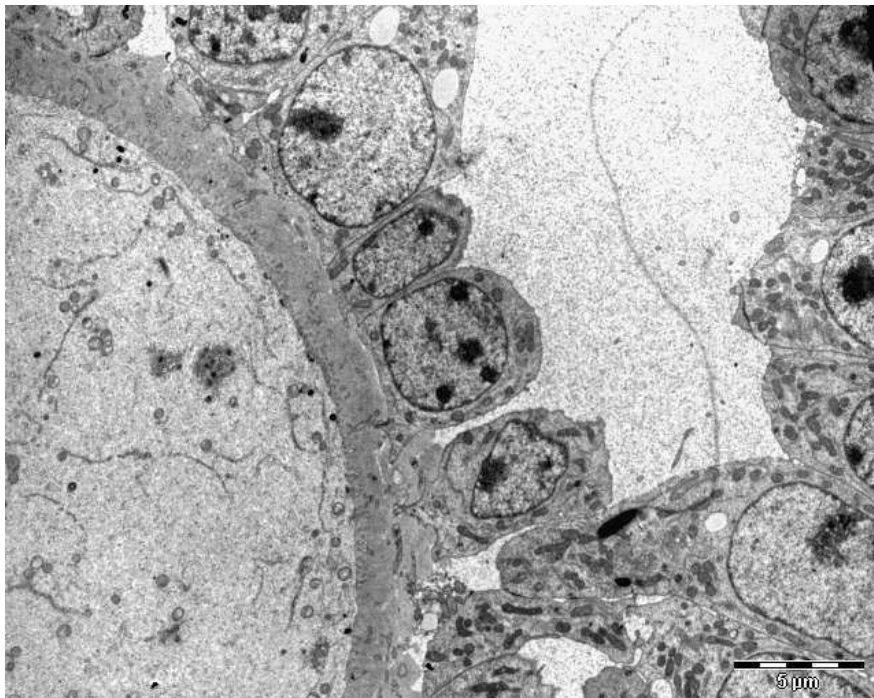


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO
INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE 5
SOBRE A OVOGÊNESE DE
CAMUNDONGOS**

Mariana Aragão Matos Donato



Recife, fevereiro/2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS
NÍVEL MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO
INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE 5
SOBRE A OVOGÊNESE DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-
graduação do Centro de
Ciências Biológicas como
um dos requisitos para
obtenção do título de
Mestre.

Mariana Aragão Matos Donato
Orientador(a): Christina Alves Peixoto
Laboratório de Microscopia e Ultraestrutura – Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ)

Recife, fevereiro/2009

Donato, Mariana Aragão Matos

Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase 5 sobre a ovogênese de camundongos / Mariana Aragão Matos Donato. – Recife: O Autor, 2009.

90 folhas: fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Ciências Biológicas, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Fosfodiesterase-5 2. iPDE5 3. Enzimas I Título.

**577.15
572.7**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2009- 044**

MARIANA ARAGÃO MATOS DONATO

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO INIBIDOR DE
FOSFODIESTERASE 5 SOBRE A OVOGÊNESE DE
CAMUNDONGOS”**

Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-graduação
do Centro de Ciências
Biológicas como um dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre.

Apresentada dia 18/02/2009, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
(CPqAM-FIOCRUZ), sala 3 às 8h30.

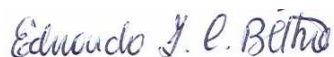
BANCA EXAMINADORA



ORIENTADORA: Dra. Christina Alves Peixoto



1º. MEMBRO: Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra



2º. MEMBRO: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

SUPLENTE INTERNO: Maria Teresa dos Santos Correia

SUPLENTE EXTERNO: Dra. Érika Christina Santos Oliveira

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter aberto as portas necessárias para chegar neste ponto, e por todas as outras portas que Ele me abrirá;

Aos meus pais e irmão, por sempre me apoiarem nas minhas decisões;

A minha orientadora, Christina Peixoto, por ter tido paciência comigo, e por ter dedicado tanto tempo ao meu lado, principalmente na hora de escrever;

As minhas companheiras de laboratório, em especial Karina Saraiva, Mayza Kennedy, Amanda Soares e Edlene Lima, pois sei que o dia-a-dia seria muito mais difícil sem a alegria delas;

Aos colegas do Biotério, Giuliana Schirato e toda sua equipe, por terem me auxiliado durante todos os meses de experimento, principalmente durante os pilotos, nos dias de eutanásia, e nos finais de semana, e por toda a compreensão e apoio;

Aos amigos do almoço, pois eles foram fundamentais para o meu dia-a-dia, principalmente quando dividíamos as felicidades e as angústias de ser pesquisador;

A todos os meus amigos, que de maneira direta ou indireta contribuíram com a execução deste trabalho;

A todos os animais que se doaram para a execução desse projeto.

SUMÁRIO

Lista de figuras	vii
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiii

CAPÍTULO I

1.1 Introdução	
1.1.1 Considerações gerais	2
1.1.2 Ovogênese	3
1.1.3 Fosfodiesterases	9
1.1.4 Inibidores da Fosfodiesterase	11
1.1.5 Papel das Fosfodiesterases na Ovogênese	15
1.2 Justificativa	17
1.3 Objetivos	19
1.4 Referências bibliográficas	20

CAPITULO II

2.1 Artigo	
2.1.1 Article Manuscript: PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITOR ALTERS FOLLICLE DEVELOPMENT AND LUTEAL CELL MORPHOLOGY	28

CAPITULO III

3.1 Dados complementares	
3.1.1 Materiais e métodos	66
3.1.2 Resultados	69
- Morfologia folicular	70

- Imunohistoquímica para enzimas da via esteroidogênica	75
3.2 Referências bibliográficas	76
CAPÍTULO IV	
4.1 Discussão	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Esquema ilustrando o ovário e suas principais estruturas. Adaptado de SILVA, 2004. Página 4.

Figura 2 – Esquema representativo da luteinização. Legenda: A (antro), GL (células da granulosa), BM (membrana basal), TI (teca interna), TE (teca externa), C (capilares), SLC (células luteais pequenas), LLC (células luteais grandes). Adaptado de NISWENDER et al, 2000. Página 6.

Figura 3 – Esquema representativo da esteroidogênese até a formação da progesterona. Adaptado de STOCCO, 2007. Página 8.

Figura 4 – Esquema de relaxamento da musculatura vascular lisa mediado por uso de inibidor de fosfodiesterase 5. A inibição da fosfodiesterase aumenta os níveis intracelulares de cGMP. A concentração elevada de cGMP leva à ativação da PKG (protein kinase G), que ativa os canais de cálcio, diminuindo seus níveis intracelulares, levando ao relaxamento do músculo (adaptado de ROSEN, KOSTIS, 2003). Página 10.

CAPÍTULO II

Figure 1 – Luteal cells. A, untreated luteal cells. B, 5mg/kg Vardenafil treated luteal cells. Observe that vardenafil-treated cells are numerous than untreated ones (arrows). Stained with hematoxylin-eosin. Bars, 25 μ m. Página 59.

Figure 2 - Follicular cells. A (primary), C (secondary) and E (antral) untreated follicles. B, D and F - 5mg/kg Vardenafil-treated follicles. Observe round granulosa cells (G) presenting nucleus (N) with two or more evident nucleolus, and elongated theca cells (T). ZP, zona pellucida; A, antrum; O, oocyte. Bars, 5 μ m (A, B, C, D); 2 μ m (E, F). Página 60.

Figure 3 - Ultrathin sections of control luteal cells (3A and B) and vardenafil-treated cells (3C and D). In control group, numerous lipid droplets (L) and mitochondria (M) with tubular cristae are scattered through the cytoplasm. Ribosomes (arrows) were evident nearby to the nucleus (N). In vardenafil-treated group, observe numerous mitochondria (M), and few lipid droplets (L), compared to control group. Several ribosomes were present in cytoplasm (arrows), isolated or attached to the endoplasmic reticulum. Bars, 2 μ m (A, B); 1 μ m (C, D). Página 61.

CAPÍTULO III

Figura 1 – Folículo primário do grupo controle, próximo à superfície do ovário. Apresenta o oócito no seu interior e células da granulosa com formato cuboidal. Aumento 40x. Página 70.

Figura 2 – Dois folículos primários em ovário do grupo tratado, apresentando morfologia normal. Note que o folículo superior apresenta o oócito aumentado em tamanho, e em alguns locais já apresenta células da granulosa formando dupla camada, característica de folículos que estão ingressando no estágio secundário. Aumento: 40x. Página 70.

Figura 3 – Micrografia de ovário do grupo controle mostrando um folículo secundário. Note que o oócito apresenta aumento de diâmetro (comparando ao

folículo primário) e as células da granulosa formam uma dupla camada que envolve todo o oócito. Aumento: 40x. Página 71.

Figura 4 – Folículo secundário em ovário de animal tratado com Vardenafil. Observe a morfologia similar ao folículo do grupo controle. Aumento: 40x. Página 71.

Figura 5 – Folículo antral em ovário de animal não-tratado. Aumento: 20x. Página 72.

Figura 6 – Folículo antral em ovário de animal tratado com Vardenafil. Aumento: 20x. Página 72.

Figura 7 – Micrografia mostrando um folículo antral do grupo controle. Observe o oócito (o), células granulosas do cumulus ooforus (c) e murais (m), células da teca (t) e líquido antral (a). Aumento: 40x. Página 73.

Figura 8 – Folículo antral do grupo tratado. Observe o oócito (o), células granulosas do cumulus ooforus (c) e murais (m), células da teca (t) e líquido antral (a). Aumento: 40x. Página 73.

Figuras 9 e 10 – Micrografias de corpo lúteo. Note que as células tratadas com Vardenafil (Figura 9) parecem ser mais numerosas do que as células não tratadas (Figura 10). Aumento: 40x. Página 74.

Figuras 11 e 12 – Imunolocalização da enzima StAR. Aumento: 10x. Página 75.

Figuras 13 e 14 – Imunolocalização da enzima P450scc. Aumento: 10x. Página 75.

Figuras 15 e 16 – Imunolocalização da enzima 3β -HSD. Aumento: 10x.
Página 75.

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD	3 Beta-hidroxiesteróide desidrogenase
8-Br-cGMP	8-Bromo- guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPc	Adenosina 3',5'- monofosfato cíclico
GMPc	Guanosina 3',5'- monofosfato cíclico
CNG	Canal ligado a nucleotídeo cíclico
DE	Disfunção erétil
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPAC	Proteína de troca diretamente ativada por cAMP
iPDE5	Inibidor de fosfodiesterase 5
FSH	Hormonio foliculo-estimulante
hCG	Gonadotrofina coriônica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormonio luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
P450 _{scc}	P450 clivagem da cadeia lateral do colesterol
PDE	Fosfodiesterase
PDE5	Fosfodiesterase 5
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
VLDL	Lipoproteína de baixíssima densidade
StAR	Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

RESUMO

O Vardenafil é um potente vasodilatador, com uso no tratamento de pacientes com disfunção erétil. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição seletiva da fosfodiesterase-5 (PDE5), específica para o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). As fosfodiesterases são enzimas capazes de regular os níveis de AMPc e GMPc por hidrólise, sua função tem sido indicada como alvo para novos agentes terapêuticos, que atuem através da inibição de suas isoenzimas. O tratamento crônico com Vardenafil tem sido utilizado com sucesso em casos de hipertensão pulmonar, onde a progressão da doença pode levar a uma falência do ventrículo direito e conseqüente morte do paciente. Apesar de ser uma droga utilizada em altas doses por períodos longos, pouco se conhece sobre seu efeito em outros sistemas, uma vez que os nucleotídeos cíclicos cGMP e cAMP têm diferentes efeitos de acordo com o tipo celular, e suas funções ovarianas não estão bem descritas. Pela falta de esclarecimentos sobre a atividade da Vardenafil em outras células, faz-se necessário estudar o mecanismo de ação desta droga sobre a ovogênese de pacientes submetidas à terapia oral com o Vardenafil, uma vez que a PDE5 já foi caracterizada em folículos e oócitos (SASSEVILLE et al, 2005). Camundongos foram tratados com o inibidor de fosfodiesterase Vardenafil, que aumenta os níveis intracelulares do cGMP, e seus ovários utilizados para avaliação dos efeitos dessa droga. O presente estudo demonstra que o tratamento com o inibidor de fosfodiesterase 5 altera a morfologia das células luteais, sugerindo que induzir níveis altos de cGMP pode afetar essas células.

Palavras-chave: fosfodiesterase-5; iPDE5; enzimas

ABSTRACT

Vardenafil citrate is a potent vasodilator, with use in the treatment of patients with erectile dysfunction. Its mechanism of action is based on selective inhibition of phosphodiesterase-5 (PDE5), specific to guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). The phosphodiesterases are enzymes capable of regulating the levels of cAMP (adenosine 3',5'-cyclic monophosphate) and cGMP by hydrolysis, its role has been indicated as a target for new therapeutic agents that act through the inhibition of their isoenzymes. The chronic treatment with Vardenafil has been used successfully in cases of pulmonary hypertension, where the progression of the disease can lead to right ventricular failure and subsequent death of the patient. Despite being used in high doses for long periods, little is known about its effects on other systems, since the cyclic nucleotides cAMP and cGMP have different effects according to the cell type, and their ovarian functions are not well described. The lack of information about the activity of Vardenafil in other cells, it is necessary to study the mechanism of action of this drug on the ovogenesis in patients undergoing therapy with oral Vardenafil, since PDE5 has been characterized in follicles and oocytes (SASSEVILLE et al, 2005). Mice were treated with the inhibitor of phosphodiesterase Vardenafil, which increases the levels of intracellular cGMP, and their ovaries used to assess the effects of this drug. This study demonstrates that treatment with the inhibitor of phosphodiesterase 5 alters the morphology of luteal cells, suggesting that induce high levels of cGMP may affect these cells.

Key words: phosphodiesterase; iPDE5; enzymes

CAPÍTULO I

1.1 - INTRODUÇÃO

Considerações gerais

A sinalização intracelular tem importante função nas respostas celulares, sejam elas normais ou patológicas. O AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e o GMPc (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) são nucleotídeos que participam diretamente da sinalização intracelular. AMPc e GMPc têm a capacidade de ativar vários outros elementos da sinalização intracelular, como PKA (proteína quinase A), PKG (proteína quinase G), EPAC (proteína de troca diretamente ativada por cAMP) e CNG (canal ligado a nucleotídeo cíclico). Esses mediadores controlam importantes respostas celulares, como a concentração de cálcio intracelular, proliferação celular, inflamação e transcrição (LUGNIER, 2006).

Os nucleotídeos cíclicos têm diferentes efeitos dependendo do tipo celular. No ovário, o papel do cAMP já é bem conhecido, e acredita-se que as ações do LH e FSH nas funções ovarianas são mediadas por alterações na concentração intracelular desse nucleotídeo. Por outro lado, as concentrações de GMPc parecem ser reguladas de maneira inversa quando comparadas ao AMPc no ovário, em certas fases do ciclo. Apesar disso, apenas nos últimos anos iniciaram-se pesquisas sobre o papel do GMPc no ovário, visando comprovar se ele estaria ou não envolvido nos processos reprodutivos (LAPOLT, 2002). A concentração intracelular desses nucleotídeos está sujeita a mecanismos de síntese e degradação, cujos processos já estão bem estabelecidos. A síntese dos nucleotídeos cíclicos é dependente das enzimas adenilato ciclase e guanilato ciclases, enquanto sua degradação é relacionada às fosfodiesterases, família multigênica de enzimas.

Ovogênese

A ovogênese é um processo complexo e bem organizado que ocorre nas gônadas femininas, os ovários. Estes são órgãos únicos e dinâmicos, pois possuem vários graus de desenvolvimento e remodelamento tissular, atividade que ocorre periodicamente durante a vida reprodutiva feminina. Dentre as funções ovarianas, duas se destacam; desenvolver oócitos fertilizáveis e competentes, e secretar os hormônios necessários para preparar o trato reprodutivo para fertilização e estabelecimento de gravidez. Os folículos são as unidades funcionais do ovário, e cada folículo compreende um oócito cercado por uma ou mais camadas de células somáticas. O desenvolvimento folicular ovariano inicia-se em um “*pool*” finito de folículos primordiais e termina ou na atresia desse folículo ou na liberação de um oócito maduro para fertilização (PEDERSEN e PETERS, 1968).

Histologicamente, o ovário é um órgão composto de vários tipos celulares que incluem células formadoras dos folículos (oócitos, células da granulosa, células tecaais) e células do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares estão localizados na região cortical do ovário e posteriormente se diferenciam em vários subtipos. Por exemplo, as células da granulosa diferenciam-se em células do cúmulus e murais, enquanto que as células da teca desenvolvem-se em camadas internas e externas (ERICKSON e SHIMASAKI, 2003). A região medular do ovário localiza-se na porção mais interna, sendo constituída por tecido conjuntivo (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e II), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (SILVA, 2004) (Figura 1).

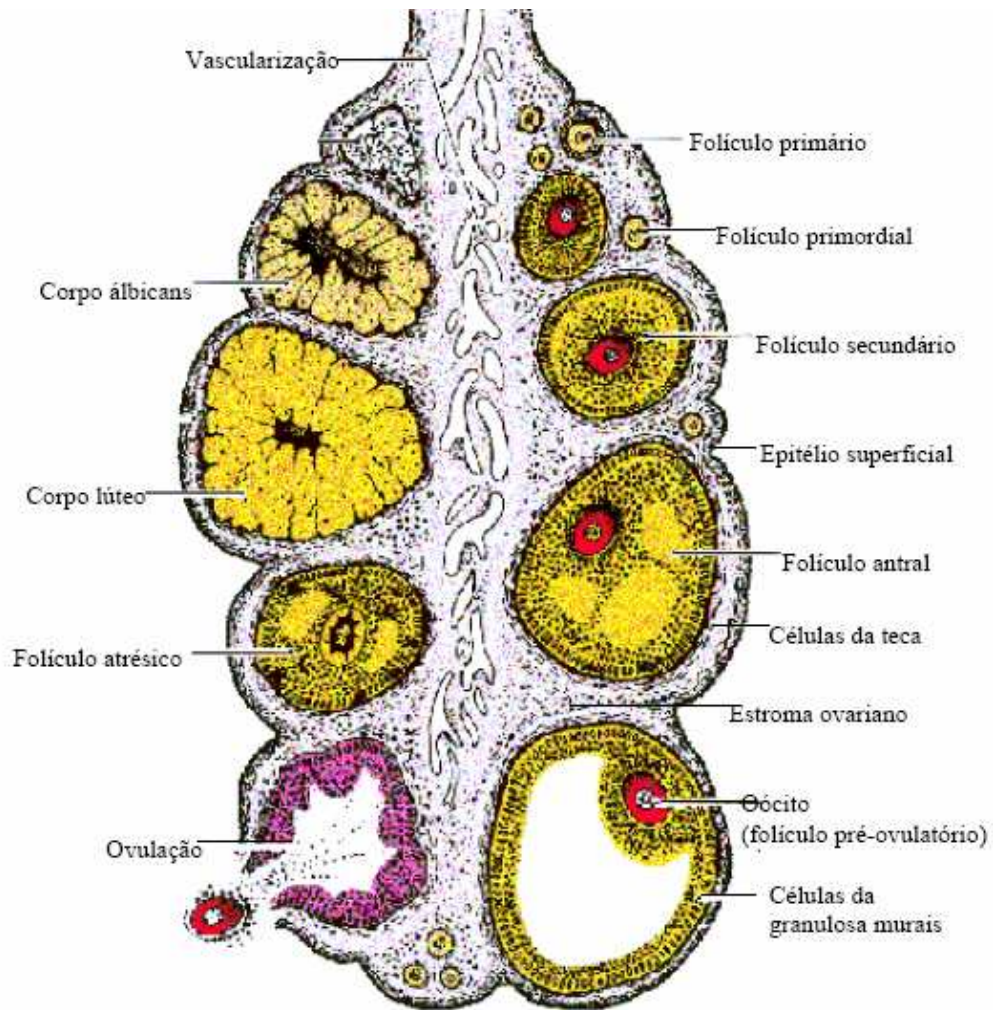


Figura 1: Esquema ilustrando o ovário e suas principais estruturas. Adaptado de SILVA, 2004.

A foliculogênese é o processo de desenvolvimento folicular, iniciando com o folículo primordial e terminando no folículo antral pré-ovulatório (EPPIG e O'BRIEN, 1996). É um processo regulado por fatores de crescimento produzidos pelo oócitos, células da granulosa e da teca. Apesar das gonadotrofinas não exercerem efeitos diretos sobre a ativação e crescimento de folículos primordiais, esses hormônios desempenham funções cruciais para promover o desenvolvimento folicular. Por outro lado, em folículos primários e secundários, o FSH estimula a proliferação de células da granulosa e crescimento folicular (WANDJI et al, 1996). Após a seleção folicular, os

folículos antrais tornam-se dependentes de FSH para sobrevivência, crescimento e maturação oocitária (MONNIAUX et al, 1997).

Alguns folículos primordiais iniciam o crescimento imediatamente após a sua formação; contudo, a maioria permanece em estágio de dormência por meses ou anos. Os folículos primordiais são caracterizados por localizarem-se na superfície ovariana, e serem formados por um oócito cercado de células somáticas planas, também denominadas de células da pré-granulosa. O crescimento folicular desse estágio é caracterizado por aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células granulosas, e a transformação morfológica destas, que passam de achatadas para cúbicas (SKINNER, 2005). Quando todas as células granulosas possuírem formato cúbico, o folículo é denominado de primário (SKINNER, 2005). A partir desse estágio, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas, e as células granulosas começam a se multiplicar e a formar uma segunda camada de células ao redor do oócito, dando origem ao folículo secundário. Nesse estágio, a zona pelúcida já pode ser claramente observada ao redor do oócito. Após essa multiplicação de células granulosas, inicia-se o recrutamento das células teca a partir do estroma. Após sua formação, a teca permanece separada das células granulosas pela membrana basal (PETERS, 1969).

Com a intensa proliferação das células granulosas, ocorre o aparecimento de fluido folicular, e este folículo começa a ser denominado de antral. O diâmetro do folículo começa aumentar acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células granulosas e teca, e aumento da cavidade antral. A teca começa a se diferenciar em duas: interna e externa.

Por fim, o folículo pré-ovulatório é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa diferenciadas, chamadas células do

cumulus, a presença do fluido folicular (ou antro), presença de células granulosas murais, e a camada de células da teca (PEDERSON e PETERS, 1968). A ovulação do oócito e das células do cumulus ocorre em resposta ao pico de LH; as células restantes do folículo sofrem um processo chamado luteinização, formando o chamado corpo lúteo (Figura 2). As células luteinizadas devem parar de se dividir, e expressar um novo conjunto de moléculas, que serão responsáveis por suas funções, que permitirão à célula luteal existir em novas condições (STOCCO et al, 2007). As mudanças iniciadas pelo pico de LH nas futuras células luteais podem ser transientes ou permanentes. Entre as mudanças permanentes destacam-se a maior expressão gênica de StAR, P450scc e 3 β -HSD, enzimas que visam a luteinização e a manutenção da função luteal.

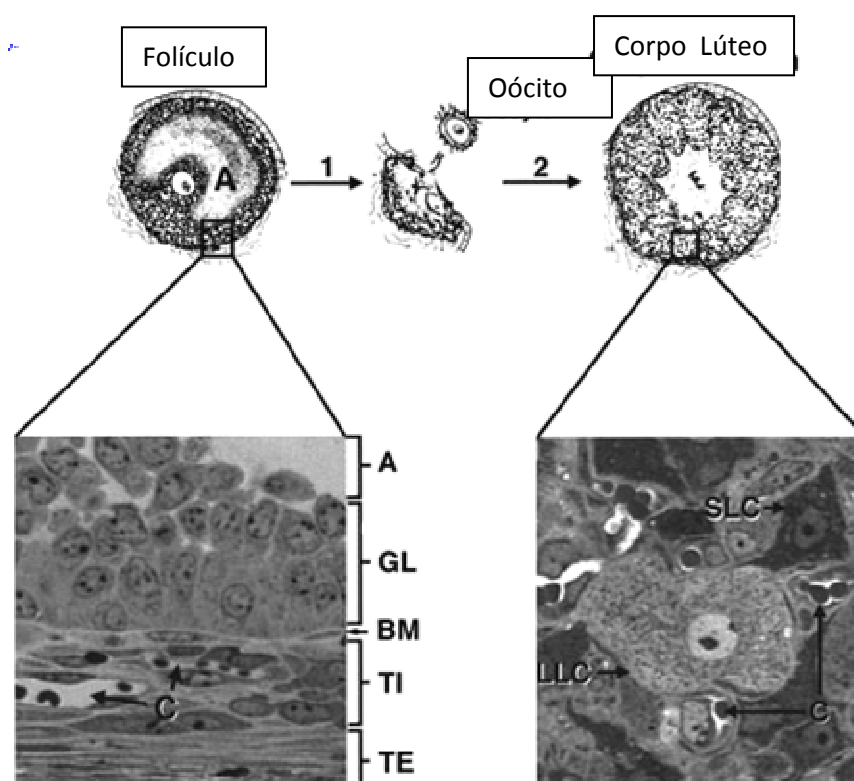


Figura 2: Esquema representativo da luteinização. Legenda: A (antro), GL (células da granulosa), BM (membrana basal), TI (teca interna), TE (teca externa), C (capilares), SLC (células luteais pequenas), LLC (células luteais grandes). Adaptado de NISWENDER et al, 2000.

De acordo com Stocco et al (2007), a formação do corpo lúteo não apenas envolve mudanças na expressão de genes e da sinalização celular, mas também a quebra da membrana basal, e a rápida migração de células tecais, endoteliais, fibroblastos na camada de células granulosa. O corpo lúteo é um produto da luteinização das células foliculares, invasão das células endoteliais, e remodelamento tissular.

O corpo lúteo é uma glândula composta de células esteroideogênicas pequenas e grandes, fibroblastos, células endoteliais e imunes. Cada uma dessas células possui diferenças morfológicas, endócrinas e bioquímicas, necessárias para a manutenção do corpo lúteo. Após a luteinização, algumas células sofrem hipertrofia e se diferenciam em células luteais grandes, enquanto outras continuam pequenas e são denominadas células luteais pequenas. Em roedores não há diferenciação morfológica marcante entre esses dois tipos celulares; porém, de acordo com Nelson et al (1992), as células grandes secretam de 2 a 40 vezes mais do que as pequenas. Elas também podem diferir nas respostas a estímulos hormonais. Existe uma hipótese que as células granulosas se diferenciam em células luteais grandes, e as células luteais pequenas provêm das células tecais; porém não existem dados que comprovem esse processo em murinos (NELSON et al, 1992). O grau de migração e combinação celular difere entre as células; em primatas, os dois tipos celulares permanecem relativamente separados, e podem ser localizados de acordo com arranjo do corpo lúteo.

Essas mudanças severas levam a alterações na esteroideogênese. Enquanto estão presentes no folículo, as células granulosas e tecais têm como principal produto o estrógeno e androstenediona; após a luteinização, essas células transformam-se em uma grande fonte de progesterona. O corpo lúteo começa então a expressar altos níveis de proteínas envolvidas na aquisição, síntese, transporte e processamento de colesterol à progesterona. Para isso, um estoque

de colesterol é necessário para manter a taxa esteroidogênica (MEYER e BRUCE, 1991; NISWENDER et al, 2000; STOCCO, 2007). A célula pode obter colesterol de três diferentes modos: síntese *de novo*, hidrólise dos ésteres de colesterol e lipoproteínas LDL e HDL, sendo as lipoproteínas as maiores fontes provedoras de colesterol para a célula. Como o colesterol é uma molécula hidrofóbica, enzimas carreadoras são responsáveis por levar o colesterol até a membrana externa da mitocôndria. Após isso, a enzima chamada StAR (steroidogenic acute regulatory protein) é responsável por fazer o transporte entre as duas membranas da mitocôndria. Quando o colesterol chega na membrana interna da mitocôndria, a transformação em hormônios esteróides inicia-se pela clivagem da cadeia lateral da molécula de colesterol, pela enzima chamada P450scc, formando pregnenolona. Esta é transportada para o retículo endoplasmático liso, onde a 3 β -HSD a converte em progesterona, que se difunde a partir da célula (NISWENDER et al, 2000; STOCCO, 2007). (Figura 3)

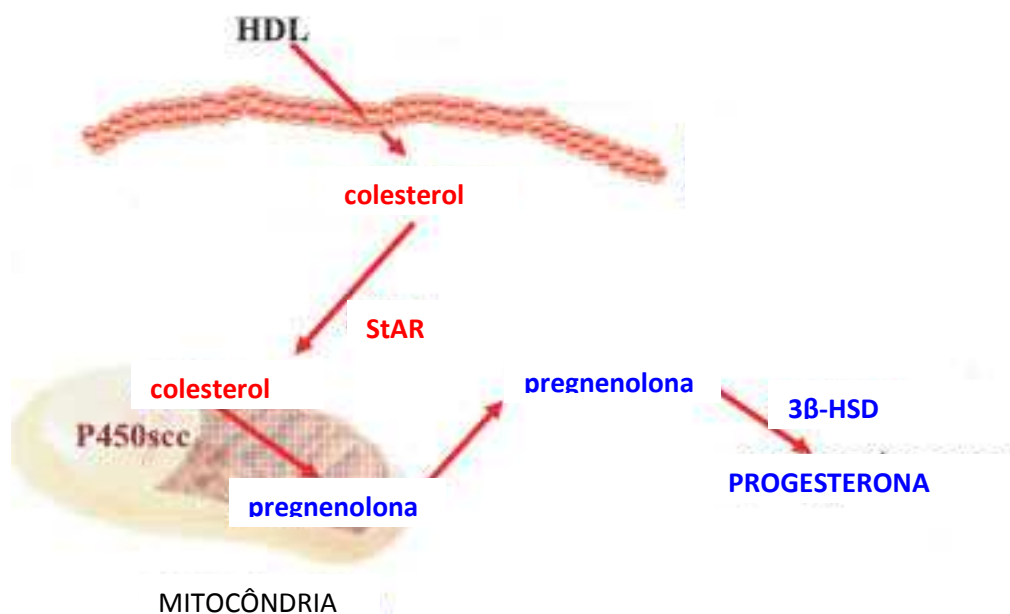


Figura 3: Esquema representativo da esteroidogênese até a formação da progesterona. Adaptado de STOCCO, 2007.

A luteólise é a finalização do corpo lúteo, que deve acontecer para que o ovário continue suas funções normais. É um evento que acontece em duas fases; a primeira é a diminuição da produção de progesterona, e a segunda é a regressão estrutural do corpo lúteo propriamente dito. O estímulo com $\text{PGF2}\alpha$ inicia a primeira fase da luteólise, pois age diminuindo a esteroidogênese e tornando o corpo lúteo insensível a outras moléculas, como o LH e a prolactina. São duas as ações que marcam a segunda fase da luteólise: a apoptose que acontece nessas células, e o reestabelecimento do suprimento vascular, que vem associado com tecido conectivo e fibroblastos. De acordo com Skarzynski et al (2005), o óxido nítrico (NO) pode ser considerado a molécula responsável pelas ações da $\text{PGF2}\alpha$ no corpo lúteo. Ao fim desse processo, ocorre a formação de uma cicatriz na superfície do ovário.

Fosfodiesterases

Onze famílias de fosfodiesterases (PDEs) já foram classificadas de acordo com a sua família gênica, suas propriedades bioquímicas e sua sensibilidade aos agentes farmacêuticos. PDEs exibem um mecanismo de feed-back negativo entre as suas diferentes famílias, o que permite, por exemplo, que a ativação da PDE5 influencie a ativação da PDE3, ocorrendo assim uma alteração dos níveis de nucleotídeos cíclicos (DENNINGER, 1999).

A PDE5 encontra-se em grande quantidade no corpo cavernoso, nas plaquetas, e nas musculaturas esquelética, lisa vascular e visceral (BALLARD et al, 1998), e é caracterizada por hidrolisar especificamente o GMPc .

LUGNIER et al (1986), demonstraram pela primeira vez a presença de PDE5 nos músculos. Nesse estudo, várias substâncias foram utilizadas na tentativa de inibir a fosfodiesterase e avaliar qual seria o seu efeito nas células

musculares. A utilização do inibidor de PDE5, zaprinast, mostrou que existia um aumento dos níveis de GMPc e um efeito vasorelaxante (LUGNIER et al, 1986).

Outro estudo usando um inibidor de PDE5 com um doador de NO (óxido nítrico) na aorta sugeriu que a PDE5 medeia o efeito relaxante da via NO/GMPc (MARTIN et al, 1986). Sua inibição leva a um aumento local de GMPc, mensageiro intracelular do óxido nítrico, levando a um relaxamento do musculatura lisa (LANGTRY e MARKHAM, 1999) (Figura 2).

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, incolor, que até meados de 1980 era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis; hoje se sabe que é um importante mediador de processos intra e extracelulares (DUSSE et al, 2003).

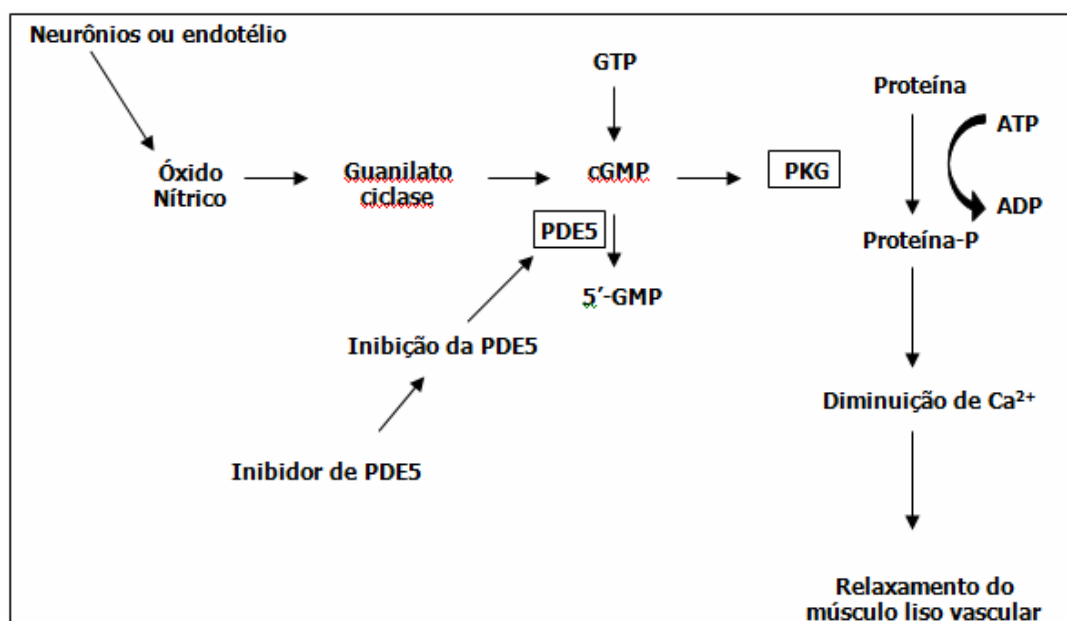


Figura 4: Esquema de relaxamento da musculatura vascular lisa mediado por uso de inibidor de fosfodiesterase 5. A inibição da fosfodiesterase aumenta os níveis intracelulares de cGMP. A concentração elevada de cGMP leva à ativação da PKG (proteín kinase G), que ativa os canais de cálcio, diminuindo seus níveis intracelulares, levando ao relaxamento do músculo (adaptado de ROSEN, KOSTIS, 2003).

Dessa maneira, os inibidores de fosfodiesterase 5 (iPDE5) foram designados como compostos anti-hipertensivos, porém, surpreendentemente durante estudos clínicos, a utilização de iPDE5 melhorou casos de disfunção sexual, apontando a PDE5 como um novo alvo para tratamento de disfunção erétil (DE). Atualmente altas doses de iPDE5 têm sido utilizadas como agente terapêutico para hipertensão pulmonar, uma vez que os altos níveis de PDE5 no pulmão estão envolvidos com mecanismos de vasorelaxamento (LUGNIER, 2006).

Recentes estudos mostram que existe PDE5 na parede vaginal anterior, semelhante ao corpo cavernoso masculino. De acordo com esses estudos imunohistoquímicos, inibidores de PDE5 podem ser usados para o tratamento de distúrbios sexuais femininas, agindo de maneira semelhante que age no homem (D'AMATI et al, 2002).

Segundo BUHIMSCHI et al (2003), a PDE5 pode ser encontrada no miométrio, endométrio, tecidos da decídua e até mesmo nos tecidos placentários de ratas. Nesse mesmo estudo, mostra-se que o uso do Sildenafil diminui a contratilidade uterina durante o parto, sugerindo que este pode ser usado para casos de parto prematuro.

Estudos recentes têm pesquisado a expressão de PDE5 em células miométriais de pacientes grávidas e não-grávidas, chegando à conclusão de que ambas expressam a PDE5, porém a atividade da hCG (Gonadotrofina coriônica humana), produzida nas grávidas, reduz a expressão e a atividade enzimática dessa fosfodiesterase nas células do músculo liso, sendo o possível motivo para a prolongada inibição da contratilidade uterina durante o período da gravidez (BELMONTE et al, 2005).

Inibidores da fosfodiesterase

Em casos de disfunção sexual são utilizados três compostos inibidores de fosfodiesterase: Citrato de Sildenafil (Viagra, Pfizer), Vardenafil (Levitra, Bayer), e Tadalafil (Cialis, Lilly). Cada um dos três iPDE5 (inibidores da fosfodiesterase 5) possui diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; são essas diferenças que levam à escolha do fármaco a ser utilizado, assim como a dose a ser aplicada (MEHROTRA et al, 2007).

O Citrato de Sildenafil foi a primeira droga a ter seu uso liberado para tratar casos de disfunção erétil (DE). A disfunção erétil pode ter várias origens: orgânica, psicogênica, e mista. Os pacientes com DE recebem doses únicas da droga, que dependem da provável causa da DE (LANGTRY et al, 1999). Essa terapia mostra-se eficiente, e cumpre objetivos básicos: é simples, o método é não-invasivo e indolor, apresenta altas taxas de sucesso, e efeitos colaterais mínimos (PFIZER, 1998).

Ultimamente, os iPDE5 têm sido utilizados como vasodilatadores em casos de hipertensão pulmonar primária infantil, caracterizada pela elevação progressiva da pressão na artéria pulmonar (KOTHARI e DUGGAL, 2002). A evolução da doença pode levar a uma falência do ventrículo direito e conseqüente morte do paciente (HUMPL et al, 2005). O processo patológico se inicia com vasoconstricção devido a uma hipertrofia do vaso, seguindo para fibrose e arteriopatia, levando a uma obstrução fixa da artéria (ABRAMS et al, 2006). Seus sintomas geralmente aparecem quando a hipertensão é grave. Como a doença não tem cura, o paciente necessita de tratamento por toda a vida, cujo foco consiste em diminuir a pressão pulmonar (OLIVEIRA, AMARAL, 2005).

O uso do Sildenafil para tratamento desses casos tem se mostrado eficiente, pois relaxa a musculatura lisa vascular e leva a uma melhora do estado

do paciente. O Sildenafil tem sido colocado como uma terapia segura e efetiva no tratamento da hipertensão pulmonar sintomática, com cerca de 80% dos pacientes mostrando bons resultados em duas semanas (CHOCKALINGAM, et al, 2003).

Alguns estudos clínicos de hipertensão pulmonar em crianças e adultos têm utilizado o Sildenafil como terapia adicional (SCHULZE-NEICK et al, 2003; STOCKER et al, 2003; KARATZA et al, 2004; HUMPL et al, 2005; KARATZA et al, 2005; OLIVEIRA, AMARAL, 2005; PRESTON et al, 2005;GANIERE et al., 2006; LOBATO et al, 2006). O Sildenafil oral tem sido administrado à crianças com quadro clínico de hipertensão pulmonar, sendo observada melhor no quadro, sugerindo que o eixo NO/GMPc deve exercer um papel importante no controle da hipertensão pulmonar primária (ABRAMS et al, 2006).

Além dos casos de hipertensão pulmonar infantil, estuda-se também a possibilidade de ação dos iPDE5 como terapia de emergência em casos de embolismo pulmonar grave (GANIÈRE et al, 2006), hipertensão pulmonar causada por hipóxia (RABINOVITCH et al, 1979), combinação de diferentes inibidores de fosfodiesterase (LOBATO et al, 2006), e a combinação dos inibidores de fosfodiesterase com NO.

A combinação de Sildenafil com NO inalado tem levado a bons resultados, e comparativamente, mais seletivos, pois agem preferencialmente no pulmão (PRESTON et al, 2005). Segundo Stocker (2003), pacientes recém-cirurgiados, em terapia concomitante de Sildenafil e NO inalado, apresentaram diminuição da resistência vascular, aumento dos efeitos vasodilatadores do NO e diminuição sistêmica da pressão sanguínea. Além disso, trabalhos recentes demonstram que o Sildenafil exerce um efeito direto sobre a expressão gênica da

NOS. O tratamento com Sildenafil por 28 dias em ratos com hipertensão pulmonar induzida levou a um aumento significativo da concentração de eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (DAI et al, 2006). Recentemente, Kim et al (2008) mostrou que utilização de inibidores de fosfodiesterase 5 podem aumentar a taxa de formação de nitrito, um composto molecular estável resultante da oxidação do NO. O acréscimo da produção de NO nessas células leva a uma maior ativação da guanilato ciclase (enzima que quebra o GTP em cGMP), aumentando os níveis de cGMP na célula. Esses estudos sugerem que os inibidores de PDE5 podem estar envolvidos em um segundo mecanismo para aumentar a concentração de cGMP intracelular.

Por ser uma classe de drogas relativamente nova, os cientistas estão focados na procura de novos usos para os inibidores de fosfodiesterase 5, além do uso na disfunção erétil e hipertensão pulmonar (SANDNER et al, 2007). Como primeira opção, encontra-se o uso dessa classe de drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares e disfunção endotelial. Comprovadamente, o tratamento oral com esse tipo de droga inibe o aumento de pressão arteriolar pulmonar, sem levar a uma diminuição da pressão sistêmica (ZHAO et al, 2001). Para dois tipos de patologia têm sido sugerido o seu uso: falência congestiva do coração e doença de Raynauds (SANDNER et al, 2007).

Acredita-se também no uso de inibidores de fosfodiesterase para tratar o sistema nervoso central, pois está constatado que há uma grande quantidade de RNA mensageiro (mRNA) da PDE5, além de uma grande quantidade da enzima presente nesses tecidos. Portanto, acredita-se que os inibidores de fosfodiesterase podem melhorar o aprendizado e a memorização, além de provavelmente agirem como reparadores dos tecidos em caso de derrame, visto que o metabolismo do NO/GMPc está envolvido nesse processo. E, por último, existem estudos para tratamento de doenças genito-urológicas que abrangem

diferentes patologias: disfunção sexual feminina, sintomas de síndrome benigna da próstata e do trato urinário inferior, bexiga hiperreativa e incontinência, ejaculação precoce e doença de Peyronie (SANDNER et al, 2007).

Papel das Fosfodiesterases na Ovogênese

Em células ovarianas de camundongos, PDE5A mRNA(uma isoforma da PDE5) foi descrito em células da granulosa, em complexos formados por células do cumulus ooforus e oócito, e em oócitos desnudos. A proteína PDE5 encontrada nessas células apresentava o mesmo peso molecular que as isoformas humanas (100kDA), e a imunocitoquímica também revelou sua expressão em células do cumulus ooforus e no oócito (SASSEVILE et al, 2005).

Sabe-se que o segundo mensageiro AMPc está intimamente ligado à regulação da maturação dos ovócitos, e que em algumas épocas do ciclo seus níveis são opostos ao de GMPc. Apesar de ocorrer uma diminuição nos níveis de GMPc no ovócito antes de terminar a meiose gamética (nos casos onde ocorreu fertilização), a indução da ovulação pela gonadotrofina está associada com aumentos dos níveis do AMPc no folículo. TSAFRIRI et al (1996) investigaram as mudanças de maturação folicular dependente de mudanças nos níveis de AMPc nas células somáticas e germinativas dos folículos ovarianos. O uso de diferentes inibidores de PDEs mostrou que as PDEs em maior quantidade e que provavelmente participam na regulação da maturação do ovócito são a PDE3 e a PDE4, não eliminando a participação das outras fosfodiesterases no processo.

Além disso, estudos têm mostrado os efeitos do GMPc nas células ovarianas. A adição de análogos do GMPc em cultura de folículo pré-antrais suprime a apoptose apresentada normalmente por estas células. Adicionalmente, na presença de FSH, os análogos do GMPc foram capazes de promover o crescimento e diferenciação desses folículos (MCGEE et al., 1997). Outro

estudo utilizando análogos do GMPc em cultura de tecido ovariano mostrou aumento de folículos viáveis quando comparados ao controle, sugerindo que o GMPc pode ser um componente necessário para o crescimento e sobrevivência folicular (SCOTT et al., 2004).

1.2 - JUSTIFICATIVA

Atualmente se sabe o mecanismo pelo qual os diferentes inibidores de PDE5 agem nas células musculares, levando a um relaxamento do músculo liso (SCHULZE-NEIKE et al, 2003). Porém, o exato mecanismo pelo qual essa classe de drogas age em outras células ainda deve ser esclarecido.

Quando usada para tratamento de disfunção erétil, os inibidores da fosfodiesterase 5 apresentam atividade em outros sistemas, não apenas na função sexual. Taylor et al (2009) mostrou que os diferentes iPDE5 possuem efeitos colaterais que podem durar de 3.9 a 14.9 horas após a ingestão do medicamento. Os efeitos agudos na visão são os mais agudos, e incluem efeitos como retinopatia diabética, glaucoma, degeneração ocular e neuropatia isquêmica (LATIES, 2009; GRUNWALD, KOPPIKER, 1999; Ophthalmologists warn of Viagra visual problems, 1998). Em outro estudo (LANGTRY, MARKHAM, 1999), os pacientes apresentaram em sua maioria sintomas mais leves, como vasodilatação periférica, apresentada por rubor e cefaléia, sendo geralmente de intensidade leve ou moderada. Este estudo também revelou que pode haver dispepsia, congestão nasal e infecções do trato urinário em cerca de 5% dos pacientes. Além disso, foi observado que o número de casos de infarto do miocárdio foi maior nos pacientes submetidos a tratamento (ANDERSON et al, 2004).

Recentemente, essa classe de drogas tem sido avaliada quanto ao seu uso no tratamento de hipertensão pulmonar, em crianças e adultos, funcionando como relaxante vascular. Por ser uma droga que é usada em maior escala há pouco tempo, não se sabe quais serão suas conseqüências a longo prazo. Os inibidores de PDE5 possuem diferentes potências e seletividades para PDE5; o Vardenafil foi selecionado para este estudo, por ser o mais potente de todas as

drogas (MEHROTRA et al, 2007). Pela falta de maiores esclarecimentos sobre as conseqüências do seu uso contínuo, faz-se necessário esclarecer o mecanismo de ação desta droga sobre as células do paciente submetido à terapia oral.

1.3 - OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Analisar a ação do Vardenafil sobre a ovogênese de camundongos *Swiss webster*.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar o efeito do tratamento *in vivo* do Vardenafil na concentração de 5 mg/kg/dia de sobre a ovogênese de camundongos fêmeas adultas através de morfologia e morfometria ovariana, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia óptica;

- Avaliar possíveis alterações na produção de progesterona e nas enzimas da via esteroidogênica após o tratamento de camundongos fêmeas adultas após tratamento com Vardenafil na concentração de 5 mg/kg/dia;

- Avaliar alterações no perfil lipídico dos animais submetidos ao tratamento;

- Analisar a ação do tratamento com Vardenafil na concentração de 5 mg/kg/dia sobre a fertilidade das fêmeas.

1.4 - REFERÊNCIAS

- ABRAMS, D.; SCHULZE-NEICK, I.; MAGEE, A. G. 2006. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. **Heart** **2000**; 84:e4.
- ANDERSON, P. C.; GOMMERSALL, L.; HAYNE, D.; ARYA, M.; PATEL, H. R. 2004. New phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. **Expert Opin Pharmacother**. Nov;5(11):2241-9.
- BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. 1998. Effects of Sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **The Journal of Urology**. Jun;159(6):2164-71.
- BELMONTE, A.; TICCONI, C.; DOLCI, S.; GIORGI, M.; ZICARI, A.; LENZI, A.; JANNINI, A.; PICCIONE, E. 2005. Regulation of phosphodiesterase 5 expression and activity in human pregnant and non-pregnant myometrial cells by human chorionic gonadotropin. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**. 12:570-577.
- BUHIMSCHI, C. A.; GARFIELD, R. E.; WEINER, C. P.; BUHIMSCHI, I. A. 2003. The presence and function of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. **American Journal of Obstetrics and gynecology**; 190:268-274.
- CHOCKALINGAM, A.; GNANAVELU, G.; VENKATESAN, S.; ELANGO VAN, S.; JAGANNATHAN, V.; SUBRAMANIAM, T.; ALAGESAN, R.; DORAIRAJAN, S. 2003. Efficacy and optimal dose of Sildenafil in primary pulmonary hypertension. **Internacional Journal of Cardiology**; 99:91-95.

- D'AMATI, G.; GIOLA, C. R. T.; BOLOGNA, M.; GIORDANO, D.; GIORGI, .; DOLCI, S.; JANNINI, E. A. 2002. Type 5 phosphodiesterase expression in the human vagina. **Urology**; 60:191-195.
- DAI, Z. K.; TAN, M. S.; CHAI, C. Y.; CHOU, S. H.; LIN, P. C.; YEH, J. L.; JENG, A. Y.; CHANG, C. I.; CHEN, I. J.; WU, J. R. 2006. Effects of Sildenafil on Pulmonary Hypertension and Levels of ET-1, eNOS, and cGMP in Aorta-Banded Rats. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**. Jun;231(6):942-7.
- DENNINGER, J. W., MARLETTA, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta** 1411; 334-350.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M G. 2003. Revisão sobre Óxido Nítrico. **Jornal brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**; Rio de Janeiro, 39(4):343-350.
- EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol Reprod**. 1996 Jan;54(1):197-207.
- ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reprod Biol Endocrinol**; Feb 5;1:9.
- GANIÈRE, V.; FEIHL, F.; TAGAN, D. 2006. Dramatic beneficial effects os Sildenafil in recurrent massive pulmonary embolism. **Intensive Care Med**;32:452-454.
- GRUNWALD, J. E.; KOPPIKER, N. P. 1999. Visual adverse events in patients with eye disorders who received Sildenafil for the treatment of erectile dysfunction [abstract]. **Macula Society Meeting**; Feb 24-7. San Diego (CA).

- HUMPL, T.; REYES, J. T.; HOLTBY, H.; STEPHENS, D.; ADATIA, I. 2005. Beneficial effect of oral Sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension. **Circulation**; 111:3274-3280.
- KARATZA, A. A.; NARANG, I.; ROSENTHAL, M.; BUSH, A.; MAGEE, A. G. 2004. Treatment of primary pulmonary hypertension with oral Sildenafil. **Respiration** 2004; 71:192-194.
- KARATZA, A. A.; BUSH, A.; MAGEE, A. G. 2005. Safety and efficacy of Sildenafil therapy in children with pulmonary hypertension. **Internacional Journal of Cardiology**;100:267-273.
- KIM, K. O.; PARK, S. Y.; HAN, C. W.; CHUNG, H. K.; RYU, D. H.; HAN, J. S. 2008. Effect of sildenafil citrate on interleukin-1 β -induced nitric oxide synthesis and iNOS expression in SW982 cells **Experimental and Molecular Medicine**. Jun 30;40(3):286-93.
- KOTHARY, S. S.; DUGGAL, B. 2002. Chronic oral Sildenafil therapy in severe pulmonary artery hypertension. **Indian Heart Journal**; 54:404-409.
- LANGTRY, H. D.; MARKHAM, A 1999. Sildenafil - A review of its use in erectile dysfunction. **Drugs**;57(6):967-989.
- LAPOLT, P. S. 2002.Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. **Reproductive BioMedicine Online** Jan-Feb;6(1):15-23.
- LATIES, A. M. 2009. Vision disorders and phosphodiesterase type 5 inhibitors: a review of the evidence to date. **Drug Saf.**;32(1):1-18. doi: 10.2165/00002018-200932010-00001.
- LOBATO, E. B.; BEAVER, T.; MUELSCHLEGEL, J.; KIRBY, D. S.; KLODELL, C.; SIDI, A. 2006. Treatment with phosphodiesterase inhbitors type III and V: milrinone and Sildenafil is an effective combination during thromboxane-induce acute pulmonary hypertension. **British Journal of Anaesthesia**;96(3):317-322.

- LUGNIER, C. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & therapeutics** **109**; 366-398.
- LUGNIER C, SCHOEFFTER P, LE BEC A, STROUTHOU E, STOCLET JC. 1986. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. **Biochem Pharmacol**. May 15;35(10):1743-51.
- MARTIN W, FURCHGOTT RF, VILLANI GM, JOTHIANANDAN D. 1986. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. **J Pharmacol Exp Ther**. May;237(2):539-47.
- MC GEE, E., SPEARS, N., SAWAKO, M., HSU, S. Y., CHUN, S. Y., BILLIG, H., HSUEH, A. J. W. – Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology** 138(6); 2417-2424. 1997.
- MEHROTRA N., GUPTA M., KOVAR A., MEIBOHM B. 2007. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy. **Int J Impot Res**. May-Jun;19(3):253-64.
- MEYER, G. T.; BRUCE, N. W. Structural and functional reserve of steroidogenic membranes in stimulated luteal cells of pregnant rats. 1991. **J Anat.**; August; 177: 31–40.
- MONNIAUX, D.; HUET, C.; BESNARD, N.; CLEMENT, F.; BOSC, M.; PISSELET, C.; MONGET, P.; MARIANA, J. C. 1997. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **J Reprod Fertil Suppl**;51:3-23.

- NELSON, S. E.; MCLEAN, M. P.; JAYATILAK, P. G.; GIBORI, G. 1992. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. **Endocrinology**; Feb;130(2):954-66
- NISWENDER, G. D. ; JUENGEL, J. L. ; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol Rev.**; Jan;80(1):1-29
- Oftalmologists warn of Viagra visual problems. 1998. **Scrip** , May 27-29 (2338-2339):23.
- OLIVEIRA, E. C.; AMARAL, C. F. S. 2005. Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria**;81(5):390-394.
- PEDERSEN, T.; PETERS, H. 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **J Reprod Fertil.**; Dec;17(3):555-7.
- PETERS, H. 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. **Acta Endocrinol (Copenh)**; Sep;62(1):98-116.
- PFIZER. Monografia do produto. Copyright Laboratórios Pfizer Ltda. 1998.
- PRESTON, I. R.; KLINGER, J. R.; HOUTCHES, J.; NELSON, D.; FARBER, H. W.; HILL, N. S. 2005. Acute and pulmonary effects of Sildenafil in patients with pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Medicine**;99:1501-1510.
- RABINOVITCH, M.; GAMBLE, W.; NADAS, A. S.; MIETTINEN, O. S.; REID, L. 1979. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. **The American journal of physiology**; 236:H818-H827.
- ROSEN, R. C.; KOSTIS, J. B. 2003. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. **The American Journal of Cardiology**; Nov 6;92(9A):9M-18.

- SANDNER, P.; HÜTTER, J.; TINEL, H.; ZIEGELBAUER, K.; BISCHOFF E. 2007. PDE5 inhibitors beyond erectile dysfunction. **Int J Impot Res.** 2007 Nov-Dec;19(6):533-43.
- SASSEVILLE, M.; GUILLEMETTE, C.; COULOMBE, Z.; RICHARD, F. 2005. Detection and Potential Role of 3'-5'-Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP)-Specific Phosphodiesterase 5A (PDE5A) in Porcine Ovary . **Fertility and Sterility**, 84; S397. Abstract.
- SCHULZE-NEICK, I.; HARTENSTEIN, P.; LI, J.; STILLER, B.; NAGDYMAN, N.; HÜBLER, M.; BUTROUS, G.; PETROS, A.; LANGE, P.; REDINGTON, A. N. 2003. Intravenous Sildenafil is a potent pulmonary vasodilator in children with congenital heart disease. **Circulation**;108[suppl II]:II-167-II-173.
- SCHWARZ, E. R., KAPUR, V., RODRIGUEZ, J., RASTOGI, S., ROSANIO, S. 2007. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int J of Impot Research**, 19; 139-148.
- SCOTT, J. E., ZHANG, P., HOVATTA, O. 2004. Benefits of 8-bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) in human ovarian cortical tissue culture. **Reproductive BioMedicine Online** March 8(3); 319-324.
- SILVA, José Roberto Viana. *Estudo do desenvolvimento folicular inicial e atresia em ovários caprinos*. Fortaleza, UECE, 2004. Disponível na internet:
<http://www.uece.br/ppgcv/doutorado2004/joserobertovianasilva.pdf>
- SKARZYNSKI, D. J. ; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. 2005. Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domest Anim Endocrinol.** Aug;29(2):340-6. Epub 2005 Feb 24

- SKINNER, M. K. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Update**; Sep-Oct;11(5):461-71. Epub 2005 Jul 8.
- STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. 2007. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. **Endocrine Reviews** 28 (1): 117-149.
- STOCKER, C.; PENNY, D. J.; BRIZARD, C. B. P.; COCHRANE, A. D.; SOTO, R.; SHEKERDEMIAN, L. S. 2003. Intravenous Sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. **Intensive Care Medicine**;29:1996-2003.
- TAYLOR, J.; BALDO, O. B.; STOREY, A.; CARTLEDGE, J.; EARDLEY, I. 2009. Differences in side-effect duration and related bother levels between phosphodiesterase type 5 inhibitors. **BJU Int.** Jan 20. [Epub ahead of print]
- TSAFRIRI, A.; CHUN, S. Y.; ZHANG, R.; HSUEH, A. J. W.; CONTI, M. 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Developmental Biology**;178:393-402.
- ZHAO, L.; MASON, N. A.; MORRELL, N. W.; KOJONAZAROV, B.; SADYKOV, A.; MARIPOV, A.; MIRRAKHINOV, M. M.; ALDASHEV, A.; WILINS, M. R. 2001. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**; 104: 424-428.
- WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, J. J. ; FORTUNE, J. E. 1996. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biol Reprod.**; Nov;55(5):942-8.

CAPÍTULO II

Elsevier Editorial System(tm) for Reproductive Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITOR ALTERS FOLLICLE DEVELOPMENT AND LUTEAL CELL MORPHOLOGY

Article Type: Full Length Article

Keywords: iPDE5; follicle; corpora lutea; ultraestructure, HDL.

Corresponding Author: Dr^a Christina Alves Peixoto, PhD

Corresponding Author's Institution: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

First Author: MARIANA A DONATO, Ms

Order of Authors: MARIANA A DONATO, Ms; KARINA L SARAIVA, MS; AMANDA K SILVA, Bs; MARIA I WANDERLEY, PhD; Christina Alves Peixoto, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Vardenafil citrate is a potent vasodilator with use in the treatment of patients with erectile dysfunction. Its mechanism of action is based on selective inhibition of phosphodiesterase-5 (PDE5), specific to guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). Recently, the chronic treatment with Vardenafil has been used successfully in cases of pulmonary hypertension, and despite being used in high doses for long periods, little is known about its effects on other systems. In the present work, mice were daily treated with 5mg/Kg Vardenafil for 4 weeks, afterwards, the ovaries were collected for morphological analyses and the sera for biochemical assays. This study demonstrates that treatment with Vardenafil decreased HDL serum levels and antral follicle numbers, and induced a minor lipid content in luteal cells, suggesting that induce high levels of cGMP may affect the follicular development.

ABSTRACT

Vardenafil citrate is a potent vasodilator with use in the treatment of patients with erectile dysfunction. Its mechanism of action is based on selective inhibition of phosphodiesterase-5 (PDE5), specific to guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). Recently, the chronic treatment with Vardenafil has been used successfully in cases of pulmonary hypertension, and despite being used in high doses for long periods, little is known about its effects on other systems. In the present work, mice were daily treated with 5mg/Kg Vardenafil for 4 weeks, afterwards, the ovaries were collected for morphological analyses and the sera for biochemical assays. This study demonstrates that treatment with Vardenafil decreased HDL serum levels and antral follicle numbers, and induced a minor lipid content in luteal cells, suggesting that induce high levels of cGMP may affect the follicular development.

Keywords: iPDE5; follicle; corpora lutea; ultrastructure, HDL.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ

Ministério da Saúde

Reproductive Toxicology Editorial Office

April 13th, 2009

Dear Editor,

The authors of “PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITOR ALTERS FOLLICLE DEVELOPMENT AND LUTEAL CELL MORPHOLOGY” warrant that this contribution is original and they have full power to make this grant. The authors accept responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors.

Sincerely,

Mariana Donato

Karina Saraiva

Amanda Silva

Maria Wanderlei

Christina Peixoto

CONFLICT OF INTEREST

The authors disclose that there is no conflict of interest.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ

Ministério da Saúde

Reproductive Toxicology Editorial Office

April 13th, 2009

Dear Editor,

We are pleased to submit to the Reproductive Toxicology journal the manuscript entitled: "PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITOR ALTERS FOLLICLE DEVELOPMENT AND LUTEAL CELL MORPHOLOGY". The present results demonstrated that PDE5 inhibitor indubitably alters luteal cell morphometry and ultrastructure, probably induced via cGMP accumulation or altered HDL serum levels. These data should be taken in account, since this therapeutic scheme has been extensively used worldwide in patients with pulmonary hypertension disorders. This is the first research about this subject and constitutes an important contribution to toxicological knowledge.

Sincerely,

Christina Peixoto

cpeixoto@cpqam.fiocruz.br

Running title: Luteal cells altered by iPDE5

**PHOSPHODIESTERASE 5 INHIBITOR ALTERS FOLLICLE
DEVELOPMENT AND LUTEAL CELL MORPHOLOGY**

^aMARIANA ARAGÃO MATOS DONATO, ^{a,b}KARINA LIDIANNE
ALCÂNTARA SARAIVA, ^aAMANDA KAROLINA SOARES E SILVA,
^cMARIA INÊS WANDERLEY AND ^{a,b}CHRISTINA ALVES PEIXOTO

^aLaboratório de Ultraestrutura do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ),

^bCentro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ^cDepartamento de
Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Mailing adress: Dr^a. Christina A. Peixoto, Laboratório de Ultraestrutura,
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n,
Recife, Brasil. CEP 50670-420. Email: cpeixoto@cpqam.fiocruz.br.

ABSTRACT

Vardenafil citrate is a potent vasodilator with use in the treatment of patients with erectile dysfunction. Its mechanism of action is based on selective inhibition of phosphodiesterase-5 (PDE5), specific to guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). Recently, the chronic treatment with Vardenafil has been used successfully in cases of pulmonary hypertension, and despite being used in high doses for long periods, little is known about its effects on other systems. In the present work, mice were daily treated with 5mg/Kg Vardenafil for 4 weeks, afterwards, the ovaries were collected for morphological analyses and the sera for biochemical assays. This study demonstrates that treatment with Vardenafil decreased HDL serum levels and antral follicle numbers, and induced a minor lipid content in luteal cells, suggesting that induce high levels of cGMP may affect the follicular development.

Keywords: iPDE5; follicle; corpora lutea; ultrastructure, HDL.

INTRODUCTION

Nowadays a great number of pathologies remain unsolved, disgardless all the academic and pharmaceutical research. Intracellular signaling plays a major role by governing normal and pathological cell responses. Some alterations on intracellular signaling seem to be involved in fertility dysfunctions.

Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) are ubiquitous nucleotides that, in concert with calcium and IP₃, orchestrate intracellular signaling. cAMP and cGMP, activate protein kinase A (PKA), protein kinase G (PKG), exchange protein activated directly by cAMP (EPAC), cyclic-nucleotide-gated channel (CNG). PKA and PKG control important cellular responses such as intracellular calcium, cell proliferation, inflammation and transcription (Lugnier, 2006) [1].

Cyclic nucleotides synthesis is dependent of adenylyl and guanylyl cyclases, whereas their degradation is related to the multigenic cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) activity. Eleven families of PDEs have been classified according to the genes of which they are products, their biochemical properties, regulation and their sensitivity to pharmacological agents (Denninger, 1999) [2].

In human, bovine, and rat smooth muscle, PDE5 was purified and characterized as a cytosolic PDE that specifically hydrolyses cGMP. PDE5

1 was first implicated in vasorelaxation, since inhibition with zaprinast was
2 shown to induce an increase in cGMP levels and a vasorelaxation effect
3 (Lugnier et al., 1986) [3]. Other studies, using an inhibitor of PDE5 with a
4 NO donor on the aorta suggested that PDE5 mediates NO/cGMP relaxing
5 effect (Martin et al., 1986) [4]. In that way, PDE5 inhibitors (iPDE5) were
6 designed as anti-hypertensive compounds; in the clinical trials,
7 surprisingly, iPDE5 ameliorated erectile dysfunction, pointing out PDE5 as
8 a new target for erectile dysfunction. Recently high doses of iPDE5 have
9 been used as a novel therapeutic agent for pulmonary hypertension since
10 high levels of PDE5 on the lung are involved with vasorelaxation
11 mechanisms (Lugnier, 2006) [1].

12 Cyclic nucleotides cGMP and cAMP have different effects
13 depending on the cell type. In the ovary, the role of cAMP is well known,
14 and the actions of LH and FSH on ovarian functions are believed to be
15 mediated in large part through its increased production. On the other hand,
16 cGMP concentrations are shown to be regulated in an inverse manner
17 compared to cAMP in the ovary, in certain phases of cycle (LaPolt, 2002)
18 [5].

19 Many studies have reported effects of cGMP on ovarian cells. On
20 culture of preantral follicles, the addition of analogs of cGMP in the culture
21 suppresses apoptosis; besides, in the presence of FSH, it promotes their
22 growth and differentiation (McGee et al., 1997) [6]. Other studies using

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

analogs of cGMP on ovarian tissue culture, showed an enhancement of viable follicles when compared to the control, suggesting that cGMP may be a necessary component as both a growth enhancer and survival factor (Scott et al., 2004) [7].

In ovarian cells, PDE5A (a PDE5 isoform) mRNA have been described in porcine granulosa cells, in cumulus-oocyte complexes and in denuded oocytes, and its product, PDE5A, presented 100 kDa, equally to human isoform. Immunocytochemistry also revealed its clear expression in cumulus cell and oocyte (Sasseville et al., 2005) [8].

The present study aims to characterize the effect of chronic treatment of Vardenafil on follicular development and corpora lutea.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Twenty-four female adult Swiss mice with 45 days old and weighting 30-35g were used. Mice were examined for health status and acclimated to the laboratory environment at 25°C and 12h light : 12h dark photoperiod. The animals were housed in metal cages and fed a standard laboratory diet. Experimental groups were composed by twelve animals; both groups received filtrated and autoclavated water. Treatment group received 5mg/kg/day of Vardenafil (LEVITRA, Bayer) in the drinking water. The treatment doses were adjusted according to previous data (Mehrotra et al., 2007; Zhao et al., 2001) [9, 10]. Estrous cycle was assessed daily as described by Marcondes et al., 2002 [11]. Animals were treated for 4 weeks, simulating the effects of chronic use of iPDE5 (Schwarz et al., 2007) [12]. All experiments were carried out according to ethical guidelines (L-080/08 – CEUA/FIOCRUZ). Body weights were recorded every day. After treatment, experimental and control animals were anesthetized before blood collection by cardiac puncture without anticoagulant. Serum was separated and stored at -70°C for RIA for progesterone (DSL, Siemens Medical Solutions Diagnostics). Ovaries were quickly dissected. All animals were in diestrus stage.

Electron transmission microscopy

Ovaries were fixed for 2hr in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, samples were washed twice in the same buffer, and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in acetone, and embedded in Spin-pon resin (Sigma Company, St Louis, MO). Polymerization was done at 60°C for 2 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Morgani ZEISS EM 109 transmission electron microscope (Saraiva et al., 2008) [13].

Morphometry

a. Optical analysis

All ovaries were collected in diestrus and were fixed in Bouin's fluid, dehydrated, and embedded in paraffin. Serial sections 4-5-µm were cut, mounted on glass slides, and placed in a 60°C oven for 30 min. Sections were then deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. From each ovary was made 30 sections, by a physical dissector method as described in Myers et al., 2004 [14], in brief, slices were obtained in a serial procedure, in which the first and last of each group of ten sections are analyzed. Slices were stained with hematoxylin-eosin and evaluated for histologic identification of ovarian compartments. Follicles stages were defined by classification proposed by Pedersen and Peters, 1968 [15].

Newly formed corpora lutea, primary follicles, secondary follicles and antral follicles were counted in 10 different sections, in eight ovaries for each group (control and experimental group), and results analyzed by parametric ANOVA. A counting frame was designed with five squares of 2500 μm^2 and the number of luteal cells was accounted in 12 pictures from distinct corpora lutea for each group and analyzed by Kruskal Wallis/ Dunn test.

b. Ultrastructural analyses

To quantify the number of lipid droplets and mitochondriae, 20 electron micrographs showing the entire cell profile and nucleus were randomly taken at the magnification of x4,400. Data were compared by Mann Withney test.

Hormone assays

Serum concentration of progesterone was measured by Radio Immuno Assay (RIA) as described in the instructions provided by manufacturer's kits (DSL, Siemens Medical Solutions Diagnostics), with sensitivity of 0.02ng/mL. Assay precision are 2,7-8,8% for intraassay coefficient of variation and 3,9-9,7% for interassay coefficient of variation. Data were analyzed with t-test to compare the progesterone levels between controls and the organisms submitted to Vardenafil treatment.

Biochemical assay

Serum was also evaluated for the lipid profile (cholesterol, HDL, LDL, VLDL and triglyceride). Serum concentrations were measured by spectrophotometer method in Integra 400 – Roche. Data were compared by t-test.

RESULTS

In optical analyses, developing follicles of Vardenafil-treated group showed no morphological difference comparing to the control group, however in treated ovaries, general view showed corpora lutea with a dense content. Also, no differences were observed in primary follicles, secondary follicles and corpora lutea counts between control and treated group. However, the number of antral follicles was significantly lower than those observed in the control samples (Table 1).

Interestingly, although the number of corpora lutea showed no significant difference between groups, the number of luteal cells in corpora lutea was higher in the treated group than observed in the non-treated females (Figure 1 and Table 1). It was not possible to distinguish small and large luteal cells, in agreement to previous observations (STOCCO et al., 2007) [16].

Ultrastructural analyses of developing follicles from the control group showed primary follicles presenting an oocyte in its interior, surrounded with granulosa cells presenting round shape, lipid droplets, endoplasmic reticulum, mitochondria, ribosomes, and nucleus with one or more evident nucleolus. Secondary follicles presented double-layered granulosa cells with similar morphology compared to primary follicle. It was possible to define theca cells, which had flat shape, lipid droplets, ribosome and elongated nucleus and nucleolus. Antral follicles presented

1 antral fluid, an oocyte surrounded by cumulus granulosa cells, mural
2 granulosa cells and theca cells (Figure 2A, C and E).
3
4

5 Vardenafil-treated group showed developing follicles with similar
6 morphology (Figure 2B, D and F).
7
8
9

10 However, analyses of luteal cells from control and treated groups
11 showed important differences. Ultrastructural analyses of luteal cells from
12 control group showed abundant lipid droplets and several mitochondria
13 with tubular cristae, scattered in the cytoplasm. Ribosomes were visible
14 near to the nucleus (Figure 3A and B). Conversely, luteal cells from
15 Vardenafil-treated group showed a minor number of mitochondria, and a
16 paucity of lipid droplets. Several ribosomes were present in cytoplasm,
17 isolated or attached to the endoplasmic reticulum (Figure 3C and D).
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Ultrastructural morphometric analyses (Table 2) were accomplished
35 for some parameters. For measuring the size of luteal cells, we calculated
36 the mean diameter of 40 cells (20 for each group). Mean diameter of
37 Vardenafil-treated group was considerably smaller than control cells. Also,
38 Vardenafil-treated cells had statistically significant lower number of
39 mitochondria and lipid droplet. In order to compare data of cell diameter
40 and number of mitochondria we used t test; however, to compare number
41 of lipid droplet we used MannWhitney test, since variance was
42 heterocedastic.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Serum progesterone was measured in both groups; however, no
2 statistical differences were observed (Table 3).
3
4

5 Biochemical tests showed no difference between groups in
6 cholesterol, LDL, triglyceride and VLDL levels. However, HDL was
7 significantly lower in Vardenafil-treated group (Table 3).
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSSION

This is the first description of chronic treatment with phosphodiesterase 5 inhibitor on follicular development. The present study demonstrates that the phosphodiesterase-5 inhibitor treatment alters the ovary physiology, suggesting that induced higher levels of cGMP may affect these cells.

According to Scott et al. (2004) [7], the use of cGMP analogue (8-Br-cGMP) in ovarian cells culture, improved the proportion of viable follicles by reducing the degree of follicle atresia. These authors suggested that the Protein kinase G (PKG), which is a cGMP-dependent protein kinase and has a broad range of targets, could represent a pivotal regulatory role in granulosa cell viability through calcium intracellular levels. Specifically, this enzyme acts to (1) stimulates calcium efflux by activating the plasma membrane calcium ATPase; (2) inhibits calcium influx by closing calcium channels; and (3) blocks IP3 receptor mediating calcium release from cellular stores (Peluso, 2003) [17]. In contrast, we observed a lower number of antral follicles in Vardenafil-treated group, probably due to an induction of the atresia. Possibly, these contrasting results may be due to different methodologies utilized, since we performed all the assays *in vivo*. Interestingly, no difference was observed in the corpora lutea counts; possibly multiple estrous cycles assays could confirm the follicle atresia process.

The luteal cells are responsible for the progesterone production, which is responsible for maintaining endometrium for early pregnancy. The synthesis of progesterone involves: (1) acquisition or synthesis of cholesterol, (2) esterification (for storage) or deesterification of cholesterol, (3) mitochondrial transport of cholesterol, (4) hydroxylation and cleavage of the cholesterol side chain to yield pregnenolone, and (5) conversion of pregnenolone to progesterone. Intracellular transport of cholesterol seems to be the rate-limiting step in progesterone biosynthesis and the step most acutely influenced by second messengers. Niswender (2002) [18] proposed a model to explain progesterone secretion in luteal cells, suggesting that activation of PKC (Protein Kinase C) inhibits progesterone synthesis in all luteal cells, and only in large-luteal cells activation of PKC causes an influx of calcium leading to cellular degeneration. In ovine luteal cells, acute activation of protein kinase C (PKC) did not alter the activity of the steroidogenic cascade enzymes p450_{scc} and β -HSD; however, progesterone production was lower in those cells (Wiltbank et al., 1993) [19]. Other studies suggest that PKC is involved with phosphodiesterase activity, regulating intracellular cGMP levels and steroidogenesis (Mukhopadhyay et al., 1988) [20]. The present results showed no differences in the progesterone serum levels, although morphological features as minor lipid and mitochondria content suggested a diminished steroidogenesis.

1 Hawkins et al. (1995) [21] showed that increased secretion of
2 progesterone has direct association with the augment of lipid inclusions in
3 cells of the corpus luteum, and was accompanied by an increase in
4 cholesterol and HDL. Likewise, in our study, Vardenafil treated group
5 showed a decrease in cellular lipid content, a decrease in serum HDL, and a
6 tendency to decrease of progesterone and LDL, VLDL, cholesterol and
7 triglyceride, which is in agreement with results obtained by these authors.
8
9

10 Ayala et al. (2007) [22] showed that chronic use of sildenafil
11 increased the energy balance and action of insulin in mice fed with diets
12 rich in fat, leading to a decrease in weight gain and fat mass, probably due
13 to higher energy expenditure, suggesting that chronic use of iPDE5 can
14 change the lipid profile. Recently, Behr-Roussel et al. (2008) [23]
15 demonstrated that treatment with Sildenafil for long-term normalized the
16 hipertrigliceridemia in the experimental model of insulin resistance.
17
18

19 Cholesterol sources in luteal cells are directly related to
20 steroidogenesis. There is evidence that SR-BI, the HDL receptor, is
21 strongly expressed during luteinization in pig; furthermore, *in vitro* studies
22 showed that its expression is not influenced by lipoprotein availability
23 (MIRANDA- JIMENEZ and MURPHY, 2007) [24]. This information
24 implicates that HDL receptor expression may be mediated by ovarian
25 stimuli and suggests that HDL is the major source of substrate for
26 steroidogenesis. TRIGATTI et al. (1999) [25] uses a homozygous null SR-
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 BI knockout mice to show that SR-BI is required for maintaining normal
2 biliary cholesterol levels, oocyte development, and female fertility.
3
4 Observing ovaries of those animals, corpora lutea showed a decrease of
5 lipid content, but progesterone levels didn't showed statistical difference
6
7 comparing to *wildtype* mice. Similarly, the present results showed no
8
9 difference in the serum progesterone levels in Vardenafil-treated animals;
10
11 however, long-term treatments could be useful for more detailed data.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 In the present study a lower number of antral follicles were observed,
21
22 probably this may be due to inadequate delivery of HDL-cholesterol for
23
24 membrane synthesis or steroidogenesis, inadequate delivery of nonsteroidal
25
26 HDL lipids (e.g., lipid-soluble vitamins), or deficiencies in HDL functions
27
28 other than selective cholesterol uptake. In addition, morphometric analysis
29
30 revealed that the group treated with Vardenafil presented corpora lutea with
31
32 elevated number of cells, although those cells were smaller than those from
33
34 the control group. Furthermore, luteal cells had significantly lower numbers
35
36 of lipid inclusions and mitochondria. These morphological changes could
37
38 be related to lower levels of HDL due to treatment with Vardenafil, which
39
40 would be necessary for normal levels of steroidogenesis.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Although striking morphological alterations were observed in the
52
53 corpora lutea, no difference was detected in the total corpora lutea number
54
55 when compared to the antral follicles, possible treatment with different
56
57 doses or therapeutic schemes could provide more obvious data.
58
59
60
61
62
63
64
65

1 We can then suggest that the phosphodiesterase-5 inhibitors can
2 interfere in luteal cells by two different mechanisms: directly by increasing
3 the concentration of intracellular cGMP intracellular or by altering the
4 HDL-cholesterol levels.
5
6
7
8
9

10 In conclusion, the chronic treatment with Vardenafil induced an
11 altered morphology of luteal cells which suggests an inhibitory effect on
12 progesterone production, probably via cGMP accumulation or altered HDL
13 serum levels. These data should be taken in account, since this therapeutic
14 scheme has been extensively used worldwide for long periods in patients
15 with pulmonary hypertension disorders. Additional experiments are in
16 development in our laboratory to a better characterization of the mode of
17 action of Vardenafil on luteal cells steroidogenesis.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 Acknowledgements: This work has been supported by Fundação Oswaldo
43 Cruz (FIOCRUZ), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
44 e Tecnológico (CNPq).
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

[1] LUGNIER, C. – Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & therapeutics* 2006; 109; 366-398.

[2] DENNINGER, J. W., MARLETTA, M. A. – Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1411; 334-350.

[3] LUGNIER C, SCHOEFFTER P, LE BEC A, STROUTHOU E, STOCLET JC. - Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochemichal Pharmacology* 1986; May 15;35(10):1743-51.

[4] MARTIN W, FURCHGOTT RF, VILLANI GM, JOTHIANANDAN D. - Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1986, May; 237(2):539-47.

[5] LAPOLT, P. S. – Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. *Reproductive BioMedicine Online* 2002, Jan-Feb; 6(1):15-23.

[6] MCGEE, E., SPEARS, N., SAWAKO, M., HSU, S. Y., CHUN, S. Y.,
BILLIG, H., HSUEH, A. J. W. – Preantral ovarian follicles in serum-free
culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine
3',5'- monophosphate pathway and stimulation of growth and
differentiation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology 1997;
138(6); 2417-2424.

[7] SCOTT, J. E., ZHANG, P., HOVATTA, O. – Benefits of 8-
bromoguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) in human
ovarian cortical tissue culture. Reproductive BioMedicine Online 2004,
March 8(3); 319-324.

[8] SASSEVILLE, M., GUILLEMETTE, C., COULOMBE, Z.,
RICHARD, F. - Detection and Potential Role of 3'-5'Cyclic Guanosine
Monophosphate (cGMP)-Specific Phosphodiesterase 5A (PDE5A) in
Porcine Ovary . Fertility and Sterility 2005, 84; S397 - S397.

[9] MEHROTRA N., GUPTA M., KOVAR A., MEIBOHM B. - The role
of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5
inhibitor therapy. International Journal of Impotence Research 2007, May-
Jun;19(3):253-64.

[10] ZHAO, L., MASON, N. A., MORRELL, N. W., KOJONAZAROV, B., SADYKOV, A., MARIPOV, A., MIRRAKHIMOV, M. M., ALDASHEV, A., WILKINS, M. R. – Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001, 104; 424-428.

[11] MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. – Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002, 62(4a); 609-614.

[12] SCHWARZ, E. R., KAPUR, V., RODRIGUEZ, J., RASTOGI, S., ROSANIO, S. – The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. *International Journal of Impotence Research* 2007, 19; 139-148.

[13] SARAIVA, K., ; SILVAJR, V., ; TORRES, D., ; DONATO, M., ; PERES, N., ; SOUZA, J., ; PEIXOTO, C. - Changes in mouse Leydig cells ultrastructure and testosterone secretion after diethylcarbamazine administration. *Micron (Oxford)* 2008, v. 39, p. 580-586.

[14] MYERS, M., BRITT, K. L., WREFORD, N. G. M., EBLING, F. J. P.,

1 KERR, J. B. – Methods for quantifying follicular numbers within the
2 mouse ovary. *Reproduction* 2004, 127; 569-580.
3
4
5
6

7
8 [15] PEDERSEN, T., PETERS, H. – Proposal for a classification of
9 oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and*
10 *Fertility* 1968; 17(3); 555-7.
11
12
13
14
15
16

17
18 [16] STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. - The Molecular Control
19 of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine*
20 *Reviews* 2007, 28 (1): 117-149.
21
22
23
24
25
26

27
28 [17] PELUSO, J. J. - Progesterone as a regulator of granulosa cell viability.
29 *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003, 85(2-5);
30 167-173.
31
32
33
34
35
36
37
38

39
40 [18] NISWENDER, G. D. - Molecular control of luteal secretion of
41 progesterone. *Reproduction* 2002, 123; 333-339.
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 [19] WILTBANK, M. C., BELFIORE, C. J., NISWENDER, G. D. –
52 Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK)
53 A and PKC in ovine small and large luteal cells. *Molecular and Cellular*
54 *Endocrinology* 1993., 97(1-2):1-7.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[20] MUKHOPADHYAY, A. K., LEIDENBERGER, F. A. - Effect of a tumour-promoting phorbol ester on atrial peptide-induced testosterone production and cyclic GMP accumulation by isolated mouse Leydig cells. Molecular and Cellular Endocrinology 1988, 56(1-2):171-6.

[21] HAWKINS, D. E., NISWENDER, K. D., OSS, G. M., MOELLER, C. L., ODDE, K. G., SAWYER, H. R., NISWENDER, G. D. - An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. Journal of Animal Science 1995, Vol 73, Issue 2 541-545.

[22] AYALA, J. E., BRACY, D. P., JULIEN, B. M., ROTTMAN, J. N., FUEGER, P. T., WASSERMAN, D. H. - Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. Diabetes 2007, 56(4):1025-33.

[23] BEHR-ROUSSEL, D., OUDOT, A., COMPAGNIE, S., GORNY, D., LE COZ, O., BERNABE, J., WAYMAN, C., ALEXANDRE, L., GIULIANO, F. - Impact of a long-term sildenafil treatment on pressor response in conscious rats with insulin resistance and hypertriglyceridemia. American Journal of Hypertension 2008, 21(11):1258-63.

[24] MIRANDA-JIMENEZ, L., MURPHY, B. D. - Lipoprotein receptor expression during luteinization of the ovarian follicle. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 2007,293:1053-1061.

[25] TRIGATTI B, RAYBURN H, VIÑALS M, BRAUN A, MIETTINEN H, PENMAN M, HERTZ M, SCHRENZEL M, AMIGO L, RIGOTTI A, KRIEGER M. - Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. The Proceedings of the National Academy of Sciences Online (US) 1999, Aug 3;96(16):9322-7.

Legends to figures

Figure 1 – Luteal cells. A, untreated luteal cells. B, 5mg/kg Vardenafil-treated luteal cells. Observe that vardenafil-treated cells are numerous than untreated ones (arrows). Stained with hematoxylin-eosin. Bars, 25 μ m.

Figure 2 - Follicular cells. A (primary), C (secondary) and E (antral) untreated follicles. B, D and F - 5mg/kg Vardenafil-treated follicles. Observe round granulosa cells (G) presenting nucleus (N) with two or more evident nucleolus, and elongated theca cells (T). ZP, zona pellucida; A, antrum; O, oocyte. Bars, 5 μ m (A, B, C, D); 2 μ m (E, F).

Figure 3 - Ultrathin sections of control luteal cells (3A and B) and vardenafil-treated cells (3C and D). In control group, numerous lipid droplets (L) and mitochondria (M) with tubular cristae are scattered though the cytoplasm. Ribosomes (arrows) were evident nearby to the nucleus (N). In vardenafil-treated group, observe numerous mitochondria (M), and few lipid droplets (L), compared to control group. Several ribosomes were present in cytoplasm (arrows), isolated or attached to the endoplasmic reticulum. Bars, 2 μ m (A, B); 1 μ m (C, D).

Legends to tables

Table 1 - Quantitative analysis of follicles, corpora lutea and luteal cells numbers in control and Vardenafil-treated mice. * Significant difference of antral follicles numbers between groups (ANOVA, $p < 0,05$). **Significant difference of numbers of luteal cells between Vardenafil 5mg/kg and control groups (Kruskal Wallis/ Dunn, $Z(1, 58)=4,05$, $p < 0,01$).

Table 2 - Ultrastructural morphometric analyses on luteal cells after Vardenafil treatment. *Significant difference of mean diameter between Vardenafil 5mg/kg and control samples ($t(0,05; 38)=5,2921$; $p < 0,0001$). **Significant difference of mitochondria numbers between groups ($t(0,05;38)=4,228$; $p < 0,0001$). ***Significant difference of lipid droplets numbers between groups ($Z(U)(0,05;38)=3,828$; $p < 0,001$).

Table 3 - Effect of Vardenafil treatment on mice serum progesterone, cholesterol, triglyceride, VLDL, LDL and HDL levels. *Significant difference between treated and control biochemical samples ($p < 0.01$).

Figure 1

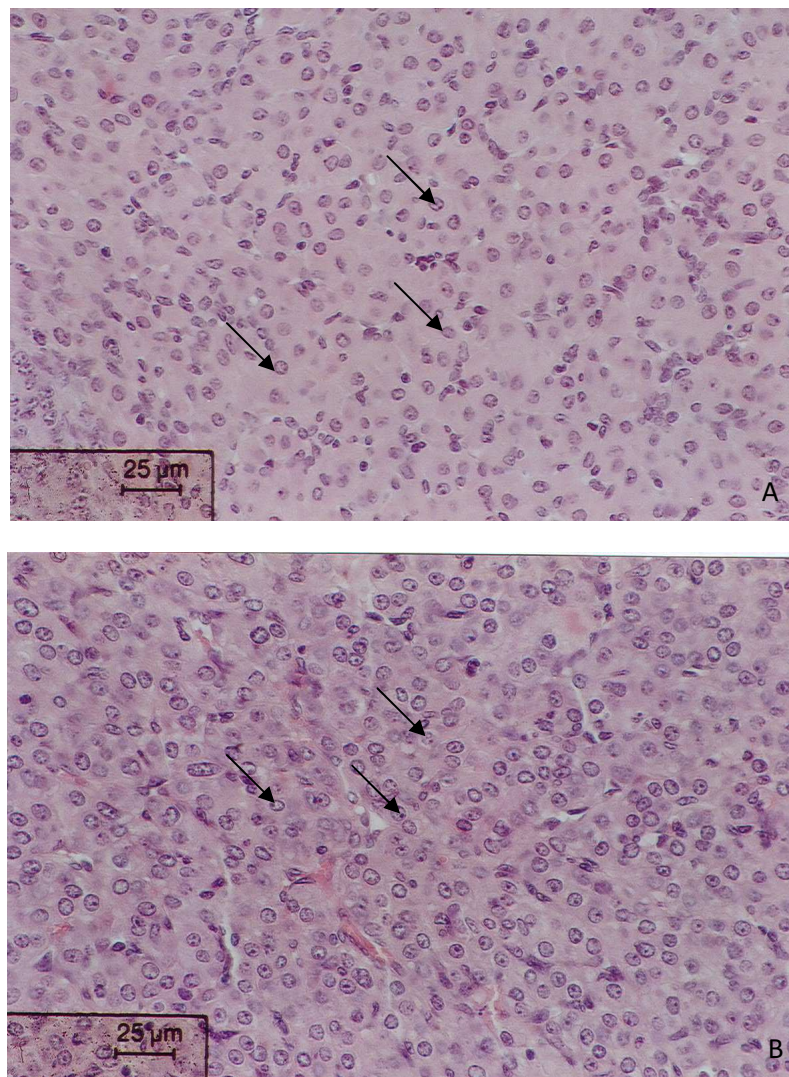


Figure 1

Figure 2

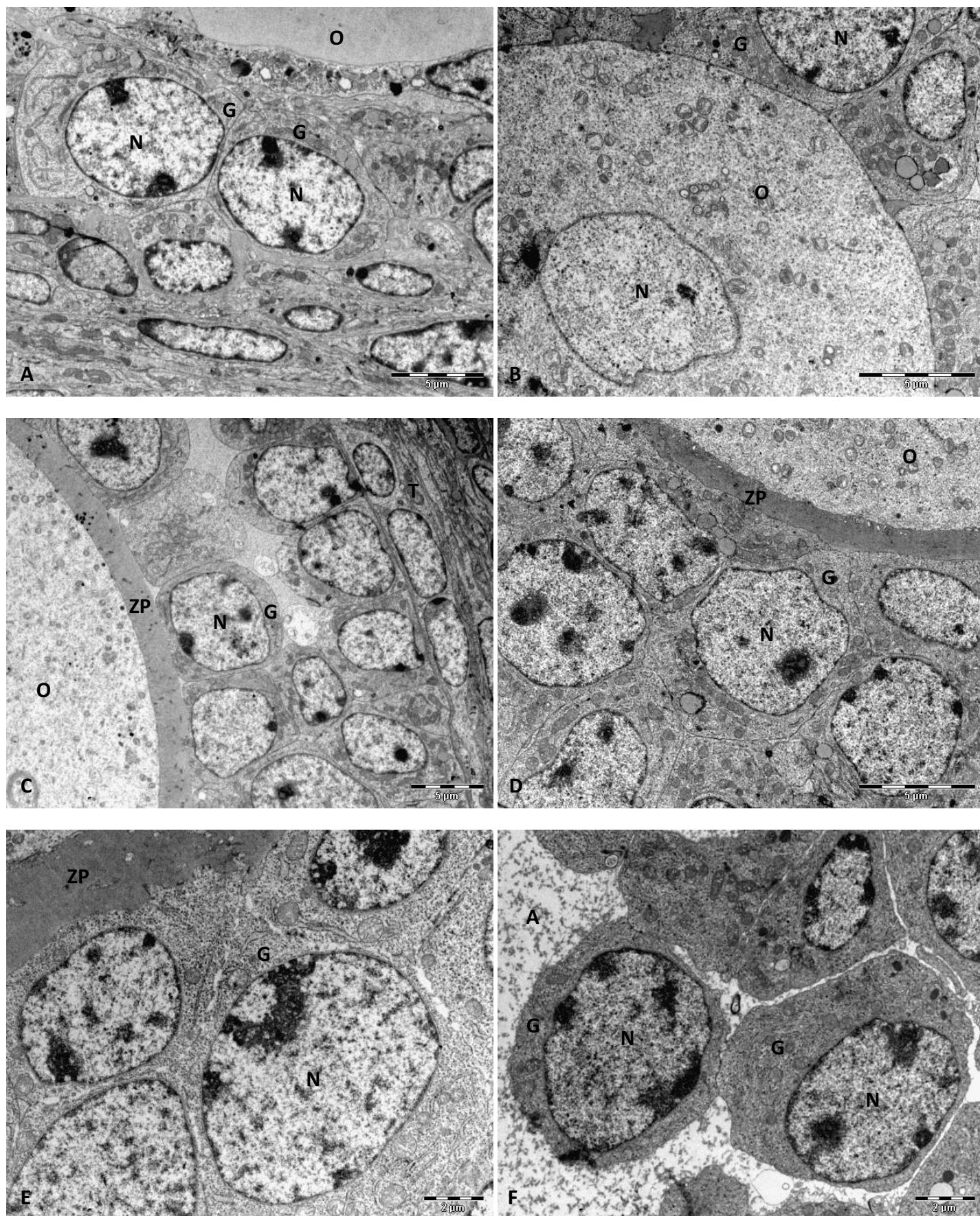


Figure 2

Figure 3

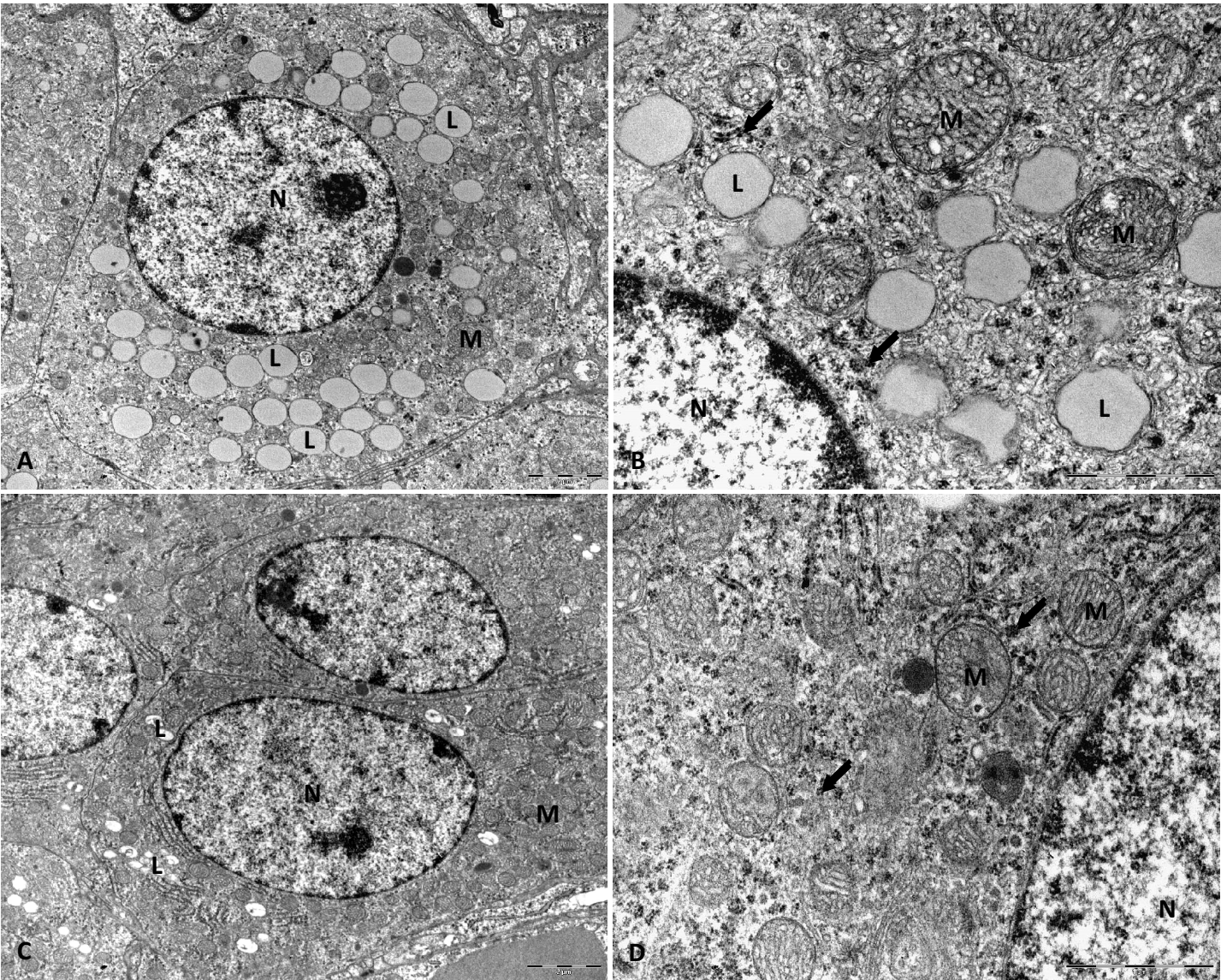


Figure 3

Table 1

	Control	Vardenafil-treated
Primary Follicles	6,513	8,2
Secondary Follicles	6,35	7,525
Antral Follicles	8,338	5,825*
Corpora Lutea	5,663	5,15
luteal cells	28,33	35,933**

Table 2

	Control	Vardenafil-treated
Mean diameter	13,088±1,538µm	10,638±1,386µm*
Mitochondria	105,1±37,087	63,35±23,979**
Lipid	54,55±27,53	24,15±12,38***

Table 3

	Control	Vardenafil-treated	P<0.01
Progesterone (ng/dL)	0,97	1,33	0,173
Cholesterol (mg/dL)	73,5	70,11	0,206
Triglyceride (mg/dL)	213,7	198,32	0,167
VLDL (mg/dL)	42,53	39,56	0,174
LDL (mg/dL)	6,14	5,23	0,178
HDL (mg/dL)	75,85	63,48*	0,00098

CAPÍTULO III

3.1 - DADOS COMPLEMENTARES

Material E Métodos

Desenho experimental

Todos os experimentos utilizando animais de biotério foram realizados de acordo com o Comitê de Ética Animal (L-080/08 – CEUA/FIOCRUZ).

Vinte e quatro fêmeas adultas de camundongo *Swiss webster* com 45 dias de idade e pesando entre 30-35g foram utilizadas. Os animais foram examinados quanto ao seu estado de saúde e foram aclimatados ao ambiente, de temperatura 25°C e ao fotoperíodo 12h claro: 12h escuro. Os animais foram colocados em caixas de metal e foram alimentados com a dieta padrão do laboratório.

Os grupos experimentais foram compostos por 12 animais. O grupo tratado recebeu 5 mg/kg/dia de Vardenafil (LEVITRA, Bayer) diluído na água (filtrada e autoclavada), cuja dose foi ajustada de acordo com o consumo diário de cada animal, conforme descrito em ZHAO et al, 2003. Para o grupo controle a água foi administrada sem nenhuma adição. Cada animal foi mantido em gaiola isolada, como forma de evitar alterações no ciclo estral.

O ciclo estral de murinos tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metestro e diestro, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal. A secreção vaginal dos animais foi coletada diariamente pela manhã, entre as 8h-10h, para avaliar possíveis alterações no ciclo estral causadas pelo uso crônico do iPDE na ciclicidade murina, por método descrito em MARCONDES et al, 2002. Os animais sofreram contenção manual, e com ajuda de uma pipeta, utilizando ponteiros plásticos limpas, eram introduzidos 10µL de solução salina (NaCl 0,9%) autoclavada na cavidade vaginal. O lavado vaginal não corado foi colocado em lâmina de vidro e observado a fresco, em microscópio ótico, com

aumento de 10x. Assim a proporção entre os três tipos celulares era reconhecida e a fase do ciclo do animal era registrada. O peso dos animais foi realizado diariamente.

Como forma de evitar falsas alterações morfológicas nos ovários, os animais só sofreram eutanásia ao se encontrarem no diestro. Com isso, o tempo de tratamento variou de 28-32 dias. Esse tempo foi determinado por Schwarz et al, 2007, como forma de simular os efeitos do uso crônico de iPDE5.

Após o tratamento, os animais do grupo controle e tratado foram anestesiados com xilasina e quetamina antes da coleta sanguínea. Esta foi realizada por punção cardíaca (sem anticoagulante), e o soro separado e armazenado a -70°C para ser utilizado nos testes bioquímicos. Cada animal teve os ovários dissecados para serem processados para microscopia eletrônica e ótica.

Morfologia

Os ovários coletados no diestro foram fixados em Bouin, desidratados e incluídos em parafina. Cortes seriados de 4-5- μ m foram realizados, montados em lâminas de vidros e mantidos à 60°C por 30 minutos. As seções foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em séries decrescentes de álcool.

Para avaliar alterações nas enzimas que compõem a cascata esteroidogênica, cortes não corados foram submetidos à técnica de imunohistoquímica. As lâminas utilizadas foram tratadas pela técnica de APES, para garantir uma melhor aderência do material. O material foi desparafinado e hidratado. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e os sítios antigênicos expostos (“steam heat incubation”). Incubou-se com o anticorpo primário, e a revelação foi realizada utilizando o kit Dako Cytomation LSAB+ System-HRP

(Código K0690, Dako Diagnósticos S. A., Barcelona). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina (para coloração do núcleo), desidratadas, clarificadas e montadas. Os anticorpos utilizados foram para localizar as enzimas StAR (sc-25806, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, California), citocromo P450scc (AB1244, Chemicon International, Inc., Canada) e 3 β -HSD (sc-30821, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, Califórnia), nas concentrações de 1:100, 1:200 e 1:100, respectivamente. Para evidenciar as imunomarcações, as fotos foram processadas no programa Picasa 3.

Resultados

Em microscopia ótica, os folículos em desenvolvimento do grupo tratado com Vardenafil não apresentaram nenhuma diferença morfológica em comparação com os folículos apresentados pelo grupo controle. Os folículos primários possuíam um oócito e uma camada de células da granulosa com formato cúbico (Figuras 1 e 2). Os folículos secundários, por sua vez, apresentaram um oócito aumentado de tamanho com uma dupla camada celular (Figuras 3 e 4). Nas figuras 5 e 6 podemos observar, em menor aumento, o perfil completo de folículos antrais do grupo controle (Figura 5) e tratado (Figura 6). Em maior aumento, podemos ver os detalhes do folículo antral, como o oócito, células do cumulus, células da granulosa murais, células da teca e o antro (Figuras 7 e 8). Note que as células presentes no corpo lúteo de animais tratados com Vardenafil (Figura 9) são mais numerosas do que as células dos animais não tratados (Figura 10).

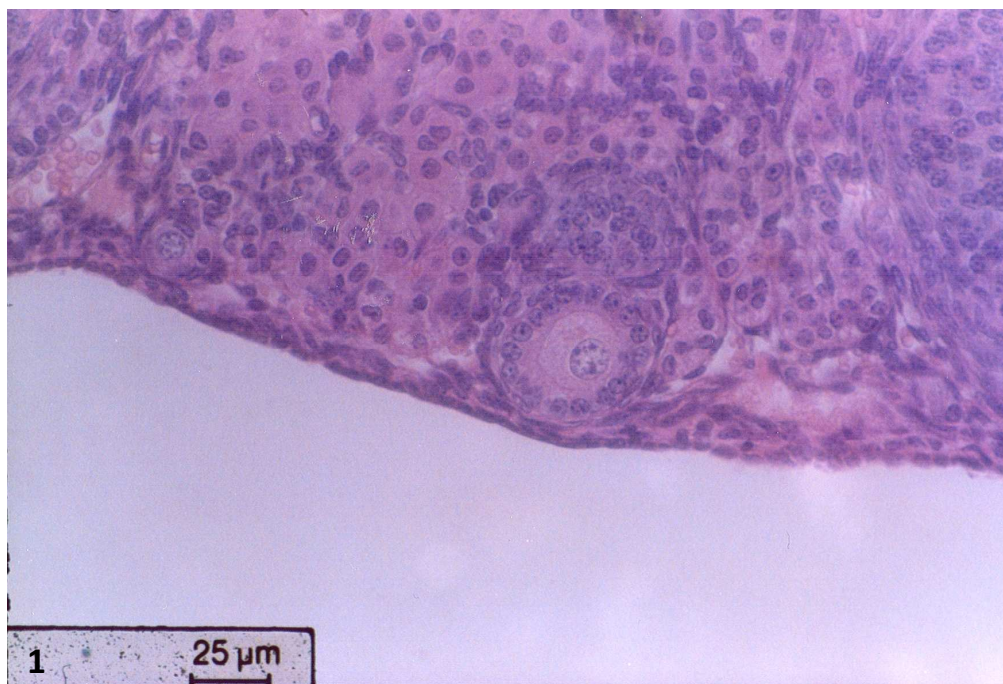


Figura 1: Folículo primário do grupo controle, próximo à superfície do ovário. Apresenta o oócito no seu interior e células da granulosa com formato cuboidal. Aumento 40x.



Figura 2: Dois folículos primários em ovário do grupo tratado, apresentando morfologia normal. Note que o folículo superior apresenta o oócito aumentado em tamanho, e em alguns locais já apresenta células da granulosa formando dupla camada, característica de folículos que estão ingressando no estágio secundário. Aumento: 40x.

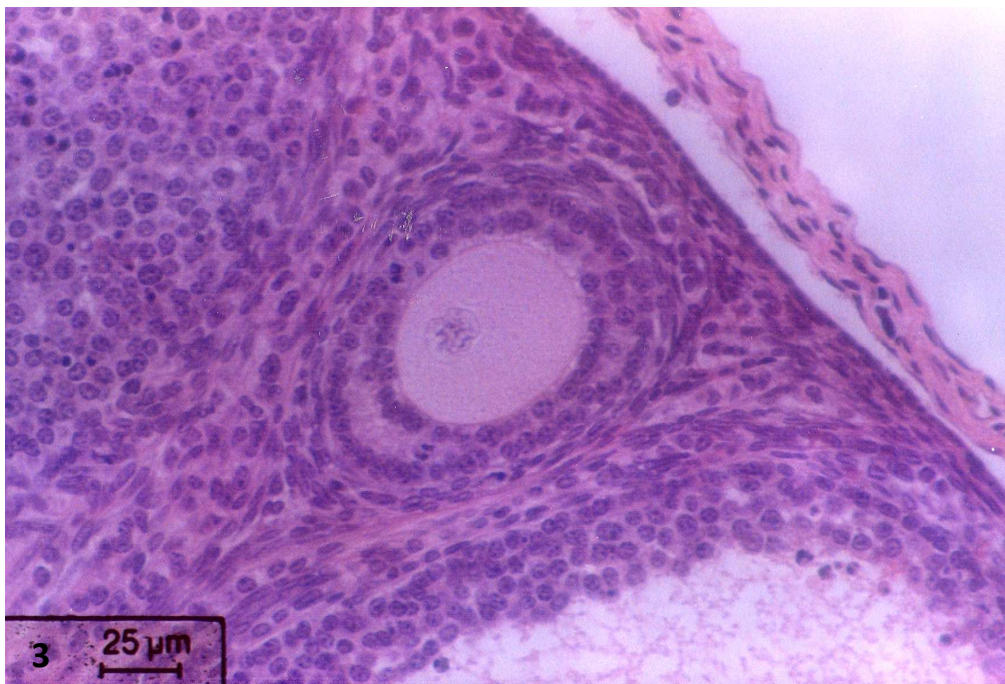


Figura 3: Micrografia de ovário do grupo controle mostrando um folículo secundário. Note que o oócito apresenta aumento de diâmetro (comparando ao folículo primário) e as células da granulosa formam uma dupla camada que envolve todo o oócito. Aumento: 40x.

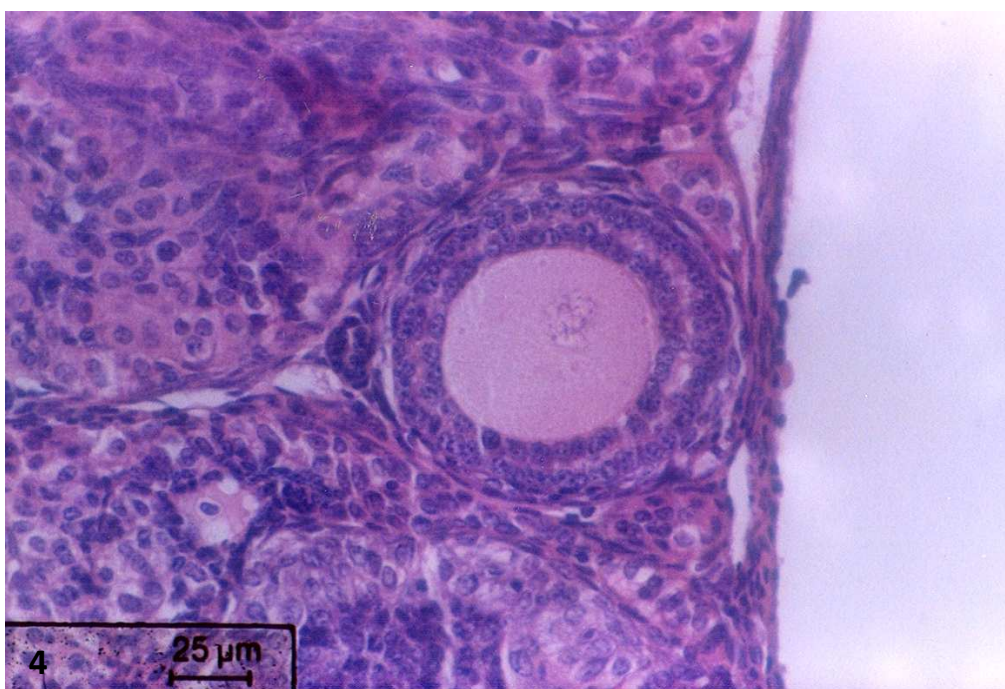


Figura 4: Folículo secundário em ovário de animal tratado com Vardenafil. Observe a morfologia similar ao folículo do grupo controle. Aumento: 40x.

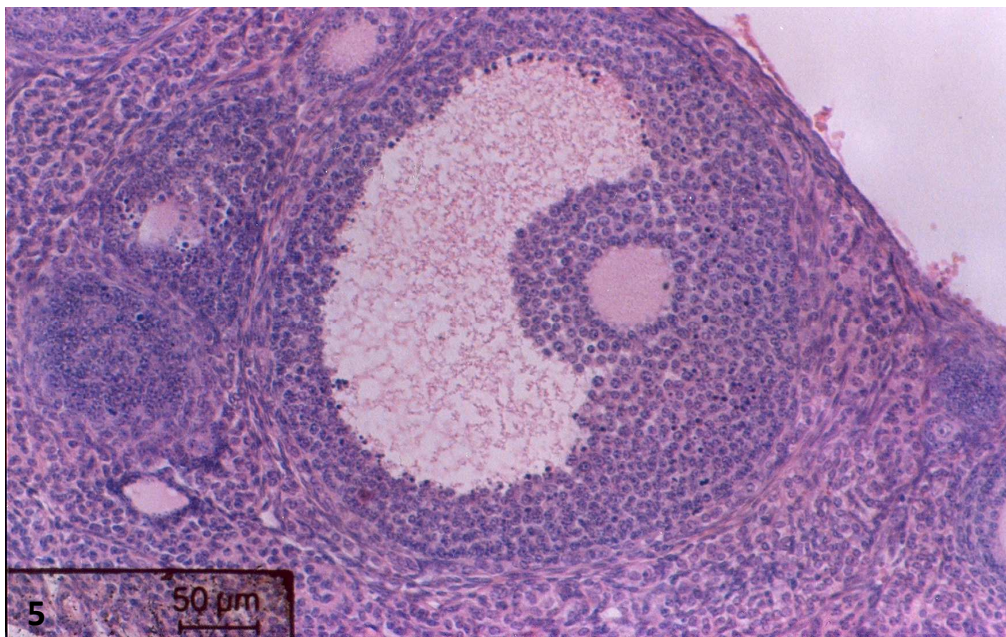


Figura 5: Folículo antral em ovário de animal não-tratado. Aumento: 20x.



Figura 6: Folículo antral em ovário de animal tratado com Vardenafil. Aumento: 20x.

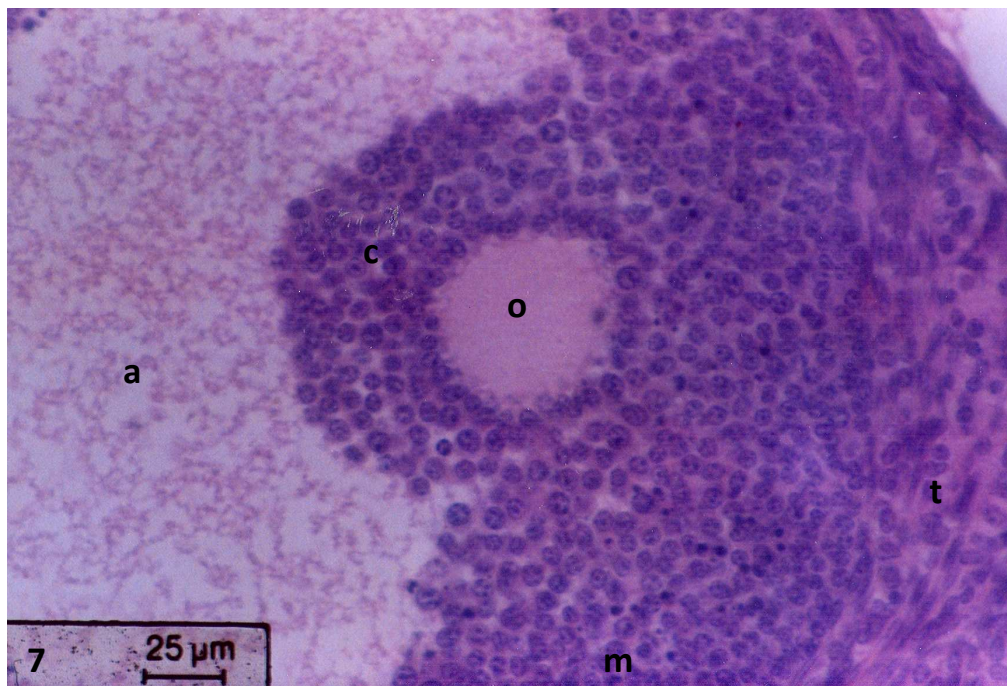


Figura 7: Micrografia mostrando um folículo antral do grupo controle. Observe o oócito (o), células granulosas do cumulus ooforus (c) e murais (m), células da teca (t) e líquido antral (a). Aumento: 40x.

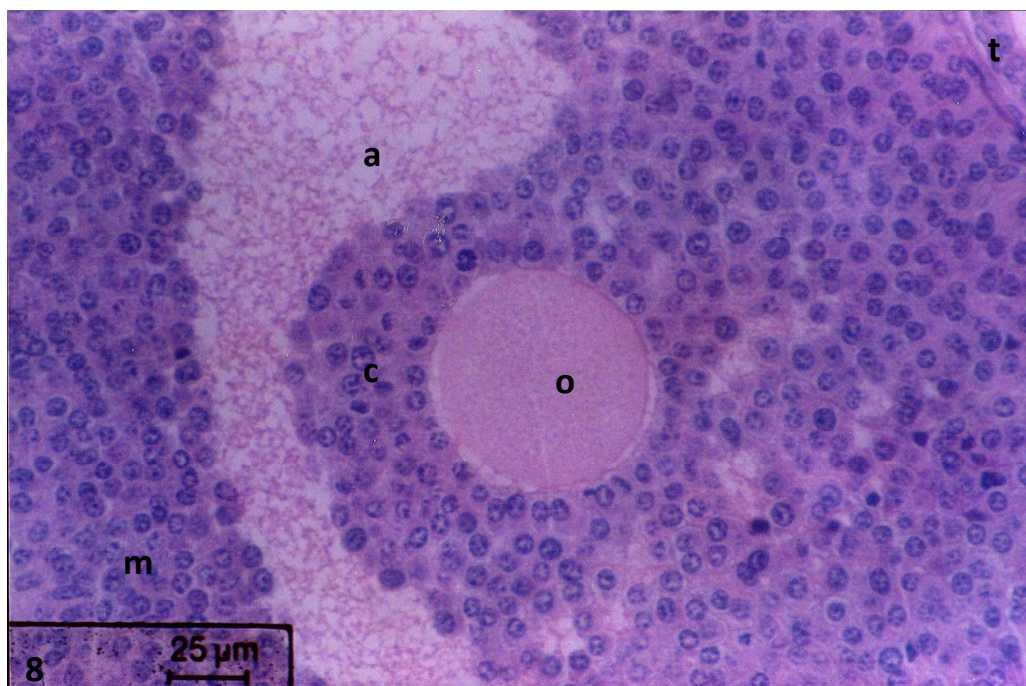
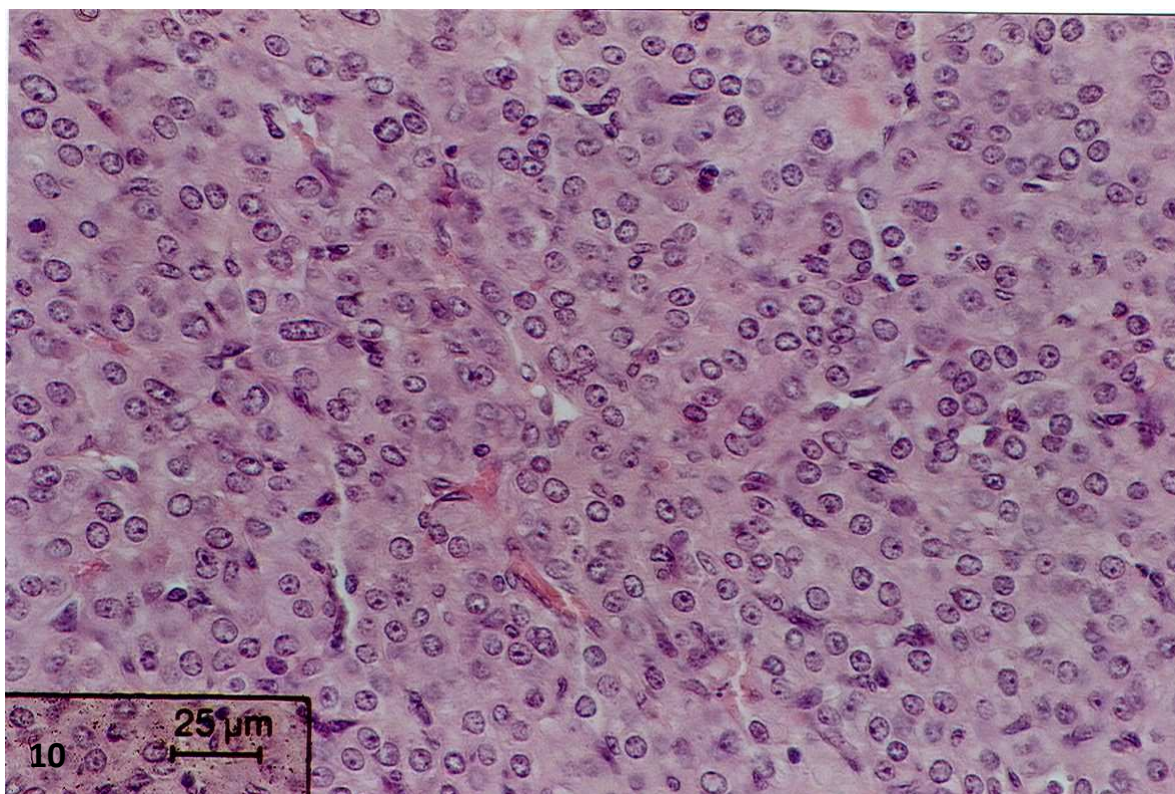
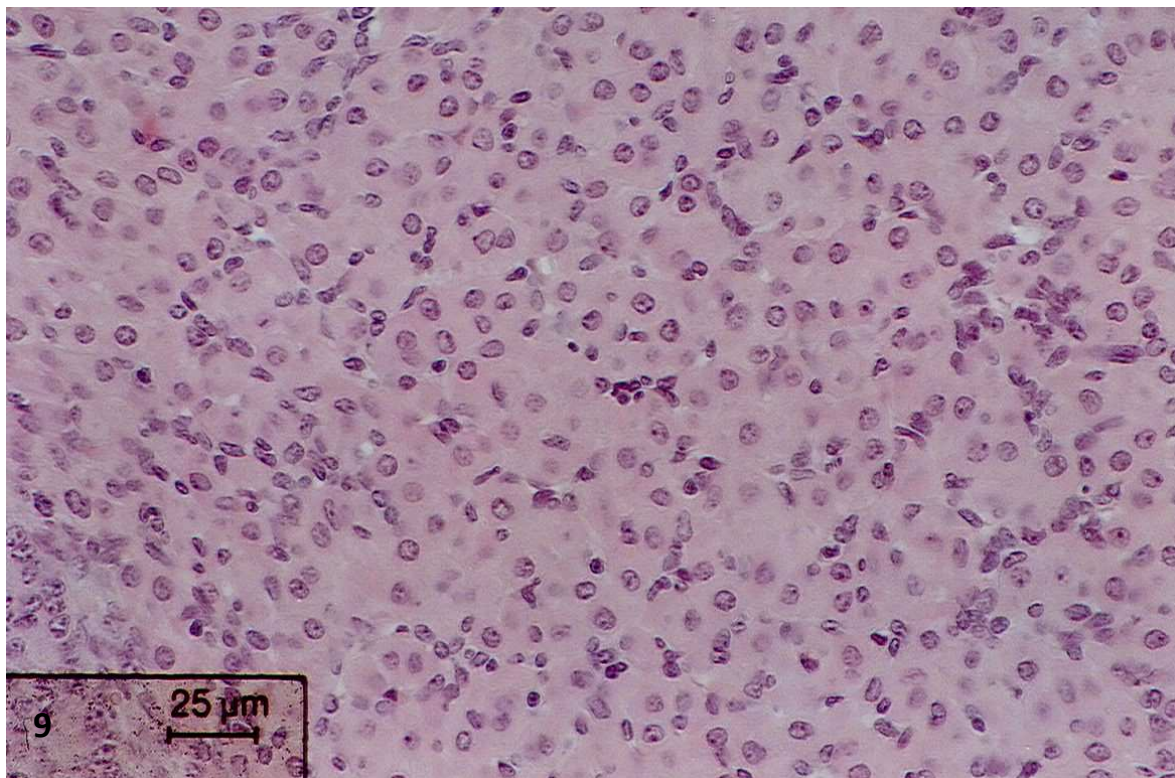
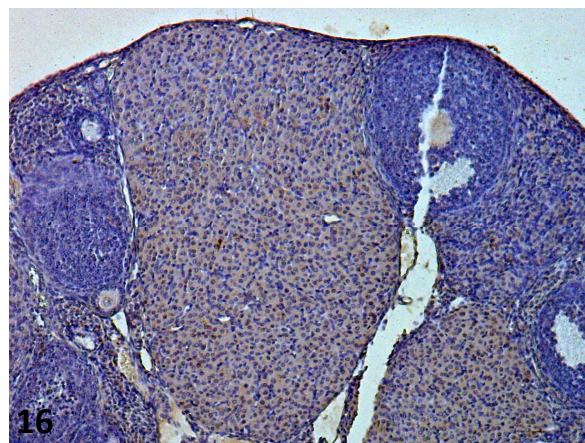
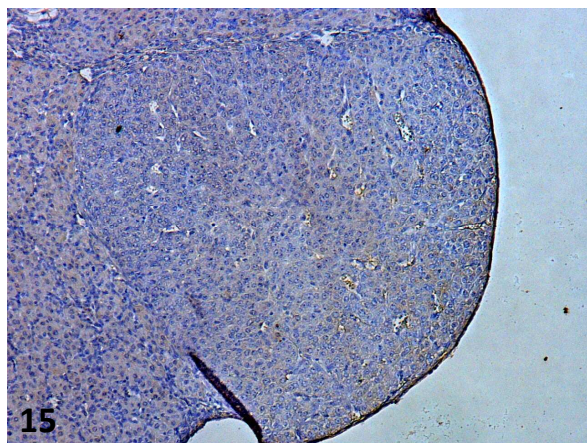
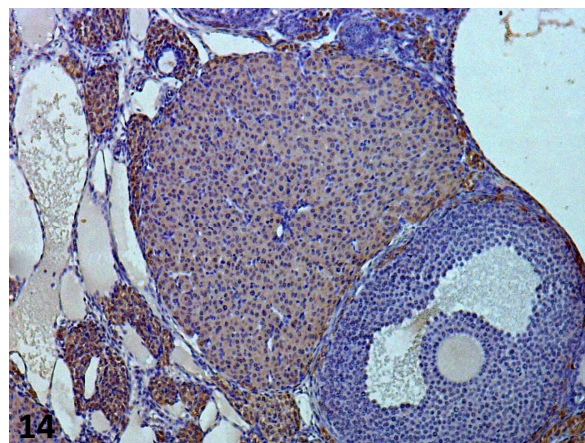
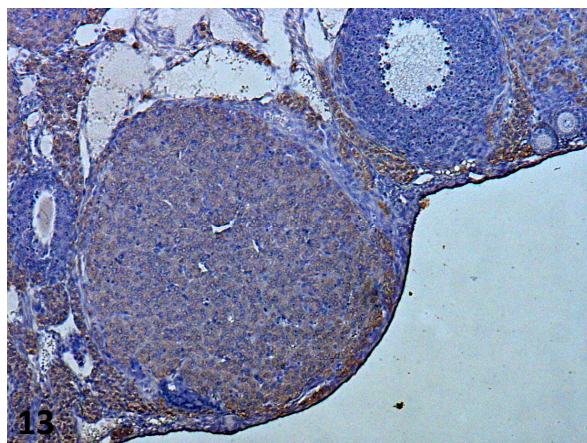
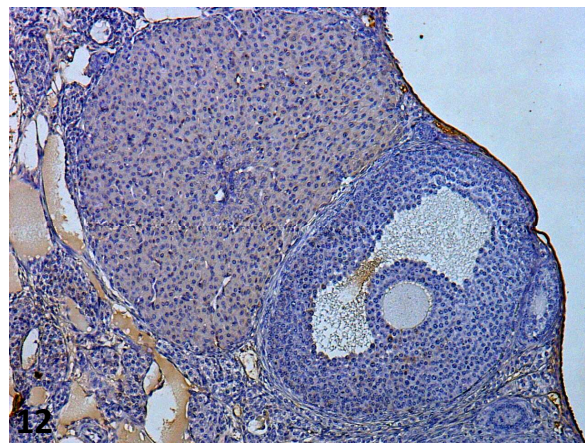
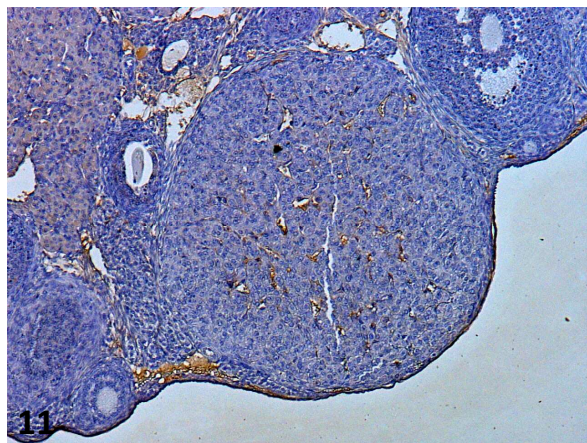


Figura 8: Folículo antral do grupo tratado. Observe o oócito (o), células granulosas do cumulus ooforus (c) e murais (m), células da teca (t) e líquido antral (a). Aumento: 40x.



Figuras 9 e 10: micrografias de corpo lúteo. Note que as células tratadas com Vardenafil (Figura 9) parecem ser mais numerosas do que as células não tratadas (Figura 10). Aumento: 40x.

A análise imunohistoquímica dos corpos lúteos para as enzimas StAR, P450scc e 3 β -HSD revelou marcação em ambos os grupos, controle e tratado. Entretanto, as micrografias do grupo tratado mostraram uma marcação mais intensa que o do grupo controle (Figuras 11-16).



Figuras 11-16: 11, 13, 15: micrografias correspondentes ao grupo controle; 12, 14, 16: micrografias correspondentes ao grupo tratado. 11-12: imunolocalização da enzima StAR. 13-14: imunolocalização da enzima P450scc. 15-16: imunolocalização da enzima 3 β -HSD.

3.2 - REFERÊNCIAS

- MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol.**, 62(4a); 609-614.
- SARAIVA, K. L. A.; JUNIOR, V. A. S.; TORRES, D. DE. O.; DONATO, M. A. M.; PERES, N. G.; SOUZA, J. R.; PEIXOTO, C. A. 2007. Changes in mouse Leydig cells ultrastructure and testosterone secretion after diethylcarbamazine administration. **Micron**; Jul; 39(5):580-6.
- SCHWARZ, E. R., KAPUR, V., RODRIGUEZ, J., RASTOGI, S., ROSANIO, S. 2007. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int J of Impot Research**, 19; 139-148.
- ZHAO, L.; NICOLA, A. M.; STRANGE, J. W.; WALKER, H.; WILKINS, M. R. 2003. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic peptide activity. **Circulation**;107:234-237.

CAPÍTULO IV

4.1 - DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que o tratamento crônico com inibidores da fosfodiesterase altera a morfologia de células ovarianas, sugerindo que a indução de altos níveis de GMPc pode afetar essas células.

Na análise de microscopia ótica, os folículos não demonstraram nenhuma diferença morfológica entre os grupos.

O resultado da imunohistoquímica mostrou que as enzimas esteroidogênicas estão presentes nas células luteais do grupo tratado. Embora a morfologia das células tratadas sugira uma alteração esteroidogênica no grupo tratado, as células luteinizantes neste grupo apresentaram marcação ligeiramente maior que o grupo controle, o que denota uma expressão normal das enzimas esteroidogênicas. Possivelmente, o fato de se observar uma maior marcação das células deva-se ao seu menor tamanho conforme constatado pelas análises morfométricas, o que poderia ocasionar uma maior concentração dessas moléculas.

Em conclusão, podemos afirmar que o tratamento crônico com o Vardenafil induziu uma alteração morfológica nas células luteais e exerceu uma tendência à inibição na produção de progesterona e na taxa de fertilidade. Esses dados devem ser levados em consideração, uma vez que esse esquema terapêutico tem sido utilizado mundialmente para tratamento de pacientes com hipertensão pulmonar.