entretanto, têm demonstrado que em pacientes cardiopatas em uso de nitratos orgânicos, a associação com o sildenafil pode elevar o risco de eventos cardíacos fatais. Entre os mecanismos implicados nesta elevação de risco, destaca-se uma eventual ação do sildenafil provocando uma ativação simpática reflexa decorrente de seus efeitos vasodilatadores e hipotensores. Entretanto, poucos são os estudos que confirmam esta hipótese. O objetivo do presente trabalho é avaliar se o sildenafil é capaz de provocar um desequilíbrio autonômico, empregando a análise de variabilidade cardiovascular, por meio de análise espectral associada ao estudo do reflexo barorreceptor cardíaco e à avaliação do tônus autonômico cardíaco, por meio de bloqueio farmacológico. Um total de trinta e um ratos Wistar, machos, normotensos, com peso de 250-350 gramas, foram utilizados. Vinte quatro horas antes da aferição direta dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) e tiveram a artéria e veia femorais cateterizadas. No dia seguinte, após 15 minutos de registro basal de pressão arterial (PA), um grupo de animais (grupo Sil, n=18) recebeu uma dose em bolus (1mg/Kg. i.v.) seguido de infusão contínua (1mg/Kg/hora, i.v.) de sildenafil. Um segundo grupo de animais (grupo Con, n=13) recebeu bolus inicial (1mL/Kg) e infusão contínua (1mL/Kg/hora) de solução fisiológica a 0,9% (veículo). A pressão arterial foi registrada por 30 minutos após o início de tratamento e em seguida foi analisada por meio de análise espectral da variabilidade das séries temporais do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS), derivadas da pressão arterial pulsátil. Valores médios de IP e PAS, bem como seus respectivos valores de variância e

componentes espectrais de baixa (LF) e alta frequência (HF) foram quantificados. Em adição, estas séries temporais foram também empregadas para estimação da sensibilidade barorreflexa cardíaca espontânea, através do cálculo do índice-alfa (raiz quadrada da razão entre LF do IP e LF da PAS). Em seguida, doses em bolus alternadas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram administradas para indução de alterações na PA e avaliação das respostas reflexas da frequência cardíaca (FC), as quais permitiram o cálculo da sensibilidade barorreflexa cardíaca induzida farmacologicamente. Por fim, bloqueio farmacológico com atropina e propranolol foi empregado para a estimação do controle tônico simpático e parassimpático cardíaco, da frequência intrínseca de marcapasso cardíaca (FIMC) e do índice simpato-vagal cardíaco (razão da FC basal pela FIMC). O tratamento com sildenafil provocou uma significativa taquicardia (FC de 325 ± 8 bpm no basal para 355 ± 9 bpm após o tratamento, $p < 0,001$) e hipotensão arterial (PAS de 130 ± 3 mmHg para 125 ± 3 , $p < 0,05$), enquanto a infusão de veículo não provocou nenhuma modificação nos parâmetros hemodinâmicos médios. Os índices espectrais de variabilidade do IP e da PAS não sofreram modificações após o tratamento em comparação com o período basal em ambos os grupos. As sensibilidades barorreflexas espontânea e induzida não diferiram entre os dois grupos, assim como a FIMC. Quanto ao tônus autonômico, o sildenafil induziu uma significativa redução do efeito parassimpático vagal sobre o coração acompanhado de uma elevação do ISV, com tendência de aumento do efeito simpático cardíaco. Concluindo, embora o sildenafil administrado agudamente provoque uma ligeira hipotensão arterial associada a uma leve taquicardia, provavelmente de origem reflexa, decorrente de uma inibição parassimpática vagal, estas alterações não foram associadas a modificações nos parâmetros de variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca e na sensibilidade barorreflexa cardíaca.

Abstract

ABSTRACT

Sildenafil citrate (Viagra[®]) is a broadly used agent to treat erectile dysfunction. Several clinical trials, however, have demonstrated that in heart diseased patients in use of organic nitrates, the association with sildenafil could significantly enhance cardiac events risk. The possible mechanisms implicated in this increased risk are not completely understood, but an eventual reflex sympathetic over-activation due to the vasodilation and light hypotension caused by sildenafil may not be ruled out. However, there are only a few reports in literature concerning to this issue. Therefore, the aim of the present study was to evaluate if sildenafil, acutely administrated, is able to provoke autonomic imbalance by means of spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities, associated to evaluation of the spontaneous and induced baroreflex control of heart rate and to measurements of the cardiac tonic autonomic control by means of pharmacological blockade. Thirty one normotensive male Wistar rats, weighing 250-350 gr. were studied. Twenty four hours before direct measurements of hemodynamic parameters, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) e had their femoral vessels catheterized for direct arterial blood pressure recordings and drug administration. In the following day, after fifteen minutes of baseline arterial pressure (AP) recordings, a group of animals (Sil, n=18) has received a bolus injection (1mg/Kg. i.v.) followed by continuous administration (1mg/Kg/hour, i.v.) of sildenafil. A second group of animals (Con, n=13) has received a bolus injection (1mL/Kg) and a continuous infusion (1mL/Kg/hora) of physiological saline solution (vehicle). Arterial blood pressure was continuously recorded during thirty minutes after to start the treatment and it was analyzed by means of spectral analysis of heart rate (pulse interval-PI) and systolic (SAP) arterial pressure variabilities, which were extracted from direct pulsatile arterial blood pressure signal. Mean values of PI

and SAP as well as its respective values of variance and low (LF) and high frequencies (HF) spectral components were quantified. In addition, PI and SAP time series were used to estimate the alfa-index (square root of ratio between LF-PI and LF-SAP), an index that measures the spontaneous cardiac baroreflex sensitivity. Following, alternate bolus injections of phenylephrine and sodium nitroprusside were administered in order to induce changes in arterial pressure and to evaluate baroreflex-mediated heart rate responses, which permit to calculate an index of pharmacologically induced baroreflex sensitivity. At the end of the experimental protocol, sequential pharmacological blockade of autonomic nervous system using atropine or propranolol was performed in order to estimate the sympathetic and parasympathetic cardiac tonic control, the pacemaker intrinsic heart rate (IHR) and the sympathovagal index (ratio between basal HR and IHR). Sildenafil caused a significant tachycardia (from 325 ± 8 bpm in baseline to 355 ± 9 bpm after treatment, $p < 0,001$) and arterial hypotension (PAS from 130 ± 3 mmHg in baseline to 125 ± 3 mmHg, $p < 0,05$), while saline (vehicle) infusion did not provoke any change in the hemodynamic parameters. Spectral components of PI and SAP variability as well as spontaneous and pharmacologically induced baroreflex sensitivities and IHR were not modified after treatment for both sildenafil and vehicle. Regarding to heart rate tonic control, sildenafil induced a significant reduction of parasympathetic vagal effect on the heart associated to an increase in SVI and a trend towards increased sympathetic effect on heart rate. In conclusion, although sildenafil, acutely administered, causes a light arterial hypotension associated to probably reflex tachycardia, due to vagal parasympathetic inhibition, these changes were not associated to alterations in heart rate and arterial pressure variabilites and cardiac baroreflex sensitivity.

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Objetivos	24
2.1- Objetivos gerais	24
2.2- Objetivos específicos	24
3. Materiais e métodos	26
3.1- Animais experimentais	26
3.2- Procedimentos cirúrgicos	26
3.3- Protocolo experimental	27
3.4- Grupos experimentais	28
3.5- Análise dos dados	28
3.6- Análise estatística	32
4. Resultados	34
5. Discussão	48
6. Conclusão	56
7. Referências Bibliográficas	58

Lista de figuras

Figura 1 – Perfil de resposta da FC e PA durante o tratamento com veículo (controle) ou sildenafil em dois animais representativos dos dois grupos experimentais.....	38
Figura 2 – Evolução temporal das respostas do intervalo de pulso (IP) (Painel A), pressão arterial sistólica (PAS) (Painel B) e diastólica (PAD) (Painel C), medidas a cada 5 minutos durante o tratamento com veículo (controle) ou sildenafil nos dois grupos experimentais.....	39
Figura 3 – Gráficos de contorno de densidade espectral coloridos mostrando espectros seqüenciais (tempo x freqüência) do intervalo de pulso (Painel A) e da pressão arterial sistólica (Painel B) e diastólica (Painel C) de um animal representativo do grupo controle.....	40
Figura 4 – Gráficos de contorno de densidade espectral coloridos mostrando espectros seqüenciais (tempo x freqüência) do intervalo de pulso (Painel A) e da pressão arterial sistólica (Painel B) e diastólica (Painel C) de um animal representativo do grupo sildenafil.....	41
Figura 5 – Séries temporais de IP e PAS, bem como gráficos espectrais de coerência e desvio de fase de um trecho de 300 batimentos coletados após o tratamento, de animal representativo do grupo controle (Painel A) e de um animal representativo do grupo sildenafil(PainelB).....	43

Figura 6 – Índices de sensibilidade barorreflexa obtidos a partir das razões entre variações da FC induzidas por alterações da PAM causadas por fenilefrina (bradicardia reflexa) e nitroprussiato de sódio (taquicardia reflexa)..... 45

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores médios (\pm epm) da frequência cardíaca, e pressões arteriais sistólica, diastólica e média, medidos nos 15 minutos basais prévios ao tratamento nos grupos controle (Com) e tratado com sildenafil (Sil).....34

Tabela 2: Valores médios (\pm epm) da frequência cardíaca, intervalo de pulso, variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade do intervalo de pulso (IP) antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).....35

Tabela 3: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial sistólica (PAS), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAS antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratados com sildenafil (Sil).....36

Tabela 4: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial diastólica (PAD), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAD antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratados com sildenafil (Sil).....37

Tabela 5: Valores médios (\pm epm) do alfa-índice, um índice de sensibilidade barorreflexa espontânea, calculados para a banda LF das oscilações de IP e PAS antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratados com sildenafil (Sil).....42

Tabela 6: Valores médios (\pm epm) do ganho da bradicardia e taquicardia reflexa nos grupos controle (Con) e sildenafil.....44

Tabela 7: Valores médios (\pm epm) do controle autonômico tônico da FC representados pelos efeitos vagal e simpático nos grupos controle (Con) e tratados com sildenafil (Sil). Após o duplo bloqueio foi também quantificada a frequência intrínseca de marcapasso (FIMC) e o índice simpato-vagal.....46

Introdução

1. ÓXIDO NÍTRICO

Em 1980, FURCHOGOTT E ZAWADZKI (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980) demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina era dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito era mediado por um fator humoral lábil, mais tarde conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF).

Em 1987 foi demonstrado que esse fator de relaxamento derivado do endotélio era um radical livre, o óxido nítrico (NO). PALMER e cols. (1987) sugeriram que EDRF e óxido nítrico eram indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade química e susceptibilidade a inibidores ou potencialização, e que ambos tinham sua ação inibida pela hemoglobina e potencializada por superóxido dismutase (IGNARRO, 1990). O óxido nítrico foi escolhido como a molécula do ano de 1992 (KOSHLAND, 1992).

O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor, dependendo do meio em que ele está, e é rapidamente destruído pelo oxigênio (ARCHER, 1993), sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato (KIECHELE & MALINSKI, 1993). O NO tem o menor peso molecular de qualquer produto de secreção celular de mamíferos; sua meia-vida é curta (5 a 10 s *in vitro*) e a especificidade de suas reações é mínima (NATHAN, 1992; IGNARRO, 1990). Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás. Sua solubilidade é moderada em água (1,9 mM a 25o C), sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tais como hexano (0,13 M a 25o C) (SHAW & VOSPER, 1977). Desta forma, quando presente em sistemas biológicos, o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (KERWIN e cols., 1995). A molécula do NO tem um elétron não pareado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre nitrato (KIECHELE & MALINSKI, 1993). O NO tem alta afinidade

com o heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase) e também liga-se a grupos -SH, formando nitrosotiol (WENNMALM, 1994).

Várias células utilizam a l-arginina para sintetizar o óxido nítrico (PALMER & MONCADA, 1998; WU & MORRIS, 1998).

Nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina produz o radical livre gasoso, NO, e L-citrulina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) (KUO & SCHROEDER, 1995). A síntese de NO envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar NG-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O₂) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizados como co-fatores na reação (MARLETTA, 1994; MARLETTA e cols, 1998).

O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (MONCADA e cols, 1991). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O sistema GC/GMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO (LENHINGER, 1986; SNYDER & BREDT, 1992). O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula. O mecanismo de relaxamento

envolve a diminuição da entrada de Ca^{++} para a célula, a inibição da liberação de Ca^{++} do retículo endoplasmático e o aumento do seqüestro de Ca^{++} para o retículo endoplasmático (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

A vasodilatação se mantém enquanto a difusão do NO para a musculatura lisa vascular estiver ocorrendo. Um aumento no fluxo de NO para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e maior vasodilatação. Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada (WENNMALM, 1994). O efeito vasodilatador do NO parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares (WONG & MARSDEN, 1996). O NO também pode ser produzido pelas células musculares lisas, podendo regular a atividade dessas células por um mecanismo dependente da GMPc (MOLLACE e cols, 1991).

A interação do NO com a guanilil ciclase solúvel provoca muitos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos. Entretanto, o NO, ou os produtos de sua reação, como oxigênio “singlet” e radicais superóxido, podem modificar diferentes macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos para produzir tanto efeitos fisiológicos como fisiopatológicos (DAVIS e cols, 2001).

São descritas três isoformas de NOS, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (a NOS neuronal –nNOS ou NOS I e a NOS endotelial –eNOS ou NOSIII) (KIECHELE & MALINSKI, 1993; WONG & MARSDEN, 1996). Todas as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III) (WANG & MARDSEN, 1995). As NOS estão presentes no citosol, e são inibidas por análogos da L-arginina (MONCADA e cols, 1991) e requerem NADPH, tetrahydrobiopterina (BH4), flavina adenine dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como cofatores (FARREL & BLAKE, 1996).

As isoenzimas NOS podem ser, sob ponto de vista prático, caracterizadas como de baixo ou alto débito conforme a duração da atividade da NOS.

As isoformas I e III (nNOS e eNOS) são de baixo débito, estando envolvidas em processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo, controle imediato da PA (ZHANG E COLS, 1994). Considera-se a eNOS de menor débito do que nNOS. Já a isoenzima II ou iNOS, quando estimulada permanece em atividade por horas com mecanismo de sinergismo de indução inclusive do próprio NO produzido (GELLER e cols, 1993).

Outra classificação das NOS é determinada pela sua dependência de cálcio para ativação. O Ca^{++} é um importante sinalizador citoplasmático, atuando a partir de ligações com proteínas intracelulares receptoras específicas. Uma destas proteínas citoplasmáticas (Ca^{++} -receptoras) é a calmodulina, encontrada em praticamente todas as células. Quando o Ca^{++} se liga à calmodulina forma-se o complexo Ca^{++} /calmodulina, este, um elemento regulatório de algumas atividades enzimáticas intracelulares. Quando a concentração intracelular de Ca^{++} cai, desfaz-se o complexo Ca^{++} /calmodulina e a atividade enzimática é desativada. Este mecanismo Ca^{++} /calmodulina é responsável pela ativação da eNOS. No caso da nNOS, segue-se o mesmo mecanismo descrito. Para a iNOS, o mecanismo de ação depende da concentração intracelular de Ca^{++} somente para ativação, sendo que a queda do Ca^{++} intracelular não inibe a atividade da iNOS. Assim, classificam-se as NOS como cálcio-dependentes (que são as isoformas I e III) e cálcio-independentes (isoforma II) (NATHAN & XIE, 1994).

A isoforma I ou óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) é uma NOS constitutiva, presente em neurônios, células epiteliais, SNC e Sistema Nervoso Periférico, nervos autonômicos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino, células β pancreática e outros. É

cálcio-calmodulina dependente e regula a transmissão sináptica no SNC; atua na regulação central da pressão sangüínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. Também regula o fluxo sangüíneo cerebral local e está envolvida na formação da memória (FÖRSTERMANN e cols, 1994).

A isoforma II ou óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) é manifestada em uma multidão de células diferentes, incluindo macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, depois de estimulação com lipopolissacárides (LPS), citocinas (como IL-1 β , TFN- α , IFN- γ , IL-6) e outros. Por estas características tem importante papel em atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas (FORSTERMANN & KLEINERT, 1995). Esta isoforma não é regulada pelo cálcio. Ela produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático nas células alvo parasitadas via inibição de enzimas férricas, causando fragmentação do DNA. A indução da iNOS está envolvida na fisiopatologia das doenças auto-imunes e no choque séptico (FORSTERMANN e cols, 1994).

A isoforma III ou óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) é uma NOS constitutiva e produz NO em endotélio vascular sob condições basais, mas a força de cisalhamento produzida pelo fluxo sangüíneo pode incrementar sua produção.

A atividade do NO foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos NANC, macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal e miocárdio (KIECHELE & MALINSKI, 1993; BARRACHINA e cols, 2001; SHAPIRA & WEISSMAN, 1994).

No sistema nervoso central (SNC) e periférico, a função do NO ainda não está muito bem elucidada. Além do NO atuar como neurotransmissor, ele media a plasticidade” sináptica” (SHIBUKI, 1994) (capacidade de modulação e adaptação das sinapses para

transmissão do impulso nervoso) e facilita a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (DAWSON, 1994).

Atualmente, todas as evidências levam a crer que o NO é o principal regulador da pressão sanguínea e este controle é efetuado a partir da produção de NO nas células endoteliais. Neste processo, observa-se que vários mensageiros químicos, incluindo hormônios e acetilcolina (Ach), podem ativar a enzima eNOS, ligando-se a receptores apropriados na membrana da célula endotelial. (FELDMAN e cols, 1993; FRICKER, 1995; SNYDER & BREDET, 1992).

O NO também atua no sistema de defesa do organismo, sendo demonstrada sua ação bactericida, antiparasitária e antiviral (DRAPIER e cols., 1988; LOWENSTEIN e cols., 1993), além de ser capaz de destruir células tumorais (FÖRSTERMANN e cols, 1994).

Tem sido demonstrado que o NO produzido pelo endotélio vascular ou oriundo de doadores exógenos é capaz de inibir a proliferação da camada muscular, embora o mecanismo de atividade antiproliferativa não esteja completamente esclarecido (GEWALTIG & KOJDA, 2002; SCOTT-BURDEN & VANHOUTTE, 1993).

O NO tem efeito antioxidativo, onde o NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O_2^- disponível e, conseqüentemente, a produção de $ONOO^-$. (WOLIN, 2000).

No sistema circulatório, em particular na coagulação sanguínea, o NO está envolvido com as cascatas fibrinolítica e trombótica associadas com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam, em parte, da inibição da adesão e agregação plaquetária (KUO & SCHROEDER, 1995; LOSCALZO, 2001).

O tônus vascular é normalmente mantido por uma constante liberação de quantidades ínfimas de NO sempre que há um aumento do atrito exercido pelas células

circulantes sobre a camada endotelial do vaso (shear-stress), resultando em uma discreta vasodilatação (WENNMALM, 1994). Além disso, a pressão sanguínea e o fluxo pulsátil contribuem para regular a liberação de NO em condições fisiológicas (NAVA & LÜSCHER, 1995).

Em alguns leitos vasculares, além da contínua liberação de NO pelo endotélio, mediado por hormônios e “shear-stress” como acima citado, o NO pode também ser liberado diretamente na vizinhança dos músculos lisos vasculares da camada média pela presença de nervos autonômicos do tipo NANC, liberadores de NO via ativação de nNOS, conhecidos como nervos nitrérgicos, inervando esta região. Um exemplo em particular deste fenômeno, foi muito bem descrito na inervação autonômica parassimpática da musculatura lisa que envolve os vasos penianos e corpos cavernosos e esponjosos do pênis (BURNETT, 1995). A ativação dos nervos parassimpáticos pelvins, originados da medula espinhal sacral, por meio da excitação sexual, resulta na liberação de NO, que atuando como neurotransmissor, leva ao relaxamento da musculatura lisa dos vasos penianos e ao engurgitamento dos corpos cavernosos e esponjosos, determinando o fenômeno da ereção peniana (BURNETT, 1995).

O conhecimento das importantes ações do óxido nítrico, protegendo o sistema cardiovascular em geral e promovendo a ereção peniana, em especial, deu início em meados dos anos 90, a uma verdadeira corrida para o desenvolvimento de novos fármacos que agissem modulando e estimulando a via da l-arginina - óxido nítrico –GMPc, os quais teriam, potencialmente, efeitos benéficos como vasodilatadores e anti-hipertensivos em geral e poderiam ser inclusive eficazes no tratamento da disfunção erétil, em especial. Uma das várias novas modalidades de fármacos desenvolvidas foi aquela baseada no mecanismo de ação de inibição da fosfodiesterase-5, a qual é reconhecida como um degradador

fisiológico do GMPc nos leitos vasculares. O primeiro protótipo desta nova classe de fármacos foi o citrato de sildenafil (BOOLELL e cols., 1996).

2. CITRATO DE SILDENAFIL

O Citrato de Sildenafil pertence a uma classe de compostos chamada de inibidores de fosfodiesterases (PDE). PDEs incluem uma família diversa de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) e exercem um papel crítico na modulação da via de sinalização do segundo mensageiro (BEAVO, 1995).

O sildenafil é um inibidor seletivo da PDE-5, específica do GMPc (BOOLELL e cols, 1996). Há 11 famílias de PDEs que foram identificadas em tecidos de mamíferos (CORBIN & FRANCIS, 2002), e a distribuição das várias PDEs varia entre diferentes tecidos e tipos celulares (WALLIS e cols, 1999). PDEs contribuem de maneira importante para a modulação de diversos processos fisiológicos (BEAVO, 1995).

As PDEs variam de acordo com a especificidade de seu substrato para cAMP e cGMP: PDE5, PDE6 e PDE9 são específicas para cGMP; PDE4, PDE7 e PDE8 são específicas para cAMP; e PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11 têm especificidade mista para cAMP/cGMP (ROTELLA, 2002).

O efeito do sildenafil é mais potente para a PDE-5 quando comparado a outras PDEs conhecidas (10 vezes para a PDE-6, > 80 vezes para a PDE-1 e > 700 vezes para a PDE-2, PDE-3, PDE-4 e PDE-7 - PDE-11). A seletividade do sildenafil, aproximadamente 4000 vezes maior para a PDE-5 *versus* a PDE-3, é importante, uma vez que a PDE-3 está envolvida no controle da contratilidade cardíaca (WALLIS e cols, 1999).

O sildenafil é eliminado predominantemente através do metabolismo hepático (principalmente via citocromo P450 3A4), e é convertido a um metabólito ativo com

propriedades semelhantes ao sildenafil inalterado (STEERS, 1998). A absorção do sildenafil é rápida após administração oral, apresentando uma biodisponibilidade absoluta de aproximadamente 40%. (GOLDSTEIN e cols, 1998). O sildenafil, a uma concentração equivalente a 3.5 nM, inibe em 50% a atividade da enzima humana PDE-5, *in vitro* (PARUMS e cols, 2000). As concentrações plasmáticas máximas observadas são atingidas de 30 a 120 minutos (em média 60 minutos) após uma dose oral, em jejum. Quando o sildenafil é administrado com uma refeição rica em lípidos, a taxa de absorção é reduzida, verificando-se um atraso médio de 60 minutos no T_{máx} intestinal e uma redução média de 29% na C_{máx} (BOOLELL e cols, 1996).

O volume médio de distribuição do sildenafil no estado de equilíbrio (*steady state*) é de 105 litros, indicando sua distribuição nos tecidos. O sildenafil e o seu principal metabólito circulante, o N-desmetil-sildenafil, apresentam uma ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 96%. A ligação protéica é independente da concentração total do fármaco. (GOLDSTEIN e cols, 1998; BOOLELL e cols, 1996). O sildenafil sofre depuração hepática principalmente pelas isoenzimas microssomais CYP3A4 (via principal) e CYP2C9 (via secundária). O principal metabólito circulante, que mais tarde também é metabolizado, resulta da N-desmetilação do sildenafil. (GOLDSTEIN e cols, 1998; MUIRHEAD e cols, 2002). Esse metabólito apresenta perfil de seletividade para as PDEs semelhante ao sildenafil, e potência de inibição *in vitro* para a PDE-5 de aproximadamente 50% da verificada para o fármaco inalterado. As concentrações plasmáticas desse metabólito são de aproximadamente 40% da verificada para o sildenafil (GOLDSTEIN e cols, 1998). O sildenafil e o seu metabólito N-desmetil, apresentam meia-vida de aproximadamente 4 h. (GOLDSTEIN e cols, 1998; STEERS, 1998).

O *clearance* total do sildenafil é de 41 L/h, com meia-vida de 3-5 horas. Após administração oral ou intravenosa, o sildenafil é excretado sob a forma de metabólitos,

predominantemente nas fezes (aproximadamente 80% da dose oral administrada) e em menor quantidade na urina (aproximadamente 13% da dose oral administrada) (BOOLELL e cols, 1996).

Os efeitos colaterais mais freqüentes podem ser: 1) vasodilatadores: cefaléia (16%), rubor (10%) e rinite (4%). Tontura (2%), hipotensão comum e hipotensão postural (2% cada) ocorreram com freqüência idêntica nos grupos sildenafil e placebo; 2) gastrointestinais: dispepsia por refluxo (7%); 3) visuais: aumento da sensibilidade à luz ou visão azul-esverdeada ou turva (3%), principalmente com doses de 100mg; 4) músculo-esqueléticos: mialgias, principalmente com múltiplas doses, sem alterações na concentração da creatinofosfoquinase e no eletromiograma; 5) priapismo: têm sido descritos relatos ocasionais (ACC/AHA EXPERT CONSENSUS DOCUMENT, 1999; ZUSMAN, 1999).

Em virtude dos enormes benefícios trazidos para o tratamento da disfunção erétil masculina, da boa tolerabilidade e uma baixa incidência de efeitos colaterais, o sildenafil foi rapidamente aceito para uso geral na população para o tratamento de disfunção erétil (ACC/AHA EXPERT CONSENSUS DOCUMENT, 1999; ZUSMAN, 1999).

Entretanto, relatos epidemiológicos no final dos anos noventa, início de 2000, encontraram uma associação significativa e independente do uso de citrato de sildenafil e o aumento de arritmias cardíacas graves e de morte cardíaca súbita, principalmente naqueles com insuficiência cardíaca em uso de nitratos orgânicos para alívio de pré-carga cardíaca (ACC/AHA EXPERT CONSENSUS DOCUMENT, 1999; ZUSMAN, 1999). Tal associação trouxe um importante alerta para a comunidade médica e suscitou uma série de novos estudos objetivando identificar as razões desta associação indesejável.

Um dos principais mecanismos propostos foi a indução provocada pelo sildenafil, provavelmente por via reflexa, de uma disfunção autonômica aguda, caracterizada por

hiper-excitação simpática e/ou inibição vagal cardíaca, a qual agindo num substrato cardíaco patológico (a insuficiência cardíaca), é reconhecidamente, extremamente deletéria, colocando em risco o funcionamento elétrico do coração e predispondo ao surgimento de arritmias cardíacas graves e morte súbita. Os nitratos orgânicos, uma vez agindo na promoção de uma maior biodisponibilidade direta de NO para os tecidos vasculares, obviamente potenciam as respostas do sildenafil e, provavelmente, seus efeitos reflexos (ACC/AHA EXPERT CONSENSUS DOCUMENT, 1999; ZUSMAN, 1999).

3. CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR

O sistema nervoso autonômico influencia tônica e reflexamente o sistema cardiovascular, uma vez que, tanto a noradrenalina como a acetilcolina liberadas no coração, modificam o débito cardíaco por alterar a força de contração das fibras miocárdicas e a frequência cardíaca. Nos vasos de resistência da circulação sistêmica, a liberação de noradrenalina modifica o estado contrátil do músculo liso vascular e, assim, a resistência vascular periférica (FRANCHINI & COWLEY, 1996). Além disto, o simpático pode exercer efeito trófico sobre as células musculares lisas e miocárdicas (VICTOR & MARK, 1995; FRANCHINI, 1998).

Em adição, respostas reflexas do simpático e do parassimpático permitem ajustes do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, contribuindo para a estabilização e manutenção da pressão arterial sistêmica durante diferentes situações fisiológicas (COWLEY & FRANCHINI, 1996). Nesse contexto, sabe-se que pelos menos três dos maiores arcos reflexos estão envolvidos na modulação da atividade parassimpática para o coração e simpática para coração e vasos, ligados aos pressorreceptores arteriais (alta

pressão), aos receptores cardiopulmonares (baixa pressão) e aos quimorreceptores arteriais (IRIGOYEN e cols, 2003).

Os pressorreceptores arteriais, ou também chamados de barorreceptores, são terminais nervosos situados nas paredes das artérias; quando estirados, são, também, estimulados. Eles são extremamente abundantes na parede de cada artéria carótida interna, ligeiramente acima da bifurcação carotídea, área conhecida como seio carotídeo, e na parede do arco aórtico. Os sinais são transmitidos de cada seio carotídeo por meio do pequeno nervo de Hering até o nervo glossofaríngeo, e daí para o núcleo do trato solitário (NTS) na área bulbar do tronco cerebral. Os sinais provenientes do arco da aorta são transmitidos através dos nervos vagos também para a mesma área do bulbo (GUYTON & HALL, 2002).

Os pressorreceptores arteriais por serem mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular e, devido ao seu alto ganho, constituem-se na forma mais importante de controle da pressão arterial em curto prazo, ou seja, momento a momento. Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Assim, o comprometimento da função dos pressorreceptores pode atuar como elemento permissivo ao estabelecimento de alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por não modular a atividade simpática e parassimpática de modo adequado (IRIGOYEN e cols, 1991; IRIGOYEN e cols, 1995).

O reflexo barorreceptor pode ser ativado pelo estímulo mecânico dos corpos carotídeos, manobra de Valsalva, mudanças posturais e injeção de drogas, os quais induzem modificações de pressão arterial que devem ocasionar modificações da frequência cardíaca (FERRER e cols, 1991).

Em modelos animais, a sensibilidade barorreflexa pode ser avaliada pela infusão de drogas vasoativas, fenilefrina e nitroprussiato de sódio, as quais induzem aumentos e quedas da PA que promovem respostas bradicárdicas e taquicárdicas, respectivamente. Pelo menos três métodos de avaliação dessas respostas de FC às alterações da PA estão padronizados e são muito utilizados na literatura: a) o índice de sensibilidade, b) a regressão linear e, c) a curva sigmoíde (FARAH e cols, 1999).

A frequência cardíaca (FC) está constantemente submetida a flutuações no tônus autonômico, determinadas pela ativação e/ou inibição simpática e parassimpática. Diferentes estímulos, como respiração, contração muscular e graus variáveis de estimulação dos barorreceptores arteriais (aórticos, carotídeos e pulmonares) entre outros (HAINSWORTH e cols, 1970; HAINSWORTH, 1991), são os responsáveis por este padrão dinâmico da atividade autonômica. Desta forma, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a função autonômica através do comportamento variável espontâneo da FC (CASTRO e cols, 1992).

O estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um método que nos permite analisar as flutuações que ocorrem durante períodos curtos ou prolongados (24h) (MALIK & CAMM, 1995; TASK FORCE, 1996), tendo a vantagem de possibilitar uma avaliação não invasiva e seletiva da função autonômica. Este tipo de análise recebeu grande impulso após o estabelecimento da forte e independente relação entre VFC e mortalidade pós-IAM (BIGGER e cols, 1992; KLEIGER e cols, 1987).

Dois métodos são normalmente utilizados para a avaliação da variabilidade cardiovascular. Um explora o domínio de tempo, usando índices estatísticos (tais como, desvio padrão ou variância) extraídos das variações temporais dos ciclos (expressos normalmente em ms) ou dos percentuais de flutuação observados em ciclos adjacentes (KLEIGER e cols, 1987). Outro, no domínio da frequência, define e separa, por meio da

análise espectral, os diversos componentes oscilatórios em frequências e amplitudes distintas (PAGANI e cols, 1986; TASK FORCE, 1996).

Os vários índices propostos para mensuração da VFC no domínio do tempo podem ser derivados de cálculos aritméticos, estatísticos ou geométricos (histograma R-R), que englobam todo o período de gravação ou parte do mesmo (TASK FORCE, 1996). Os índices mais popularizados até o momento, com as suas abreviações conhecidas internacionalmente, são os seguintes:

- RR médio = média de todos os intervalos RR normais;
- SDNN = Desvio padrão de todos os intervalos RR normais;
- SDNNi = Média dos desvios padrões dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos;
- SDANN = Desvio padrão das médias dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos;
- RMSSD = Raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado;
- pNN50 = Percentual de intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos de seu adjacente.

Antes da ampla disponibilidade de microcomputadores potentes, Ewing e cols (EWING e cols, 1985) padronizaram um conjunto de testes para avaliar a integridade do sistema nervoso autônomo (SNA), baseado nas respostas da frequência cardíaca e da pressão arterial a estímulos padronizados. De uma forma geral, os testes que avaliam a variação da frequência cardíaca referem-se à integridade do sistema nervoso parassimpático e os que avaliam a variação da pressão arterial, ao sistema nervoso simpático. Apesar de serem muito usados na prática clínica e em laboratório, ainda há dúvidas quanto à escolha do melhor teste. O significado fisiológico desses índices, quando

calculados por períodos longos de tempo, tem sido estudado basicamente através da correlação com os achados da análise espectral. De uma forma geral, todos eles correlacionam-se com os componentes de alta frequência, mas não permitem distinguir quando as alterações da variabilidade da frequência cardíaca são devidas a aumento do tônus simpático ou a retirada do tônus vagal (RIBEIRO & MORAES, 2005).

O estudo no domínio da frequência ou a análise espectral tem alcançado considerável interesse por ser um método não-invasivo que estima atividade neural e não neural para oscilações a curto e longo prazo da frequência cardíaca (TASK FORCE, 1996).

A análise espectral foi descrita pela primeira vez em 1720, pelo Barão francês Jean Baptiste J. Fourier. Ele demonstrou que os sinais oscilatórios compostos podem ser decompostos em ondas sinusoidais com diferentes amplitudes, fases e frequências (hertz), a partir de uma função matemática por ele descrita, denominada de Função de Fourier. Os algoritmos mais utilizados para a execução da análise espectral são: a transformação rápida de Fourier e a análise autorregressiva. Com esse tipo de análise podemos obter os espectros com suas respectivas potências a partir de bandas de frequência pré-determinadas (TASK FORCE, 1996).

Três principais componentes espectrais, expressos em termos de áreas que integram determinadas faixas de frequências espectrais, foram descobertos em seres humanos. Em relação à variabilidade da frequência cardíaca, um componente inclui as frequências espectrais muito baixas (*very low frequency*: VLF ou MBF < 0,04 Hz), provavelmente relacionado a termo-regulação, ao sistema renina-angiotensina etc. Um segundo componente reúne as frequências espectrais baixas (*low frequency*: LF ou BF = 0,04 a 0,15 Hz), relacionado com a modulação autonômica barorreflexa, refletindo predominantemente modulação simpática. Um terceiro componente, que integra as altas frequências espectrais (*high frequency*: HF ou AF = 0,15 a 0,50 Hz), coincide com o ritmo respiratório, o qual

expressa exclusivamente a influência parassimpática sobre o nodo sinusal, manifestada pela arritmia sinusal respiratória (PAGANI e cols, 1986; AKSELROD e cols, 1981).

A análise espectral também vem sendo muito utilizada em modelos experimentais. Em animais de pequeno porte, como ratos, a banda de HF apresenta oscilações em torno de 0,75 a 3 Hz, a de LF, em torno de 0,20 a 0,75 Hz, e de VLF, abaixo de 0,20 Hz (PAGANI & MALLIANI, 1994).

4. ÓXIDO NÍTRICO E O SISTEMA AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR

Estudos recentes sugerem que o óxido nítrico (“nitric oxide” - NO) endógeno apresenta um importante papel no controle do sistema autonômico cardiovascular. (MARLETTA, 1993)

Estudos experimentais sugerem que o NO atua como um neuromodulador não somente dentro do sistema nervoso central (SNC), mas também dentro de vias autonômicas periféricas, controlando a função cardíaca ao provocar um aumento efetivo no controle parassimpático e uma inibição do controle simpático da frequência cardíaca (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999). Dados morfológicos evidenciaram que até 40% dos nervos cardíacos periféricos intrínsecos expressam NOS neuronal (nNOS) (ARMOUR e cols., 1995), incluindo as terminações nervosas que inervam as regiões dos nós sino-atrial (nó SA) e atrioventricular (nó AV) (KLIMASCHEWSKI e cols., 1992). A NOS endotelial, por sua vez, tem sido identificada dentro de cardiomiócitos do nó SA e em capilares adjacentes (HAN e cols., 1998). O NO gerado nestes sítios autonômicos cardíacos periféricos parecem aumentar não somente a resposta de frequência cardíaca à estimulação nervosa parassimpática vagal (ELVAN e cols., 1997; CONLON & KIDD, 1999; CHOATE e cols., 2001; HERRING & PATERSON, 2001), mas também parecem aumentar o

antagonismo parassimpático das respostas simpáticas cardíacas (atividade simpato-inibitória indireta) (ELVAN e cols., 1997; SEARS e cols., 1998). Além do mais, o NO parece inibir diretamente as respostas cardíacas à estimulação simpática em animais (BALLIGAND, 1999).

Estudos *in vitro* têm ainda mostrado que o NO pode, também, ter efeitos diretos não-neuralmente mediados sobre o nó SA, aumentando a FC via estimulação de correntes de marcapasso I_f (MUSIALEK e cols., 1997). Entretanto, este efeito direto observado *in vitro* parece ser menos importante, uma vez que o mesmo não tem sido descrito na maioria dos estudos realizados *in vivo*, com a inervação autonômica intacta. Assim, qualquer efeito direto do NO sobre o nó SA é sobrepujado pelos efeitos opostos do NO sobre o controle autonômico cardíaco (CHOWDHARY e cols., 2004).

Os efeitos diretos do NO sobre neurônios vagais cardíacos ou sobre cardiomiócitos são mediados pelo GMPc, o qual é sintetizado pela GC, após ser ativada por nitrosilação mediada pelo NO. Os efeitos neuronais e cardíacos do GMPc não são ainda muito bem conhecidos, sendo alvo de intenso estudo recentemente. Estimulação de receptores muscarínicos ativa eNOS ligada a cavéolas em cardiomiócitos (FERON e cols., 1998). A geração de NO resultante provoca uma inibição GMPc-dependente da corrente de entrada lenta de cálcio (I_{Ca-L}), a qual pode mediar, pelo menos parcialmente, a resposta bradicárdica muscarínica. Nenhum efeito do NO sobre correntes de saída de potássio, operadas pela acetilcolina (via muscarínica direta), foi evidenciado até o momento (HAN e cols., 1998). Por outro lado, doadores de NO ou mais especificamente a transfecção gênica adenoviral de NOS neuronal em átrio direito de cobaia foi capaz de aumentar a liberação de GMPc mediada pela acetilcolina de terminações vagais em resposta à estimulação elétrica, sugerindo um eventual efeito pré-sináptico da via NO-GMPc sobre a liberação

neural de acetilcolina no coração (HERRING & PATERSON, 2001; MOHAN e cols., 2002).

Todos os achados descritos acima parecem evidenciar que um aumento da via da L-Arginina-NO-GMPc no coração, poderia levar a um aumento na modulação parassimpática, associada com redução, concomitante, na modulação simpática cardíaca, o que poderia ser de grande benefício na redução de risco cardiovascular, de arritmias cardíacas graves e de morte súbita, no contexto de inúmeras doenças cardiovasculares que cursam com redução da atividade vagal e aumento da atividade simpática cardíaca, como a doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e a hipertensão arterial sistêmica. Várias estratégias de melhoria desta via têm sido estudadas, por exemplo, através de fármacos que provocam uma acentuação da produção do NO, através da suplementação com L-arginina, regulação da produção da NOSe, administração de estrógenos, de vitamina C, e de inibidores da PDE 5, como o sildenafil, o qual aumenta a biodisponibilidade do GMPc (CORBIN & FRANCIS, 1999).

5. SILDENAFIL E O SISTEMA CARDIOVASCULAR

O sildenafil possui efeitos cardiovasculares importantes. Ele age competindo com a PDE-5, levando assim a uma redução da degradação do GMPc, ocorrendo o aumento desse nos tecidos, resultando em vasodilatação e conseqüentemente melhora da disfunção erétil. A PDE-5, responsável pela degradação do GMPc, pode ser encontrada nos corpos cavernosos, na parede das artérias pulmonares e coronárias, na parede das veias sistêmicas, nos músculos esqueléticos, vísceras e músculos traqueobrônquicos, cérebros, retina e plaquetas (RAJA & NAYAK, 2004). Expressão de PDE-5 também tem sido descrita no

músculo cardíaco, embora não especificamente sobre neurônios intrínsecos do coração (DAS e cols., 2005).

O sildenafil possui efeitos cardiovasculares sobre a FC, PA, na circulação pulmonar e coronária, no endotélio, na repolarização cardíaca e sobre a falência crônica cardíaca (RAJA & NAYAK, 2004). Mais recentemente, um efeito cardioprotetor dos inibidores da PDE-5 tem sido descrito no contexto da isquemia cardíaca, através da diminuição da área infartada, melhora da função ventricular esquerda, diminuição da incidência de fibrilação ventricular e diminuição da necrose miocárdica. (KUKREJA e cols., 2003.). O NO pode ser identificado como um mediador essencial nesta ação cardioprotetora. Num evento isquêmico agudo, grande liberação endógena de mediadores como a adenosina e a bradicinina pode ser verificada. Estes mediadores, por sua vez, podem desencadear uma cascata de eventos, através da ação de proteínas quinases, resultando na fosforilação das enzimas NOS e formação de NO. Este, por sua vez, através da estimulação da guanilato-ciclase, induz a um aumento no conteúdo de GMPc intra-celular, o qual ativa a proteína quinase G (PKG). Entre os vários efeitos da PKG, pode ser descrito a ação fosforilante sobre canais de potássio ATP sensíveis mitocondriais, os quais se tornam mais permeáveis, aumentando a capacidade das mitocôndrias em suportar um ambiente hipóxico. Uma vez que as mitocôndrias são responsáveis pela síntese de ATP e manutenção da homeostase de Ca^{+2} , com a abertura desses canais ocorre uma compensação do potencial da membrana mitocondrial, contribuindo para a cardioproteção. O sildenafil e outros inibidores da PDE5 podem potencializar os efeitos do GMPc, desencadeando esta cascata de eventos nos miócitos cardíacos. (KUKREJA e cols., 2003; DAS e cols., 2005).

Os efeitos do sildenafil devido ao aumento de GMPc na musculatura vascular, possui propriedades vasodilatadoras, resultando em hipotensão, alterando tanto a PA sistólica quanto a PA diastólica, além da diminuição da pressão arterial pulmonar, da

resistência vascular pulmonar e da resistência vascular periférica e sistêmica.(BRINDIS & KLONER, 2003)

O efeito vasodilatador do sildenafil é potencializado se associado aos nitratos orgânicos ou às drogas doadoras de NO, pois os mesmos agem na via NO-GMPc, resultando no acúmulo de GMPc, podendo desencadear uma hipotensão fatal.(BRINDIS & KLONER, 2003). Portanto, esta associação pode aumentar o risco cardiovascular de forma importante para eventos isquêmicos e arrítmicos, principalmente no início da terapia ou no uso desta droga durante um longo período. (RAJA & NAYAK, 2004)

A hipoperfusão miocárdica induzida pelo exercício físico ou presença de estenose da artéria coronária é melhorada com o uso do sildenafil, através do aumento do fluxo coronariano. Este aumento do fluxo coronariano em repouso e durante exercícios físicos, sugere modesta ação vasodilatadora na resistência dos vasos coronários (RAJA & NAYAK, 2004).

O sildenafil pode ser utilizado para reverter a disfunção endotelial (DE) (GROSS, 2005). A DE é uma resposta anormal que leva a uma menor biodisponibilidade de NO e debilita a vasodilatação, levando conseqüentemente ao desenvolvimento de aterosclerose e síndromes coronarianas agudas. A diminuição do NO pode afetar a agregação das plaquetas, a inflamação da parede vascular e proliferação das células musculares lisas. Esta droga tem demonstrado melhora do efeito vasomotor da disfunção endotelial em pacientes com falência cardíaca e pacientes com diabetes tipo 2, além de melhorar a agregação plaquetária e aumentar a proliferação de células musculares lisas. Esta melhora na DE, provoca melhora na tolerância aos exercícios físicos em pacientes com falência cardíaca (GROSS, 2005).

Como podem ser atestados acima, inúmeros efeitos cardiovasculares têm sido descritos para o sildenafil. Entretanto, na literatura pouco foi encontrado sobre um eventual

efeito do sildenafil sobre o controle autonômico cardiovascular, seja ele modulatório, reflexo ou tônico. Como a via da L-arginina-NO-GMPc pode modular o controle autonômico cardiovascular e como o sildenafil potencia o GMPc, seria o sildenafil capaz de modificar o controle autonômico cardiovascular durante uma administração aguda do mesmo?

No presente estudo, as alterações hemodinâmicas e autonômicas cardiovasculares foram avaliadas em ratos normotensos da cepa Wistar, os quais foram tratados com uma administração aguda de citrato de sildenafil. Para proceder à avaliação das respostas autonômicas, utilizou-se neste trabalho a avaliação da modulação autonômica por meio de análise espectral da variabilidade da FC e PA, a avaliação do controle barorreflexo da FC e a avaliação do tônus autonômico cardíaco, em ratos normais tratados agudamente com sildenafil.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre o controle autonômico cardiovascular em ratos Wistar normotensos adultos.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre a PA e FC basais, em ratos Wistar normotensos;
- 2.2.2 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre a modulação autonômica cardiovascular, por meio de análise espectral da variabilidade da FC e PA, em ratos Wistar normotensos;
- 2.2.3 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre o controle barorreflexo da FC, por meio da quantificação da sensibilidade barorreflexa espontânea por meio de análise espectral bivariada e por meio de teste farmacológico do barorreflexo, em ratos Wistar normotensos;
- 2.2.4 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre o tônus autonômico cardíaco, por meio de bloqueio farmacológico com atropina e propanolol, em ratos Wistar normotensos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Trinta e um ratos Wistar, machos, com aproximadamente 10-12 semanas de idade (peso aproximado de 250g a 350g), foram empregados em todos os protocolos experimentais do presente estudo. Os animais foram alojados em biotério, com ambiente controlado (temperatura = 23° C, umidade = 40-70%, ciclo claro-escuro = 12h/12h) e tiveram livre acesso à ração e água durante todo o período experimental. Todos os protocolos foram realizados observando-se as normas exigidas pelo Comitê Institucional de Manuseio de Animais de Laboratórios, e o “GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS” editado por “US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH” (NIH publication nº 85 –23, revised 1996).

3.2. Procedimentos cirúrgicos

Após anestesia com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), cânulas de poli-etileno (PE-10 fundido a uma extensão de PE-50) (Clay Adams Brand, Polyethylene Tubing, Becton Dickinson, Sparks, PE 10 e PE 50) foram implantadas na artéria e veia femoral esquerda para permitir o posterior registro da pressão arterial e a administração de drogas, respectivamente. No dia seguinte os animais foram submetidos ao protocolo experimental para avaliação da variabilidade cardiovascular, teste do reflexo barorreceptor e o bloqueio autonômico farmacológico.

3.3. Protocolo experimental

Após canulação dos vasos femorais no dia anterior, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados por computador (Aqdados, Lynx Tecnol. Eletron. Ltda, São Paulo, SP). O sinal de PA foi adquirido usando frequência de amostragem de 1000 Hz. Após 30 minutos de estabilização, um registro contínuo de 15 minutos de pressão arterial pulsátil foi realizado para medir os valores basais de PA e FC. Em seguida iniciou-se o tratamento com sildenafil ou veículo, de acordo com o grupo experimental, continuando-se o registro de PA e FC por mais 30 minutos. Estes dois períodos (15 minutos basais + 30 minutos de tratamento) foram posteriormente processados para posterior avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência (análise espectral) e cálculo do alfa-índice, um índice de sensibilidade barorreflexa espontânea, obtido por meio de análise espectral bivariada.

Ao final dos 30 primeiros minutos de registro pós-tratamento, o teste do reflexo barorreceptor foi realizado pela injeção intravenosa alternada de 2 µg/ Kg e 4 µg/ Kg de fenilefrina e de 8 µg/ Kg e 16 µg/ Kg de nitroprussiato de sódio. Esta seqüência foi repetida de forma aleatória para cada animal. As magnitudes da bradicardia reflexa ou da taquicardia reflexa induzidas, respectivamente, pelas respostas pressora da fenilefrina ou depressora do nitroprussiato de sódio, foram usadas para o cálculo da sensibilidade barorreflexa cardíaca, por meio da quantificação do índice barorreflexo, o qual é igual à razão $\Delta FC/\Delta PAM$, para cada fármaco administrado.

No final do protocolo, sulfato de atropina (4 mg/Kg, i.v.) foi administrada por via intravenosa para o bloqueio da ação parassimpática sobre o coração. Em seguida, 15 minutos depois, cloridrato de propanolol (5mg/Kg, i.v.) foi administrado para bloquear o

sistema simpático e um registro de mais 15 minutos foi feito. Em metade dos animais, para cada grupo experimental, a ordem de bloqueio autonômico foi invertida, ou seja, propanolol foi administrado antes da atropina.

3.4. Grupos experimentais

No presente trabalho dois grupos experimentais foram estudados:

- Grupo tratado com citrato de sildenafil, n=18, (1mg/Kg, i.v., bolus seguido de infusão contínua a 1mg/Kg/h, i.v.)
- Grupo tratado com veículo, n=13, (1ml/kg de SF a 0,9% i.v., bolus seguido de infusão contínua de SF a 0,9% a 1mL/Kg/h, i.v.)

A dose de sildenafil empregada no presente estudo (1mg/kg/bolus + 1mg/kg/h/infusão i.v.) é comumente utilizada em estudos em ratos e determina concentrações plasmáticas similares àquelas observadas em sere humanos após uso agudo por via oral (WALKER e cols., 1999). Além da administração em bolus, uma infusão contínua foi realizada a fim de prolongar os efeitos do sildenafil por um tempo necessário à execução do protocolo experimental. O volume de salina injetado, cerca de ~1mL total, para um rato de ~300gr, não traz repercussões hemodinâmicas e autonômicas significativas.

3.5. Análise dos dados

Os valores médios de FC e de PA sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) foram calculados para o período basal de 15 minutos e para o período pós-tratamento de 30 minutos de registro. Com o objetivo de se avaliar a evolução temporal da resposta ao sildenafil, os valores médios de FC e de PA sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram também calculados a intervalos fixos de cinco minutos para o período basal de 15 minutos e para o período pós-tratamento de 30 minutos de registro.

Para o estudo da variabilidade cardiovascular, o sinal de PA, continuamente registrado ao longo do protocolo, foi processado por software (Software PRE 24, gentilmente cedido por Eng. Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália) de modo a gerar séries temporais batimento-a-batimento de intervalo de pulso (IP), PAS e PAD. A variância dos valores de IP, PAS e PAD dentro do período basal e nos 30 minutos pós-tratamento foi tomada como um índice de variabilidade no domínio do tempo.

A variabilidade do IP, PAS e PAD foi também avaliada no domínio da frequência, empregando-se o método de análise espectral autoregressivo. Os procedimentos teóricos e analíticos estão completamente descritos em publicações prévias (MALLIANI, 1986, 1991; TASK FORCE, 1996). Brevemente, séries temporais batimento a batimento de IP, PAS e PAD, coletadas durante os 15 minutos de registro basal e 30 minutos de registro pós-tratamento, foram divididas em segmentos seriados de 300 batimento, sendo que todo segmento sucessivo sobrepunha-se em 50% (100 batimentos) no segmento anterior (método de Welch). Usando segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autoregressivos foram estimados através do método de Levinson-Durbin e a ordem do modelo foi escolhida de acordo com o critério de Akaike. Em seguida, sobre cada segmento estacionário individual de 300 batimentos, a decomposição espectral foi realizada mediante uso de software apropriado (software LA24, gentilmente cedido pelo engenheiro Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália). Este procedimento permite

automaticamente quantificar a frequência central e a potência de cada componente espectral relevante em unidades absolutas, bem como em unidades normalizadas. O procedimento de normalização, aplicado apenas à variabilidade do iRR, foi realizado pela divisão da potência do componente de baixa frequência (low frequency – LF; 0,20-0.80 Hz) ou de alta frequência (high frequency – HF; 0.80 –3.00 Hz) pela potência espectral total, da qual se subtrai a potência da banda de muito baixa frequência (very low frequency – VLF, 0.01-0.20 Hz), multiplicando-se o resultado por 100 (MALLIANI, 1986, 1991; TASK FORCE, 1996). Gráficos espectrais sequencias (tempo x frequência) de cada animal, compostos pelos espectros dos segmentos estacionários de 300 batimentos foram visualizados por meio de gráficos de contorno de densidade espectral coloridos. Os parâmetros espectrais obtidos para cada segmento estacionário individual de 300 batimentos foram medidos e valores médios resultantes para os 15 minutos basais e 30 minutos pós-tratamento foram obtidos para cada animal.

Para a avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea do controle da FC, um modelo matemático baseado na análise espectral autorregressiva bivariada (análise espectral cruzada) foi aplicado a ambas as series temporais de variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS), conforme descrito na literatura (DEBOER e cols., 1987; PAGANI e cols., 1988; RUBINI e cols., 1993). Com o uso desta abordagem, quantificou-se a coerência entre os sinais, a qual descreve a relação linear entre as variabilidades do IP e da PAS em cada frequência de oscilação e apresenta valores variando entre 0 (nenhuma relação linear) e 1 (relação linear máxima) e o desvio de fase (expresso em radianos), o qual estima o retardo de tempo entre os dois sinais nas diversas bandas de frequência espectral (bandas de baixa-LF e alta-HF frequências) (DEBOER e cols., 1987; PAGANI e cols., 1988; RUBINI e cols., 1993). Baseado em estudos prévios (PAGANI e cols., 1988; RUBINI e cols., 1993), a sensibilidade barorreflexa espontânea

foi quantificada como o alfa-índice, ou seja, a raiz quadrada da razão entre as potências espectrais do IP e da PAS na banda de baixa frequência (LF), desde de que nesta mesma banda a coerência fosse maior que 0.5 e o desvio de fase fosse menor que zero radianos (PAGANI e cols., 1988; RUBINI e cols., 1993).

As sensibilidades barorreflexas foram também calculadas a partir de variações da FC e PAM farmacologicamente induzidas por fenilefrina e nitroprussiato de sódio, de acordo com método amplamente usado, mediante o cálculo da razão entre as alterações reflexas na FC provocadas por alterações na PA induzidas pela fenilefrina (vasoconstritor, agonista α_1 -adrenérgico) e nitroprussiato de sódio (vasodilatador, doador espontâneo de óxido nítrico). As razões foram tomadas como estimativas da sensibilidade barorreflexa tanto na bradicardia quanto na taquicardia reflexa (FARAH e cols., 1999).

Para o estudo do controle autonômico tônico do coração e o cálculo da frequência intrínseca de marcapasso cardíaco (FIMC) foi realizado o duplo bloqueio autonômico sequencial com propanolol (5mg/Kg, i.v.) e atropina (4mg/Kg, i.v.) para verificar respectivamente o efeito do tônus simpático e parassimpático. Atropina e propanolol foram usados, respectivamente, para bloquear as influências parassimpáticas e simpáticas sobre a FC. Após um registro basal de 05 minutos, atropina foi injetada pela via venosa e a FC registrada por 15 minutos para o cálculo do efeito parassimpático. Após os 15 minutos, propanolol foi injetado e a FC foi registrada por mais 15 minutos, para determinação da frequência intrínseca de marcapasso cardíaco. Esta sequência de bloqueio autonômico foi realizada em cerca de metade dos animais de cada grupo experimental. A administração em sequência reversa, ou seja, propanolol seguida de atropina foi realizada na outra metade dos animais de cada grupo com o objetivo de se calcular, à semelhança da sequência anterior, o efeito simpático sobre a FC e a FIMC. Uma vez calculada a FIMC, pode-se adicionalmente calcular o índice simpato-vagal cardíaco, que nada mais é do que a razão

entre a FC basal dividida pela FIMC. Um $ISV > 1$ significa um predomínio do tônus simpático sobre o parassimpático, e um $ISV < 1$ reflete um tônus vagal preponderante sobre o simpático. A efetividade do bloqueio simpático e parassimpático foi avaliada pela ausência de bradicardia reflexa após a elevação da PA pela injeção de fenilefrina e pela ausência de taquicardia reflexa após a queda da PA pela injeção de NPS, respectivamente.

3.6. Análise estatística

Os valores amostrais, em cada grupo, apresentando distribuição normal e variância homogênea, foram considerados paramétricos e expressos como média \pm erro padrão da média. A comparação entre os grupos neste caso foi realizada empregando-se o teste t “Student” para medidas independentes ou teste t “Student” pareado, quando apropriado. Para as respostas médias de IP, PAS e PAD a cada 5 minutos durante o período basal e pós-tratamento, uma ANOVA de dois fatores (tratamento x tempo) para medidas repetidas (fator tempo), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizada. Se os valores amostrais não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade da variância, eles foram comparados entre si pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ou de Wilcoxon, quando apropriado.

As diferenças entre as comparações efetuadas foram consideradas estatisticamente significantes quando as probabilidades de ocorrências casuais mostraram-se menores ou iguais a 5% ($p < 0,05$).

Todos os testes estatísticos foram realizados empregando-se o software Sigmastat 2.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

Os animais apresentaram pesos corporais similares no momento do experimento (± 295 g no grupo sildenafil e ± 287 g no grupo controle), ($P=NS$).

Os valores basais iniciais (\pm EPM) da frequência cardíaca e das pressões arteriais sistólica, diastólica e média são mostrados na tabela 1. Note que antes do tratamento, os valores hemodinâmicos basais foram semelhantes nos dois grupos.

Tabela 1: Valores basais médios (\pm epm) da frequência cardíaca e pressões arteriais sistólica, diastólica e média, medidos nos 15 minutos basais prévios ao tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).

	Controle (n=13)	Sildenafil (n=18)	<i>P</i>
FC (bpm)	319,9 \pm 11,1	324,9 \pm 7,7	NS
PAS (mmHg)	126,9 \pm 2,9	130,4 \pm 2,7	NS
PAD (mmHg)	83,5 \pm 2,6	88,0 \pm 1,9	NS
PAM (mmHg)	97,9 \pm 2,1	102,2 \pm 2,0	NS

FC = Frequência cardíaca; PAS = Pressão arterial sistólica; PAD = Pressão arterial diastólica e PAM = Pressão arterial média. NS = Não significativo

Os valores médios (\pm EPM) da frequência cardíaca e intervalo de pulso, bem como dos parâmetros de variabilidade no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência (análise espectral), antes (15 minutos basais) e depois do tratamento com veículo (controle) ou sildenafil, são mostrados na tabela 2. Note que o tratamento com veículo (grupo controle) não provocou nenhuma modificação nos valores de FC e IP (Figuras 1 e 2), bem como nos valores de variabilidade da FC, seja no domínio do tempo ou da frequência (Tabela 2 e Figura 3). Por outro lado, o tratamento com sildenafil

provocou uma leve, porém significativa taquicardia (Figuras 1 e 2), entretanto não acompanhada de modificações nos parâmetros de variabilidade da FC (Tabela 2 e Figura 4).

Tabela 2: Valores médios (\pm epm) da frequência cardíaca, intervalo de pulso, variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade do intervalo de pulso (IP) antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).

	Controle (n=13)		Sildenafil (n=18)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
FC (bpm)	319,9 \pm 11,1	327,3 \pm 9,4	324,9 \pm 7,7	354,8 \pm 8,7*
IP (ms)	189,8 \pm 5,6	184,9 \pm 4,8	186,2 \pm 3,8	170,6 \pm 3,6*
Variância (ms²)	24,5 \pm 5,8	22,3 \pm 6,3	21,9 \pm 4,2	19,9 \pm 4,9
VLF (ms²)	14,9 \pm 3,4	13,9 \pm 4,1	13,6 \pm 2,6	10,2 \pm 2,1
LF (ms²)	2,1 \pm 0,9	2,6 \pm 1,2	2,4 \pm 0,7	2,8 \pm 0,8
LF (nu)	14,6 \pm 2,8	15,2 \pm 3,7	18,3 \pm 3,0	18,6 \pm 2,7
HF (ms²)	7,4 \pm 1,7	5,8 \pm 1,4	5,9 \pm 1,2	6,8 \pm 2,3
HF (nu)	84,7 \pm 2,7	83,9 \pm 3,7	81,0 \pm 3,2	79,0 \pm 2,8
LF/HF	0,28 \pm 0,07	0,36 \pm 0,13	0,37 \pm 0,08	0,46 \pm 0,09

FC = Frequência cardíaca; IP = Intervalo de Pulso; VLF = Componente de muito baixa frequência; LF = Componente de baixa frequência; LF (nu) = Componente de baixa frequência normalizado; HF = Componente de alta frequência; HF (nu) = Componente de alta frequência normalizado, * P < 0,05 em relação ao período antes do tratamento no grupo sildenafil.

Os valores médios (\pm EPM) da pressão arterial sistólica e diastólica, bem como dos parâmetros de variabilidade no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência (análise espectral) antes (15 minutos basais) e depois do tratamento com veículo (controle) ou sildenafil são mostrados nas tabelas 3 e 4. Note que o tratamento com veículo (grupo controle) não provocou nenhuma modificação na PAS e PAD (Tabelas 3 e 4 e Figuras 1 e

2), bem como nos valores de variabilidade da PAS e PAD, seja no domínio do tempo ou da frequência (Tabela 3 e 4 e Figura 3). Por outro lado, o tratamento com sildenafil provocou uma leve, porém significativa hipotensão arterial (Tabelas 3 e 4 e Figuras 1 e 2), entretanto, não acompanhada de modificações nos parâmetros de variabilidade da PAS e PAD (Tabelas 3 e 4 e Figura 4). A evolução dos parâmetros hemodinâmicos medidos a cada 5 minutos mostrou que a taquicardia é mais intensa nos primeiros 10-15 minutos e que a leve hipotensão decorreu, principalmente, de uma redução da pressão diastólica (Figura 2).

Tabela 3: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial sistólica (PAS), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAS antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).

	Controle (n=13)		Sildenafil (n=18)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
PAS (mmHg)	126,9 \pm 2,9	124,0 \pm 2,7	130,4 \pm 2,7	125,4 \pm 3,1*
Variância (mmHg²)	20,9 \pm 3,4	19,0 \pm 4,4	19,8 \pm 3,2	16,5 \pm 2,4
VLF (mmHg²)	9,2 \pm 1,6	7,2 \pm 1,3	9,2 \pm 2,0	5,8 \pm 0,8
LF (mmHg²)	6,8 \pm 1,2	7,9 \pm 1,2	8,0 \pm 1,6	7,5 \pm 1,5
HF (mmHg²)	4,9 \pm 2,2	4,0 \pm 2,2	2,5 \pm 0,5	3,1 \pm 0,8
LF/HF	3,8 \pm 1,0	4,6 \pm 0,8	4,2 \pm 0,5	3,7 \pm 0,5

PAS = Pressão arterial sistólica; VLF = Componente de muito baixa frequência; LF = Componente de baixa frequência; HF = Componente de alta frequência; * P < 0,05 em relação ao período antes do tratamento no grupo sildenafil

Tabela 4: Valores médios (\pm epm) da pressão arterial diastólica (PAD), variância e dos componentes espectrais VLF, LF e HF da variabilidade da PAD antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).

	Controle (n=13)		Sildenafil (n=18)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
PAD (mmHg)	83,5 \pm 2,6	82,8 \pm 2,2	88,0 \pm 1,9	83,2 \pm 1,9*
Variância (mmHg²)	13,7 \pm 1,5	12,3 \pm 1,6	13,8 \pm 1,7	12,0 \pm 1,8
VLF (mmHg²)	6,7 \pm 0,9	5,4 \pm 0,9	6,6 \pm 1,0	4,8 \pm 0,6
LF (mmHg²)	4,8 \pm 0,8	5,1 \pm 0,9	5,6 \pm 1,1	5,6 \pm 1,0
HF (mmHg²)	2,0 \pm 0,3	1,7 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3
LF/HF	2,6 \pm 0,4	3,9 \pm 0,6	4,5 \pm 0,6	4,4 \pm 0,4

PAD = Pressão arterial diastólica; VLF = Componente de muito baixa frequência; LF = Componente de baixa frequência; HF = Componente de alta frequência; * P < 0,05 em relação ao período antes do tratamento no grupo sildenafil.

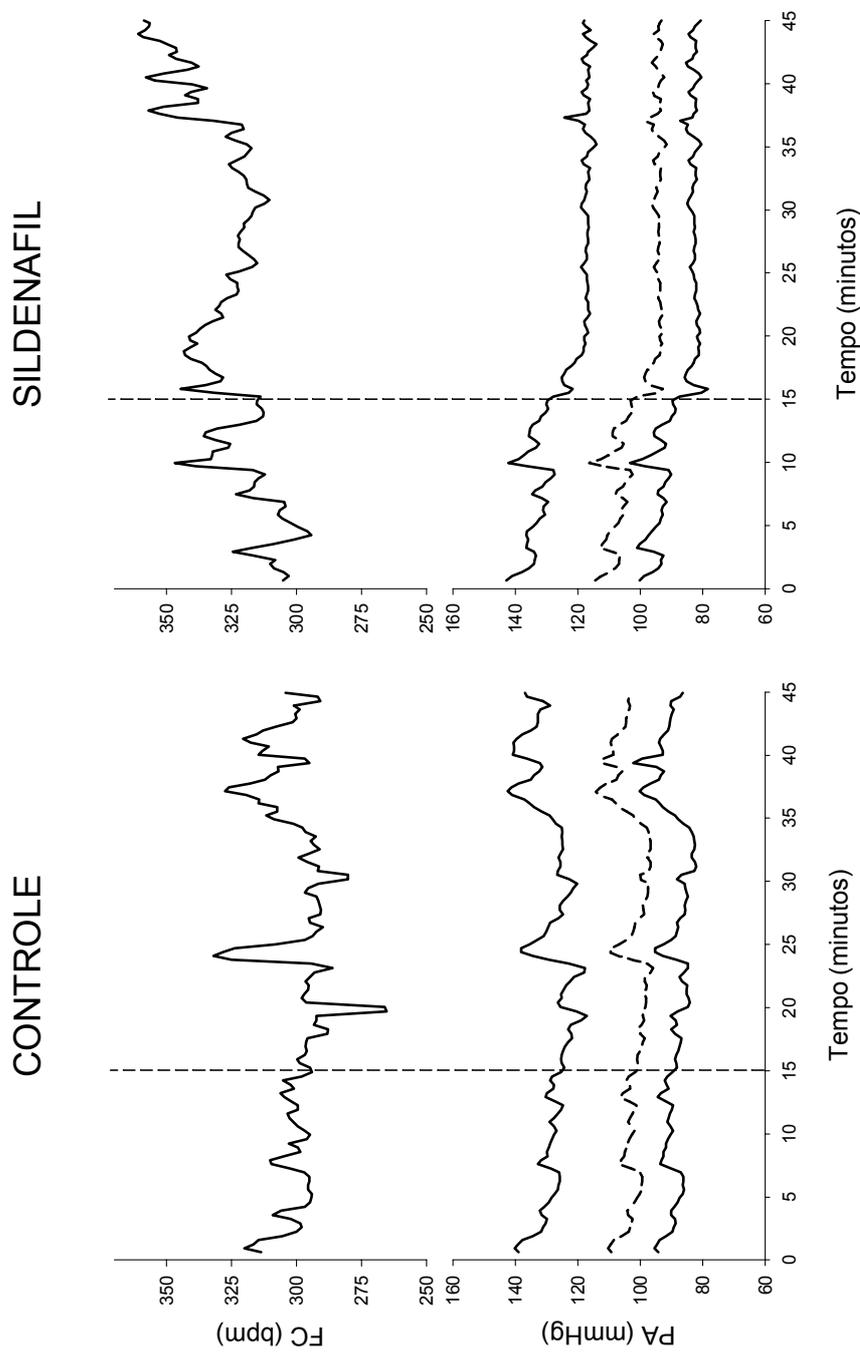


Figura 1: Perfil de resposta da FC e PA durante o tratamento com veículo (controle) ou sildenafil em dois animais representativos dos dois grupos experimentais. Note o aumento da FC e a redução da PA no animal que recebeu sildenafil após 15 minutos de registro basal. A linha tracejada vertical, em ambos os gráficos, representa o início do tratamento; Linhas contínuas no gráfico de PA representam as pressões sistólica e diastólica e a linha tracejada, a pressão arterial média.

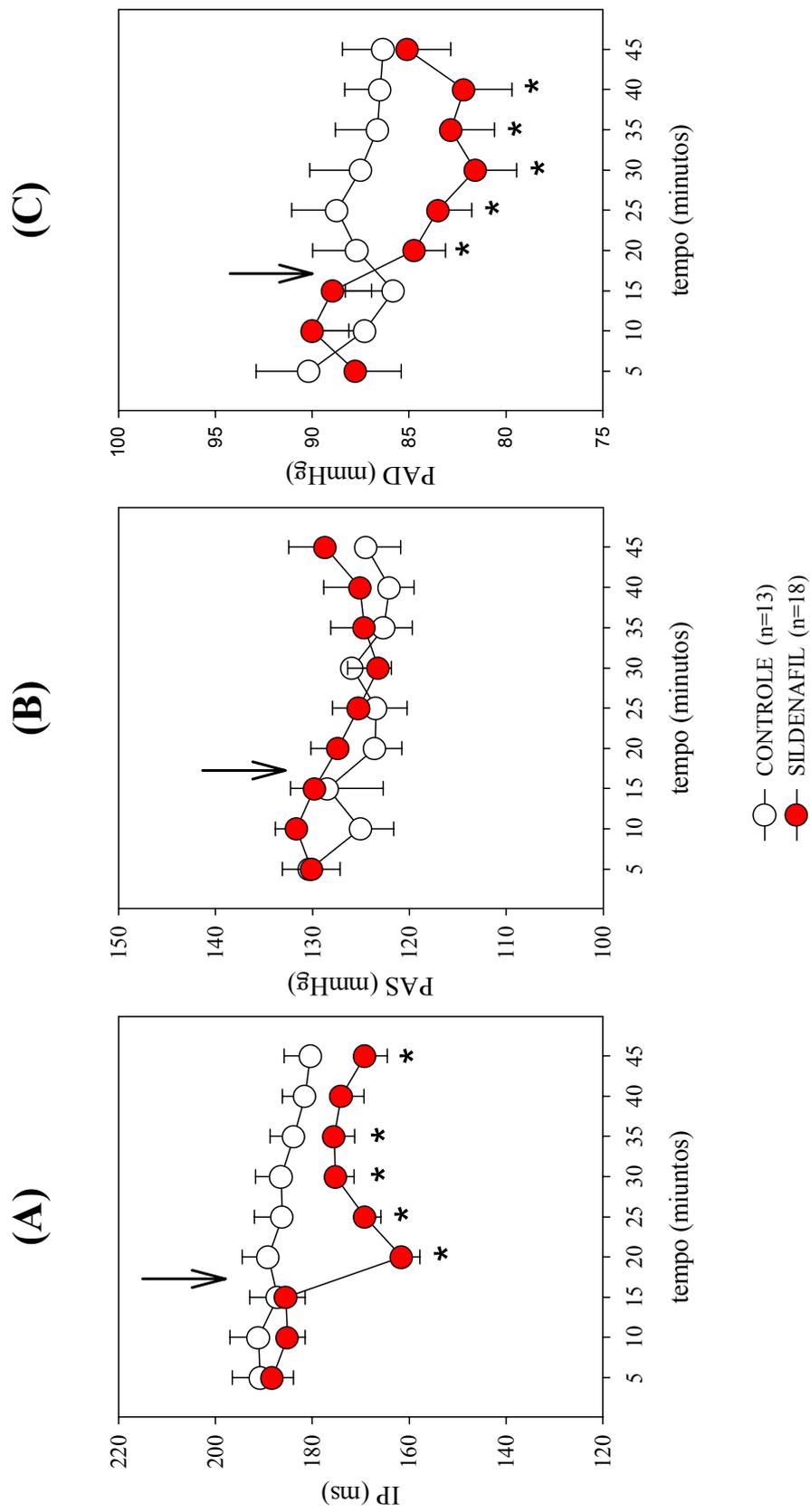


Figura 2: Evolução temporal das respostas do intervalo de pulso (IP) (Painel A), pressão arterial sistólica (PAS) (Painel B) e diastólica (PAD) (Painel C), medidas a cada 5 minutos durante o tratamento com veículo (controle) ou sildenafil nos dois grupos experimentais. Note a taquicardia (queda do IP) e a redução da PAD nos animais que receberam sildenafil após 15 minutos de registro basal. Note ainda a recuperação parcial da taquicardia após 15-20 minutos do início do tratamento. Setas verticais marcam o início do tratamento.

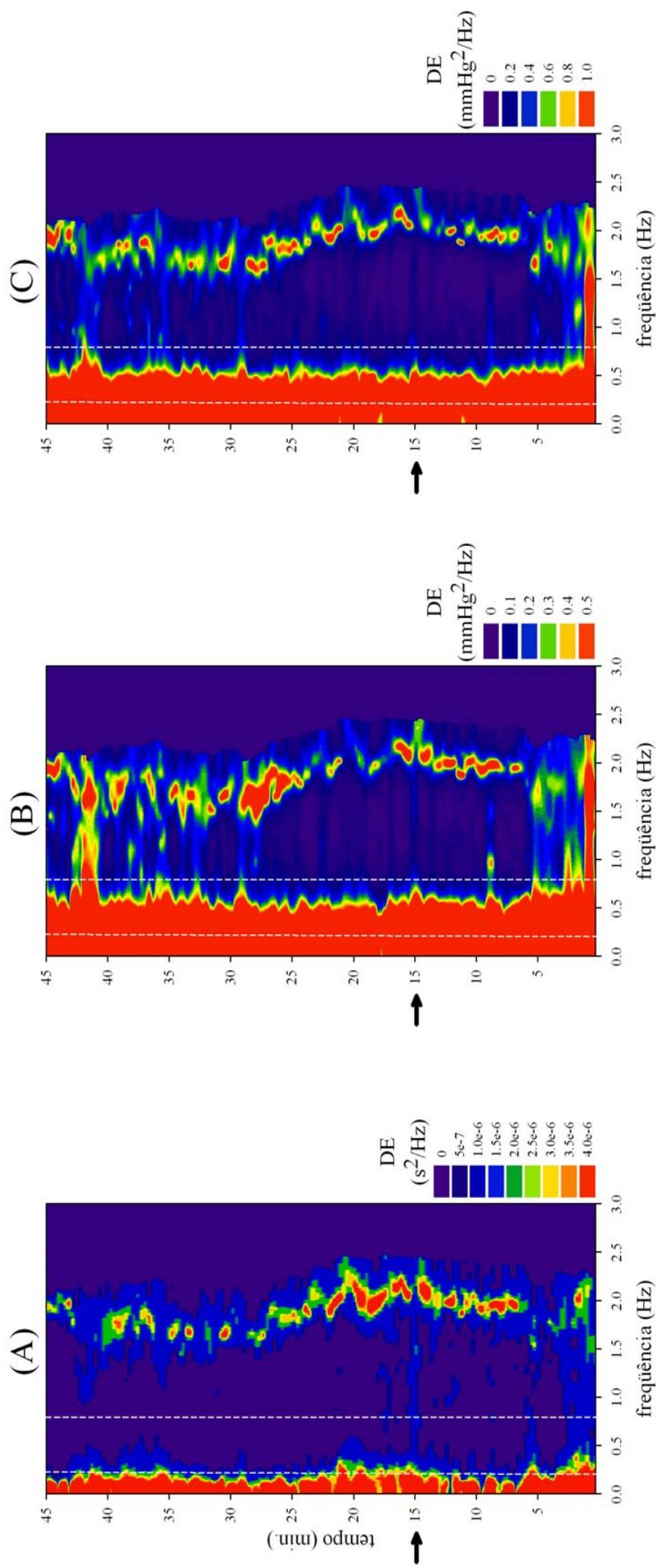


Figura 3: Gráficos de contorno de densidade espectral coloridos mostrando espectros sequenciais (tempo x frequência) do intervalo de pulso (Painel A) e da pressão arterial sistólica (Painel B) e diastólica (Painel C) de um animal representativo do grupo controle. Setas horizontais em cada painel representam o início da administração de solução salina. Note que nenhuma modificação significativa foi notada nos perfis espectrais. Linhas tracejadas claras dentro de cada painel delimitam as bandas de muito baixa (VLF), baixa (LF) e alta frequência (HF) (da esquerda para a direita de cada painel, respectivamente). Legendas coloridas indicam os valores graduados por cores das densidades espectrais calculadas.

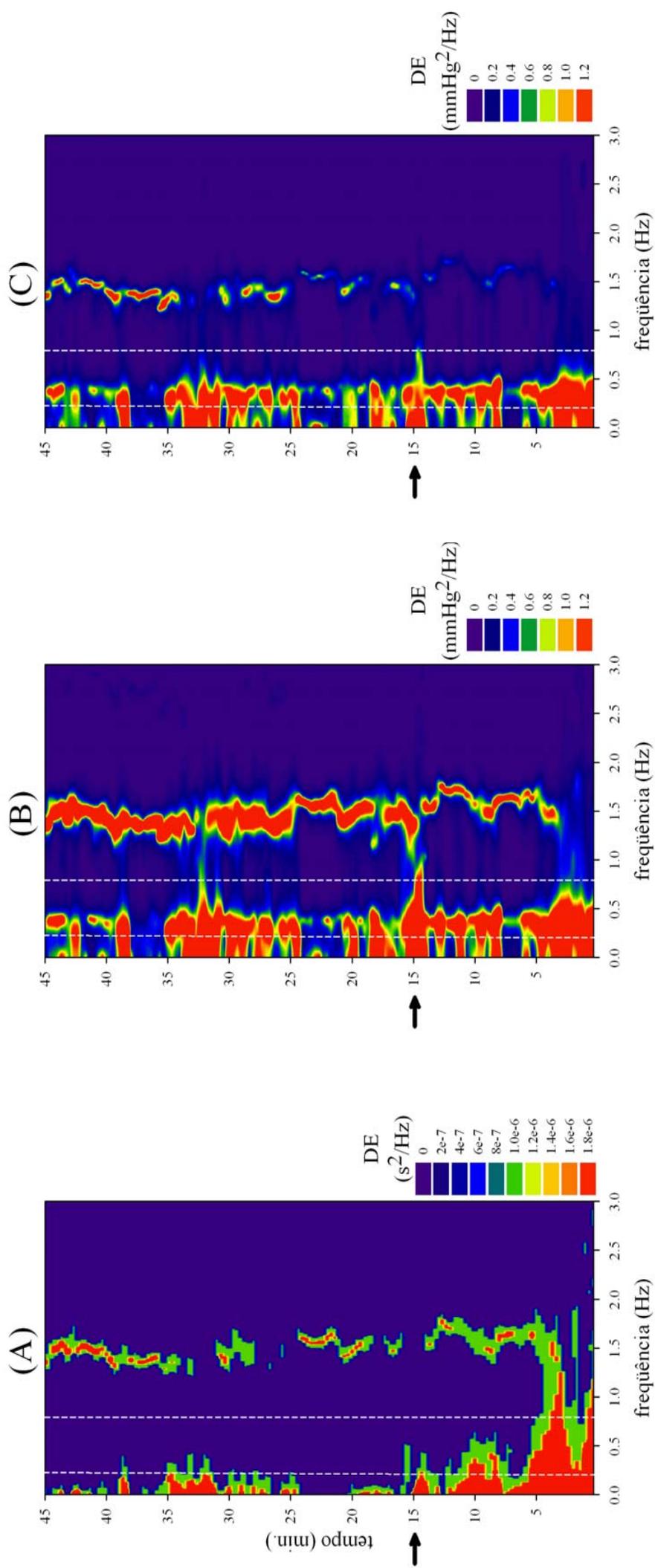


Figura 4: Gráficos de contorno de densidade espectral coloridos mostrando espectros sequenciais (tempo x frequência) do intervalo de pulso (Painel A) e da pressão arterial sistólica (Painel B) e diastólica (Painel C) de um animal representativo do grupo sildenafil. Setas horizontais em cada painel representam o início da administração de sildenafil. Note que nenhuma modificação significativa foi notada nos perfis espectrais. Linhas tracejadas claras dentro de cada painel delimitam as bandas de muito baixa (VLF), baixa (LF) e alta frequência (HF) (da esquerda para a direita de cada painel, respectivamente). Legendas coloridas indicam os valores graduados por cores das densidades espectrais calculadas.

O controle barorreflexo cardíaco, avaliado pelo alfa-índice pode ser observado na tabela 5. Somente séries temporais de IP e PAS que apresentaram, à análise espectral bivariada, correlação acima de 0,5 e desvio de fase negativo, foram incluídas no cálculo do alfa-índice (Figura 5). Note que este índice não sofreu modificações após a administração de salina e nem com o tratamento com sildenafil (tabela 5). Ganho das respostas de bradicardia e taquicardia reflexas à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio, pode ser observado na tabela 5 e na figura 2, onde pode-se verificar que o tratamento com sildenafil não foi capaz de modificar o controle barorreflexo da FC.

Tabela 5: Valores médios (\pm epm) do alfa-índice, um índice de sensibilidade barorreflexa espontânea, calculados para a banda LF das oscilações de IP e PAS antes e depois do tratamento nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil).

	Controle		Sildenafil	
	(n=13)		(n=18)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
Alfa-índice (ms/mmHg)	0,49 \pm 0,09	0,43 \pm 0,08	0,53 \pm 0,07	0,53 \pm 0,07

ms = milisegundos; mmHg = milímetros de mercúrio.

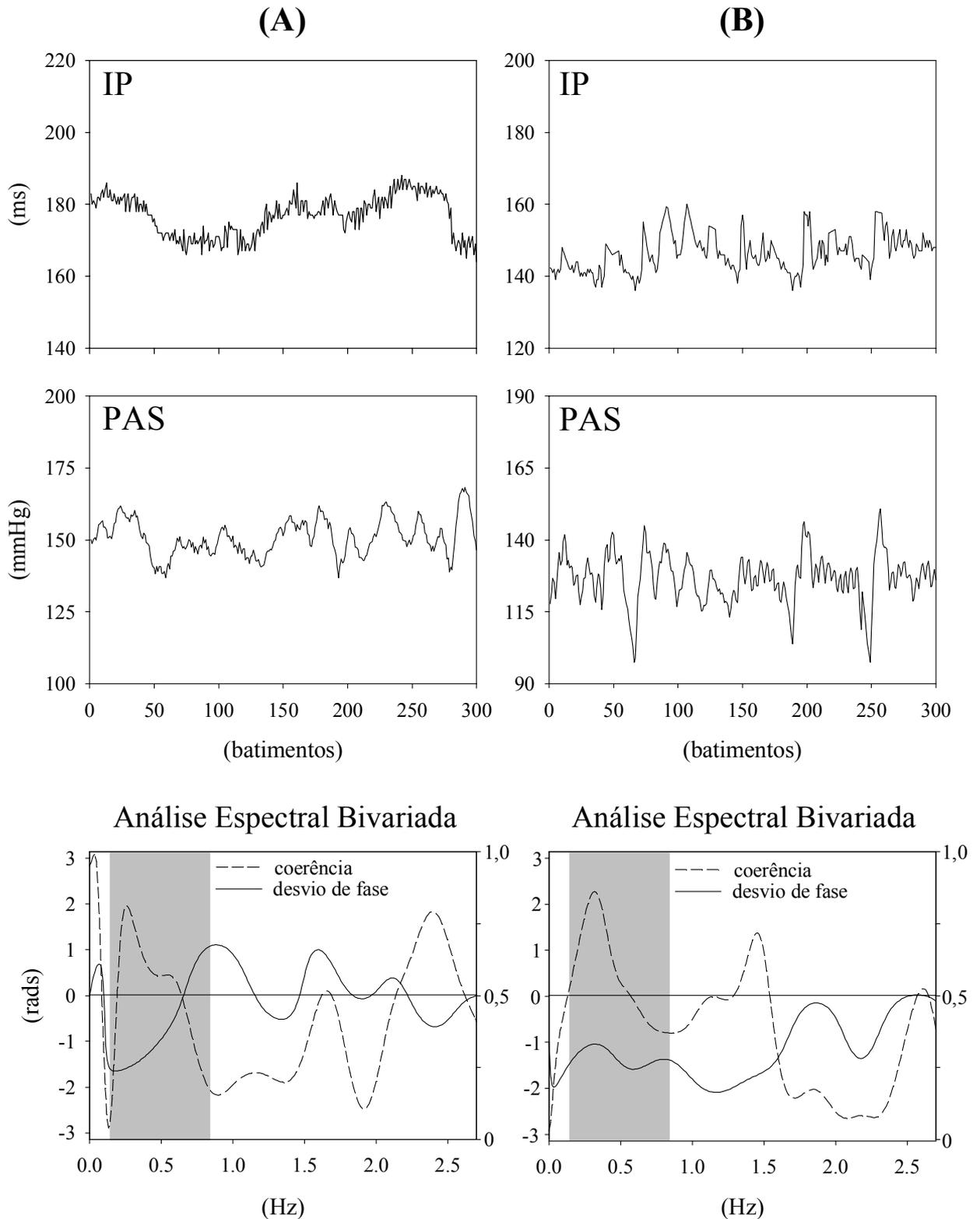


Figura 5: Séries temporais de IP e PAS, bem como gráficos espectrais de coerência e desvio de fase de um trecho de 300 batimentos coletados após o tratamento, de animal representativo do grupo controle (Painel A) e de um animal representativo do grupo sildenafil (Painel B). Área hachurada nos gráficos espectrais representam a região da banda LF, onde as coerências e desvios de fases são avaliados. Note que neste região, picos coerentes aparecem com simultâneos desvios de fase negativos, indicando a origem baroreflexa da relação entre IP e PAS.

O controle barorreflexo cardíaco, avaliado pelo ganho das respostas de bradicardia e taquicardia reflexas à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio, pode ser observado na tabela 6 e Figura 6, onde pode-se verificar que o tratamento com sildenafil não foi capaz de modificar o controle barorreflexo da FC.

Tabela 6: Valores médios (\pm epm) do ganho da bradicardia e taquicardia reflexa nos grupos controle (Con) e sildenafil (Sil).

	Controle	Sildenafil	<i>P</i>
Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	-1,45 \pm 0,27	-1,86 \pm 0,25	NS
Ganho taquicardia (bpm/mmHg)	-3,55 \pm 0,54	-3,58 \pm 0,52	NS

NS = não significativo.

Em relação ao tônus autonômico, avaliado pelo bloqueio farmacológico com atropina e propanolol, a tabela 7 mostra os valores basais da FC antes do duplo bloqueio autonômico e os valores da FC intrínseca, bem como os valores dos efeitos vagal e simpático, uma medida do balanço tônico do vago e simpático cardíacos. Pode-se notar uma queda do efeito vagal no grupo tratado com sildenafil. Isto é confirmado pelo aumento significativo do índice simpato-vagal (ISV) nos animais tratados com sildenafil. Em adição, o tratamento com sildenafil, não modificou a FIMC.

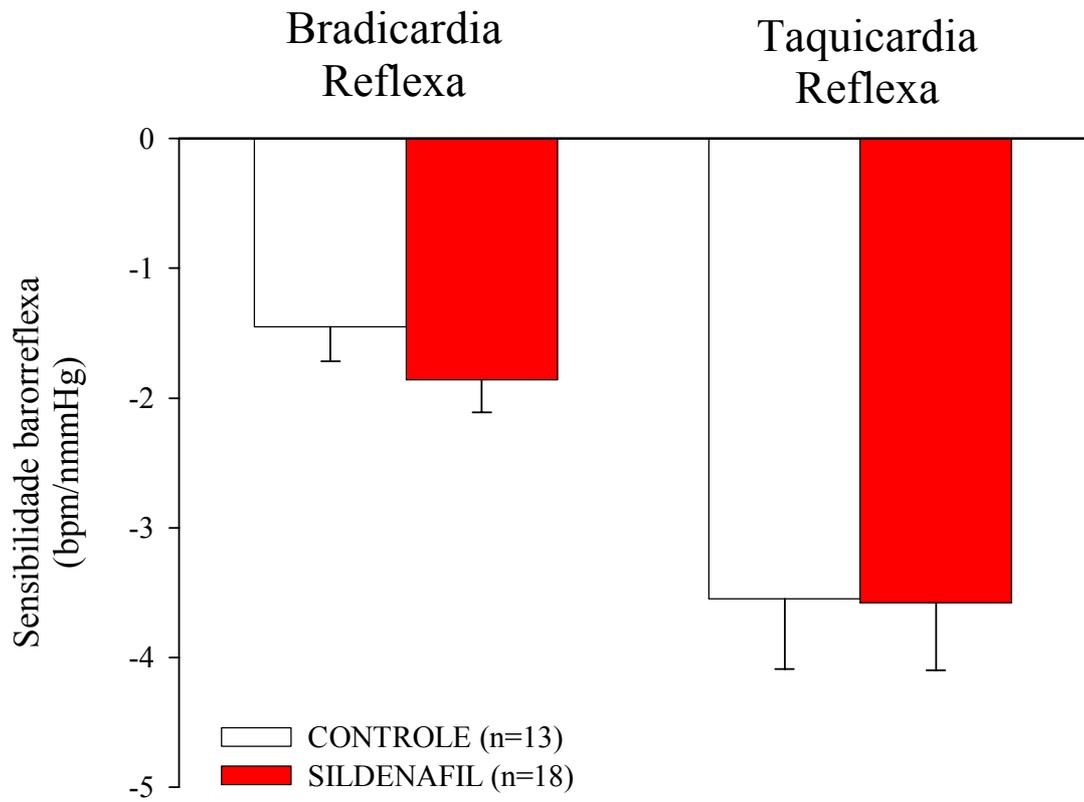


Figura 6: Índices de sensibilidade barorreflexa obtidos a partir das razões entre variações da FC induzidas por alterações da PAM causadas por fenilefrina (bradicardia reflexa) e nitroprussiato de sódio (taquicardia reflexa). Os valores das barras verticais representam os valores médios (\pm epm) dos ganhos barorreflexos para a bradicardia e taquicardia reflexa em ambos os grupos experimentais.

Tabela 7: Valores médios (\pm epm) do controle autonômico tônico da FC representados pelos efeitos vagal e-simpático nos grupos controle (Con) e tratado com sildenafil (Sil). Após o duplo bloqueio foi também quantificada a frequência intrínseca de marcapasso (FIMC) e o índice simpato-vagal (ISV).

	Controle	Sildenafil	P
ANTES DUPLO BLOQUEIO			
	(n=11)	(n=18)	
FC basal	329,9 \pm 10,9	354,8 \pm 8,7	0,041
BLOQUEIO AUTONÔMICO			
ATROPINA \rightarrow PROPANOLOL			
	(n=5)	(n=9)	
FC antes	306,6 \pm 3,3	364,5 \pm 15,1*	0,003
FC após atropina	426,6 \pm 15,5	428,7 \pm 13,4	NS
Efeito Vagal	120,0 \pm 15,1	64,2 \pm 9,6*	0,007
BLOQUEIO AUTONÔMICO			
PROPANOLOL \rightarrow ATROPINA			
	(n=6)	(n=9)	
FC antes	349,3 \pm 16,2	345,1 \pm 9,4	NS
FC após propanolol	326,4 \pm 15,2	308,3 \pm 4,1	NS
Efeito Simpático	-22,9 \pm 19,5	-39,2 \pm 7,5	NS
APÓS DUPLO BLOQUEIO			
	(n=11)	(n=18)	
FIMC (bpm)	394,9 \pm 6,1	381,7 \pm 8,4	NS
ISV	0,84 \pm 0,03	0,94 \pm 0,04*	0,024

FC = Frequência Cardíaca; FIMC = Frequência Intrínseca de Marcapasso Cardíaco; ISV = Índice Simpático Vagal Cardíaco; * P < 0,05 em relação ao grupo controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O principal propósito do presente estudo foi o de caracterizar a variabilidade da FC (intervalo de pulso) e da PA, por meio da análise de variabilidade no domínio do tempo (determinação da variância) e no domínio da frequência (através da análise espectral), bem como o controle barorreflexo e tônico da FC, em ratos normotensos tratados agudamente com o citrato de sildenafil. Embora amplamente estudados, principalmente em seres humanos, quanto aos vários aspectos relacionados à farmacodinâmica e farmacocinética, os efeitos deste fármaco têm sido muito pouco investigado sobre o controle autonômico cardiovascular e em especial sobre a variabilidade cardiovascular.

O estudo da variabilidade cardiovascular em seres humanos, por exemplo, em portadores de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), tem revelado um enorme potencial dos parâmetros de variabilidade como marcadores de risco de eventos arrítmicos graves e de mortes cardíacas associadas à ICC. Porém, as razões que expliquem a reconhecida habilidade destes marcadores de risco são muito pouco entendidas. Assim sendo, a caracterização das alterações na variabilidade cardiovascular, após o tratamento com sildenafil no modelo animal do rato, seria de grande valor no entendimento dos mecanismos responsáveis pela variabilidade cardiovascular no contexto do uso do sildenafil no tratamento da disfunção erétil.

Os principais achados do presente estudo são que o tratamento agudo com citrato de sildenafil em ratos normotensos provoca diminuição leve, porém, significativa da PA, acompanhada de uma discreta elevação da FC, a qual é dependente de uma redução do efeito do sistema nervoso parassimpático vagal e de uma tendência de aumento do efeito do sistema nervoso simpático sobre o coração, como comprovado pelo estudo de bloqueio farmacológico com atropina e propanolol. Apesar da redução do efeito parassimpático

tônico cardíaco induzido pelo sildenafil, estas alterações não foram acompanhadas de modificações na variabilidade cardiovascular e no controle barorreflexo da FC.

O efeito vasodilatador do citrato de sildenafil é comprovado pela diminuição da PA, conforme encontrado na literatura (PICCIRILLO e cols., 2002; VARDI e cols., 2002; OCKAILI e cols., 2002; BRINDIS & KLONER, 2003; REFFELMANN & KLONER, 2003). Esta droga atua na via NO-GMPc, onde compete com a enzima PDE-5, impedindo a degradação do GMPc (CORBIN & FRANCIS, 1999). Sob a ação do NO e a inibição da PDE-5 com o sildenafil, observa-se um acúmulo do GMPc, o qual via ativação da proteína quinase G (PKG), inicia uma cascata de eventos de fosforilação, que culminam no relaxamento do músculo liso vascular e na consequente vasodilatação (CORBIN & FRANCIS, 1999).

Vários estudos em seres humanos comprovam a ação do sildenafil em diminuir a PAM, tanto sistólica quanto diastólica, associada à diminuição da resistência vascular sistêmica, *in vivo*, com a administração de doses endovenosas de 20, 40 e 80mg. Em pacientes com doença da artéria coronária, o sildenafil pode causar pequena, mas significativa, diminuição da pressão arterial sistêmica e pulmonar, não alterando a pressão dos capilares pulmonares, e não alterando a FC. Seu efeito vasodilatador é também observado nos vasos coronários, regulando o fluxo sanguíneo coronariano, sendo que a resposta da resistência vascular coronária à acetilcolina e ao verapamil não foi alterada pelo sildenafil. Porém, a ação vasodilatadora do sildenafil no leito coronário foi aumentada pela nitroglicerina (BRINDIS & KLONER, 2003). A melhora do tônus vascular coronário nos segmentos mediais e distais, tanto nos pacientes com CAD quanto nos controles, decorre da vasodilatação destes segmentos estenosados da artéria coronária (HALCOX e cols., 2002)

O NO age na modulação cardíaca vagal e seus efeitos sobre o controle barorreflexo da FC levam a um aumento do ganho barorreflexo (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999). No presente estudo, observou-se um aumento significativo da FC após administração de sildenafil em ratos normotensos. Encontram-se estudos na literatura que comprovam o aumento da FC (PICCIRILLO e cols., 2002; SCHALCHER e cols., 2002; REFFELMANN e cols., 2003), provavelmente devido a taquicardia reflexa conseqüente à vasodilatação provocada pelo sildenafil. Outros estudos, porém, não encontraram nenhuma alteração na FC (PHILIPS e cols., 2000; HALCOX e cols., 2002; VARDI e cols., 2002; BRINDIS & KLONER, 2003), provavelmente por que a vasodilatação não foi suficiente para provocar a taquicardia reflexa. Em nossos animais normotensos, a taquicardia observada, provavelmente, decorre da supressão das descargas dos barorreceptores arteriais, conseqüente da hipotensão arterial, a qual tem como conseqüência a redução da atividade parassimpática vagal e aumento da atividade simpática cardíaca. Tal resposta poderia sugerir uma eficácia do arco baroreflexo arterial em controlar a queda da PA induzida pelo sildenafil, confirmando achados existentes na literatura (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999).

Em pacientes com ICC, após a administração de sildenafil (por via oral), houve uma diminuição significativa da PAM, acompanhada de encurtamento do intervalo RR e prolongamento do intervalo QT, alterando assim a repolarização cardíaca. Um aumento significativo da FC também foi observado (PICCIRILLO e cols., 2002). Nos pacientes com ICC, a relação LF/HF, um marcador do balanço simpato-vagal cardíaco, foi aumentada pelo sildenafil, ou seja, houve um aumento da atividade simpática e/ou redução da atividade vagal após administração do sildenafil. O aumento de intervalo QT foi maior no grupo ICC tratado com sildenafil e este aumento está relacionado com a severidade da ICC e a presença de arritmias malignas (PICCIRILLO e cols., 2002).

As alterações nos valores basais de FC e PA não foram associadas a alterações significativas nos parâmetros de variabilidade cardiovascular. Como as variações tanto na FC quanto na PA foram muito discretas, é possível que a análise da variabilidade cardiovascular por meio de análise espectral, não tenha tido sensibilidade suficiente para perceber pequenas alterações na modulação autonômica, induzidas pelo sildenafil. Estes achados foram semelhantes aos encontrados em alguns trabalhos realizados em seres humanos.

A análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem se constituído em uma acurada ferramenta de estimação do controle autonômico da FC em seres humanos (MALLIANI e cols., 1991, TASK FORCE, 1996), bem como em cães (MALLIANI e cols., 1991) e ratos (CERUTTI e cols., 1991, 1994). No domínio do tempo, uma redução da variância ou do desvio padrão (a raiz quadrada da variância) dos intervalos RR sucessivos é indicativa de uma modulação vagal diminuída. No domínio da frequência, uma potência reduzida do componente HF tem sido associada a uma redução na modulação vagal cardíaca, enquanto o componente LF tem sido associado a uma modulação conjunta tanto simpática quanto parassimpática. Nos animais tratados com sildenafil não foram encontradas diferenças significativas quanto aos valores absolutos da variabilidade total (medido como variância), nem nos valores absolutos ou normalizados dos componentes espectrais VLF, LF e HF. Uma possível explicação para esta ausência de alterações pode ser a grande variabilidade inter-individual dos parâmetros espectrais de VFC, um fenômeno descrito na literatura (TASK FORCE, 1996).

A falta de um efeito do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre a variabilidade cardiovascular, à primeira vista, poderia ser inesperado, uma vez que a grande maioria dos relatos da literatura parecem indicar um papel efetivo da via da L-Arginina-NO-GMPc na potenciação de respostas vagais cardíacas, tanto central quanto

periféricamente (KLIMASCHEWSKI e cols., 1992; TAGAWA e cols., 1994; TRAVAGLI & GILLIS, 1994; ARMOUR e cols., 1995; ELVAN e cols., 1997; HAN e cols., 1998; SEARS e cols., 1998; CHOWDHARY & TOWNEND, 1999; CONLON & KIDD, 1999; HERRING & PATERSON, 2001; CHOATE e cols., 2001; MOHAN e cols., 2002; CHOWDHARY e cols., 2004).

O protocolo experimental utilizado no presente trabalho não permite uma adequada explicação para a ausência de efeito do citrato de sildenafil sobre a variabilidade cardiovascular e a sensibilidade barorreflexa. Entretanto, algumas especulações podem ser feitas. Primeiramente, importante contingente do efeito potenciador da resposta vagal induzida pela via do NO-GMPc se deve a efeitos neurais diretos, sejam em neurônios pré-ganglionares vagais centrais (TAGAWA e cols., 1994; TRAVAGLI & GILLIS, 1994) ou na pré-sinapse neuro-efetora cardíaca (em nível de nó SA) (KLIMASCHEWSKI e cols., 1992; ARMOUR e cols., 1995; ELVAN e cols., 1997; HAN e cols., 1998; SEARS e cols., 1998; CHOWDHARY & TOWNEND, 1999; CONLON & KIDD, 1999; HERRING & PATERSON, 2001; CHOATE e cols., 2001; MOHAN e cols., 2002; CHOWDHARY e cols., 2004). Embora a expressão de PDE-5 tenha sido comprovada para o cardiomiócitos isolados de ratos (DAS e cols., 2005), não existe na literatura nenhum dado que confirme a expressão de PDE-5 em neurônios ganglionares vagais cardíacos. É possível que tais neurônios não expressem a PDE-5, não sendo assim passíveis de potenciação do GMPc e de seus efeitos potenciadores da resposta vagal cardíaca. Ou ainda, é possível que mesmo que eles expressem a PDE-5, a inibição da mesma pelo sildenafil poderia ser compensada pela expressão de outras isoformas não inibidas pelo sildenafil e igualmente capazes de degradar o GMPc, como as isoformas PDE-1B e PDE-2, as quais têm sido descritas em neurônios (BENDER & BEAVO, 2004).

A inibição da PDE-5 em cardiomiócitos, em especial no nó SA, *per se* poderia também afetar a resposta cardíaca à estimulação vagal. Porém, uma potenciação do GMPc em cardiomiócitos isolados poderia ter efeitos mutuamente excludentes, já que se por um lado a PKG, ativada pelo GMPc, inibe correntes de entrada de cálcio, do tipo lenta, que levariam à bradicardia (FISCHMEISTER e cols., 2005), ela por outro lado, ativa correntes de marcapasso If, o que provocaria uma resposta taquicárdica (MUSIALEK e cols., 1997). O balanço final de tais efeitos acabaria por ser uma variabilidade da frequência cardíaca inalterada, frente a uma modulação autonômica vagal e simpática. Entretanto, todas as eventuais explicações acima especuladas necessitam de comprovação experimental em estudos futuros.

Embora os resultados obtidos com o tratamento com sildenafil tenham sido inesperadamente negativos, tais achados, em nossa opinião, não deixam de ter alguma relevância clínica. É bem descrito que o uso agudo de citrato de sildenafil para disfunção erétil pode cursar com hipotensão arterial e taquicardia decorrente de uma hiperativação simpática reflexa (PHILIPS e cols., 2000), as quais, se muito acentuadas, podem colocar em risco a vida dos usuários deste fármaco, por aumentar a incidência de episódios de arritmias cardíacas graves e de morte súbita (ARORA e cols, 1999; CHEITLIN e cols., 1999). Tais efeitos colaterais são mais intensos em indivíduos com hiperatividade simpática de base, como aqueles com insuficiência cardíaca e em uso de vasodilatadores à base de nitratos, os quais potenciam também a via do NO-GMPc (ARORA e cols, 1999; CHEITLIN e cols., 1999). A falta de uma ação sobre a variabilidade cardiovascular, evidenciada por nossos achados negativos, poderia ajudar a explicar o baixo risco cardiovascular encontrado em indivíduos saudáveis do ponto de vista cardiovascular.

O presente estudo possui algumas importantes limitações, principalmente relacionadas ao emprego de apenas uma única dose de sildenafil. Porém, o emprego de

dose similar em outros estudos suporta nossas observações (LI e cols., 2004). Além disso, nenhum protocolo experimental adicional foi empregado para se explicar do ponto de vista mecanístico os achados negativos encontrados com o sildenafil. Por fim, os efeitos observados pelo sildenafil, uma hipotensão leve associada a uma taquicardia reflexa podem ser atribuídos à supressão das descargas dos barorreceptores arteriais e conseqüente resposta reflexa, embora existam evidências de nosso próprio laboratório de que, parte dos efeitos do sildenafil, em particular a taquicardia, pode também ser de origem central (observações não publicadas). Uma possível comprovação deste efeito reflexo ou não causador da taquicardia seria a observação dos efeitos do sildenafil em animais com barodenervação sinoaórtica. Entretanto a mesma não foi realizada no presente trabalho.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, os efeitos do citrato de sildenafil sobre a modulação autonômica cardiovascular, bem como sobre o controle autonômico reflexo e tônico da frequência cardíaca em ratos normotensos.

Os principais achados do presente estudo foram:

- 1) Na dose empregada, o citrato de sildenafil induziu discreta, porém, significativa hipotensão arterial, associada à taquicardia, a qual foi, provavelmente, de origem reflexa decorrente de uma inibição parassimpática vagal.
- 2) Tais alterações não foram associadas a modificações importantes na variabilidade cardiovascular e na sensibilidade barorreflexa cardíaca.

Tais achados sugerem que o uso agudo do sildenafil, na dose habitualmente empregada no tratamento da disfunção erétil, em indivíduos saudáveis, do ponto de vista cardiovascular, é seguro e parece não alterar importantes marcadores de risco cardiovasculares associados ao sistema nervoso autonômico.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACC/AHA Expert Consensus Document. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33: 273-82.

AKSELROD S, GORDON D, UBEL FA, SHANNON DC, BERGER AC, COHEN RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981;213:220-222.

ARCHER S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 1993; 7:349-60.

ARMOUR JA, SMITH FM, LOSIER AM, ELLENBERGER HH, HOPKINS DA. Modulation of intrinsic cardiac neuronal activity by nitric oxide donors induces cardiodynamic changes. *Am J Physiol*. 1995; 268: R403–R413.

ARORA RR, TIMONEY M, MELILLI L. Acute myocardial infarction after the use of sildenafil. *N Engl J Med*. 1999;341:700.

BARRACHINA MD, PANES J, ESPLUGUES JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des*, 2001; 7:31-48.

BEAVO JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. 1995;75:725–748.

BENDER AT, BEAVO JA. Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int*. 2004; 45:853-857.

BIGGER JT, FLEISS JL, STEINMAN RC, ROLNITZKY LM, KLEIGER RE, ROTTMAN JN – Frequency domain measure of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 164-71.

BOOLELL M, ALLEN MJ, BALLARD SA, GEPI-ATTEE S, MUIRHEAD GJ, NAYLOR AM, ET AL. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific

phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1996; 8: 47-52.

BRINDIS RG, KLONER RA. Sildenafil in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2003; 92(9A):26M-36M.

BURNETT AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod.* 1995; 52:485-489.

CASTRO CLB, NÓBREGA ACL, ARAÚJO CGS - Testes autonômicos cardiovasculares. Uma revisão crítica. Parte I. *Arq Bras Cardiol* 1992; 59: 75-85.

CASTRO CLB, NÓBREGA ACL, ARAÚJO CGS - Testes autonômicos cardiovasculares. Uma revisão crítica. Parte II. *Arq Bras Cardiol* 1992; 59: 151-8.

CERUTTI C, BARRÉS C, PAULTRE C. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:H1292-H1299.

CERUTTI C, BARRÉS C, PAULTRE C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am. J. Physiol.* 1994; 266:H1293-H2000.

CHEITLIN MD, HUTTER AM JR, BRINDIS RG. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:273-282.

CHOATE JK, DANSON EJ, MORRIS JF, PATERSON DJ. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol.* 2001; 281: H2310-H2317.

CHOWDHARY S, MARSH AM, COOTE JH, TOWNEND JN. Nitric Oxide and Cardiac Muscarinic Control in Humans *Hypertension.* 2004; 43:1023-1027.

CHOWDHARY S, TOWNEND JN. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin Sci.* 1999; 97: 5-17.

CONLON K, KIDD C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic actions on the heart. *J Auton Nerv Sys.* 1999; 75: 136–146.

CORBIN JD, FRANCIS SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem.* 1999 May 14;274(20):13729-32.

CORBIN, J.D., FRANCIS, S.H. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int. J. Clin. Pract.* 56, 453– 459, 2002.

COWLEY JR AC, FRANCHINI KG. Autonomic control of blood vessels. In: Robertson D, ed. *Primer on the Autonomic Nervous System.* San Diego, CA: *Academic Press*, Inc., 1996; pp.49-55.

DAS A, XI L, KUKREJA RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280:12944-12955.

DAVIS KL, MARTIN E, TURKO IV, MURAD F. Novel effects of nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2001; 41:203-36.

DAWSON, D. A.; *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1994, 6, 299.

DRAPIER, J.C.; WEIZESBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. *European Journal of Immunogenetics*, 1988; 18: 1587-1592.

ELVAN A, RUBART M, ZIPES DP. NO modulates autonomic effects on sinus discharge rate and AV nodal conduction in open-chest dogs. *Am J Physiol.* 1997; 272: H263–H271.

EWING DJ, MARTYN CN, YOUNG RJ, CLARKE BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care* 1985;8:491-98.

FARAH VM, MOREIRA ED, PIRES MD, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(3):361-9.

FARREL AJ, BLAKE DR. Nitric oxide (review). *Ann Rheum Dis*, 1996; 55:7-20.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J.; *Chem. Eng. News* 1993, 71, 26.

FERON O, DESSY C, OPEL DJ, ARSTALL MA, KELLY RA, MICHEL T. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. *J Biol Chem*. 1998; 273: 30249–30254.

FERRER MT, KENNEDY WR, SAHINEN F. Baroreflexes in patients with diabetes mellitus. *Neurology* 1991; 41:1462-1466.

FISCHMEISTER R, CASTRO L, ABI-GERGES A, ROCHAIS F, VANDECASTEELE G. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2005; 142:136-143.

FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHAWARZ P, GATH I, KLEINERT H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 1994; 23(part 2):1121-31.

FORSTERMANN U, KLEINERT H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. Department of Pharmacology, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany. Naunyn Schmiedebergs *Arch Pharmacol* 1995; 352 :351-64.

FRANCHINI KG, COWLEY JR AC. Autonomic control of cardiac function. In: Robertson D, ed. Primer on the Autonomic Nervous System. San Diego, CA: *Academic Press, Inc.*, 1996; pp.42-8.

FRANCHINI KG. Função e disfunção autonômica na doença cardiovascular. *Rev Soc Cardiol Estado São de Paulo*. 1998; 8:285-297.

FRICKER, S. P. *Platinum Metals Rev.* 1995, 39, 150.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288:373-6.

GELLER DA, LOWENSTEIN CJ, SHAPIRO RA, NUSSLER AK, DI SM, WANG SC, NAKAYAMA DK, SIMMONS RL, SNYDER SH, BILLIAR TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 3491-3495.

GEWALTIG, M.T. & KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. *Cardiovasc. Research*, 55: 250-60, 2002.

GOLDSTEIN I, LUE TF, PADMA-NATHAN H, ROSEN RC, STEERS WD, WICKER PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Engl J Med.* 1998;338:1397–1404.

GROSS, GJ. Sildenafil and Endothelial Dysfunction in Humans *Circulation.* 2005; 111:721-723.

GUYTON AC, HALL, JE. *Tratado de Fisiologia Médica*, 10ª edição, Capítulo 18, pág178, editora Guanabara-Koogan, 2002.

HAINSWORTH R - Reflexes from the heart. *Physiol Ver* 1991; 71: 617-58.

HAINSWORTH R, LEDSONE JR, CARSWELL F - Reflex responses from aortic barorreceptores. *Am J Physiol* 1970; 218: 423-9.

HALCOX JP, NOUR KR, ZALOS G, MINCEMOYER RA, WACLAWIW M, RIVERA CE, WILLIE G, ELLAHHAM S, QUYYUMI AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40:1232-1240.

HAN X, KOBZIK L, SEVERSON D, SHIMONI Y. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node. *J Physiol.* 1998; 509: 741–754.

HERRING N, PATERSON DJ. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. *J Physiol*. 2001; 535: 507–518.

IGNARRO LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1990; 30:535-60.

IGNARRO, L. J.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990, 30, 535.8.

IRIGOYEN MC, LACCHINI S, DE ANGELIS K, MICHELINI LC. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos? *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2003;1:20-45.

IRIGOYEN MC, MOREIRA ED, CESTARI IA, KRIEGER EM. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24:219-22.

IRIGOYEN MC, MOREIRA ED, IDA F, PIRES M, CESTARI IA, KRIEGER EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension* 1995; 26(6 Pt 2):1111-6.

KERWIN, J. F.; LANCASTER, J. R.; FELDMAN, P. L.; *J. Med. Chem.* 1995, 38, 4343.7.

KIECHELE FL, MALINSKI T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*, 1993; 100:567-75.

KLEIGER, R. E.; MILLER, J. P.; BIGGER, JR, J.T.; MOSS,A.,J.; MULTICENTER POST-INFARCTION RESEARCH GROUP. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, v.59, p. 256-62, 1987.

KLIMASCHEWSKI L, KUMMER W, MAYER B, COURAUD JY, PREISLER U, PHILIPPIN B, HEYM C. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ Res*. 1992; 71:1533–1537.

KOSHLAND JR., DE. The molecule of year. *Science*, 1992; 258:1861.

KUKREJA RC, OCKAILI R, SALLOUM F, XI L. Sildenafil-induced cardioprotection in rabbits. *Cardiovasc Res*. 2003; 60:700-701.

KUO PC, SCHROEDER RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*, 1995; 221:220-35.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery*, 1995; 221:220-35.

LENHINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1986.

LI M, ZHENG C, SATO T, KAWADA T, SUGIMACHI M, SUNAGAWA K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation*. 2004; 109:120-124.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circulation Research*, 2001; 88:756-62.

LOWENSTEIN, C.; ALLEN, G.; WALKER, A.; ROSE, N.; SNYDER, S.; HERSKOWITZ, A. Nitric oxide inhibits viral replication in myocarditis. *Circulation*, 1993; 88: IG-IH (Abstr).

MALIK M, CAMM AJ - *Heart Rate Variability*. 1st ed. Armonk: Futura, 1995: 543.

MALLIANI A, PAGANI M, LOMBARDI F, CERUTTI S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 1991; 81:537-547.

MARLETTA MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993; 268:12231-12234.

MARLETTA, M.A ET AL. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-11, 1988.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-30, 1994.

MOHAN RM, HEATON DA, DANSON EJ, KRISHNAN SP, CAI S, CHANNON KM, PATERSON DJ. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. *Circ Res*. 2002; 91:1089–1091.

MOLLACE V, SALVEMINI D, ANGGARD E, VANE J. Nitric oxide from vascular smooth muscle cells: regulation of platelet reactivity and smooth muscle cell guanylate cyclase. *Br J Pharmacol*, 1991;104:633-8.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-42.

MUIRHEAD GJ, RANCE DJ, WALKER DK, WASTALL P. Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(suppl 1):13S-20S.

MUSIALEK P, LEI M, BROWN HF, PATERSON DJ, CASADEI B. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I(f). *Circ Res*. 1997; 81:60–68.

NATHAN C, XIE Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994, 78: 915-918.

NATHAN C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992; 6:3051-64.

NAVA, E. & LÜSCHER, T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypert.*, 13(suppl. 2): S39-48, 1995.

OCKAILI R, SALLOUM F, HAWKINS J, KUKREJA RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283:H1263-H1269.

PAGANI M, LOMBARDI F, GUZZETTI S, RIMOLDI O, FURLAN R, PIZZINELLI P, SANDRONE G, *ET AL.* Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 1986;59:178-3.

PAGANI M, MALLIANI A. Power spectral analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 1994; 90:1826-1831.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature*, 1988; 333:664-6.

PHILLIPS BG, KATO M, PESEK CA, WINNICKI M, NARKIEWICZ K, DAVISON D, SOMERS VK. Sympathetic activation by sildenafil. *Circulation*. 2000; 102:3068-3073.

PICCIRILLO G, NOCCO M, LIONETTI M, MOISE A, NASO C, MARIGLIANO V, CACCIAFESTA M. Effects of sildenafil citrate (viagra) on cardiac repolarization and on autonomic control in subjects with chronic heart failure. *Am Heart J*. 2002; 143:703-710.

RAJA SG, NAYAK SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *Ann Thorac Surg*. 2004; 78:1496-1506.

REFFELMANN T, KLONER RA. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 108:239-244.

RIBEIRO JP, MORAES FO RS; Variabilidade da frequência cardíaca como instrumento de investigação do sistema nervoso autônomo; *Rev Bras Hipertens* vol.12(1): 14-20, 2005.

ROTELLA, D.P. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nat. Rev.*, *Drug Discov*. 1, 674– 682, 2002.

SCOTT-BURDEN, T. & VANHOUTTE, P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 87(suppl. 5): 51-5, 1993.

SEARS CE, CHOATE JK, PATERSON DJ. Inhibition of nitric oxide synthase slows heart rate recovery from cholinergic activation. *J Appl Physiol*. 1998; 84:1596–1603.

SHAPIRA S, KADAR T, WEISSMAN BA. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res*, 1994; 668:80-4.

SHAW, A. W.; VOSPER, A. J.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans*. 1977, 8, 1239.6.

SHIBUKI, K.; *Biomed. Res*. 1994, 15,65.

SNYDER, S.H. & BREDT, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, may: 28-35, 1992.

STEERS W.D . Meta-analysis of the efficacy of sildenafil (Viagra) in the treatment of severe erectile dysfunction. *J Urol*, 1998,159: 238 (Abstract 910).

TAGAWA T, IMAIZUMI T, HARADA S, ENDO T, SHIRAMOTO M, HIROOKA Y, TAKESHITA A. Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. *Circ Res*. 1994; 75:70–76.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996; 93: 1043-65.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Guidelines: Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. *Eur Heart J* 1996;17:354-81.

TRAVAGLI RA, GILLIS RA. Nitric oxide-mediated excitatory effect on neurons of dorsal motor nucleus of vagus. *Am J Physiol*. 1994; 266:G154–G160.

VARDI Y, KLEIN L, NASSAR S, SPRECHER E, GRUENWALD I. Effects of sildenafil citrate (viagra) on blood pressure in normotensive and hypertensive men. *Urology*. 2002; 59:747-752.

VICTOR RG, MARK AL. The sympathetic nervous system in human hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2 ed. New York: Raven Press Ltd., 1995; pp.755-73.

WALLIS R.M, CORBIN J.D, FRANCIS J.H, ELLIS P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae, and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol.*, 1999, 83: 3C – 12C.

WALKER DK, ACKLAND MJ, JAMES GC, MUIRHEAD GJ, RANCE DJ, WASTALL P, WRIGHT PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica*, 1999, 29:297 – 310.

WANG Y, MARDSEN PA. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1995, 4: 12-22.

WENNMALM A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Int Med*, 1994; 235:317-27.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20:1430-42, 2000.

WONG GKT, MARSDEN PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11:215-20.

WU G, MORRIS JR SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 1998; 336:1-17.

ZHANG J, DAWSON TM, SNYDER SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthase in Neurotoxicity. *Science* 1994, 263: 687-689.

ZUSMAN RM. Cardiovascular data on sildenafil citrate. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1C-35C.