

O uso crônico de citrato de sildenafila pode causar danos neuronais no hipotálamo posterior de ratos?

Can chronic use of sildenafil citrate cause neuronal damage in the posterior hypothalamus of rats?

¿Puede el uso crónico de citrato de sildenafil causar daños neuronales en el hipotálamo posterior de las ratas?

Recebido: 24/03/2022 | Revisado: 03/04/2022 | Aceito: 10/04/2022 | Publicado: 15/04/2022

Bruna Eduarda Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7045-6076>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: bruna.silva@sou.unifal-mg.br

Bianca Piovesan Melchiori Peruzza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2671-9211>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: bianca.melchiori@gmail.com

Wagner Corsini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6372-9649>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: wagner.corsini@unifal-mg.edu.br

Flávia Da Ré Guerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9142-9109>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: flavia.guerra@unifal-mg.edu.br

Wagner Costa Rossi Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1901-9978>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: wagner.rossi@unifal-mg.edu.br

Alessandra Esteves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0228-2940>
Universidade Federal de Alfenas, Brasil
E-mail: aesteves015@gmail.com

Resumo

O Citrato de Sildenafil (CS) é um fármaco amplamente utilizado por homens, para o tratamento, principalmente, contra disfunção erétil. Muitas vezes o tratamento não tem acompanhamento médico tornando-se assim um fator preocupante para a comunidade médico-científica. Este estudo teve como objetivo investigar as possíveis alterações do uso crônico de Citrato de Sildenafil no hipotálamo posterior de ratos. Foram utilizados 10 cérebros de ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar. Os animais foram alojados em caixas contendo três animais, tratados com ração comercial e água à vontade e mantidos em ciclo de 12 horas claro-escuro e, divididos em 2 grupos: G1 – grupo controle (sem medicação) e G2 – grupo Sildenafil (10 mg/kg). Os resultados obtidos mostram que houve uma diferença significativa do grupo controle ($25,43 \pm 11,82$) em relação ao grupo tratado com CS ($20,65 \pm 9,22$), ou seja, no grupo CS, a densidade neuronal foi 18,79% menor que no grupo controle. Estes dados permitem concluir que, o uso indiscriminado de Citrato de Sildenafil diminui o número de corpos celulares de neurônios na área hipotalâmica posterior do cérebro de ratos machos. Esta perda neuronal pode ocasionar alterações clínicas graves nos sistemas em que o hipotálamo está envolvido.

Palavras-chave: Hipotálamo posterior; Citrato de sildenafil; Neurônio; Densidade neuronal.

Abstract

Sildenafil Citrate (SC) is a drug widely used by men, mainly for the treatment of erectile dysfunction. Many times the treatment has no medical follow-up, thus becoming a worrisome factor for the medical-scientific community. This study aimed to investigate the possible alterations of the chronic use of Sildenafil Citrate in the posterior hypothalamus of rats. Ten brains of male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used. The animals were housed in boxes containing three animals, treated with commercial feed and water at will and kept in a 12 hour light-dark cycle, and divided into 2 groups: G1 - control group (no medication) and G2 - Sildenafil group (10 mg/kg). The results obtained show that there was a significant difference between the control group (25.43 ± 11.82) and the group treated with CS (20.65 ± 9.22), that is, in the CS group, neuronal density was 18.79% lower than in the control group. These data allow us to conclude that indiscriminate use of Sildenafil Citrate decreases the number of neuron cell bodies in the posterior hypothalamic area

of the male rat brain. This neuronal loss may cause severe clinical changes in the systems in which the hypothalamus is involved.

Keywords: Posterior hypothalamus; Sildenafil citrate; Neuron; Neuronal density.

Resumen

El Citrato de Sildenafil (SC) es un fármaco ampliamente utilizado por los hombres para el tratamiento, principalmente, contra la disfunción eréctil. Muchas veces el tratamiento no tiene seguimiento médico, convirtiéndose en un factor preocupante para la comunidad médico-científica. Este estudio tuvo como objetivo investigar las posibles alteraciones del uso crónico de Citrato de Sildenafil en el hipotálamo posterior de las ratas. Se utilizaron diez cerebros de ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*). Los animales fueron alojados en cajas que contenían tres animales, tratados con alimento comercial y agua a voluntad y mantenidos en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y divididos en 2 grupos: G1 - grupo de control (sin medicación) y G2 - grupo de Sildenafil (10 mg/kg). Los resultados obtenidos muestran que hubo una diferencia significativa entre el grupo de control ($25,43 \pm 11,82$) y el grupo tratado con CS ($20,65 \pm 9,22$), es decir, en el grupo de CS, la densidad neuronal fue un 18,79% menor que en el grupo de control. Estos datos nos permiten concluir que, el uso indiscriminado de Citrato de Sildenafil disminuye el número de cuerpos celulares neuronales en el área hipotalámica posterior del cerebro de la rata macho. Esta pérdida neuronal puede provocar graves alteraciones clínicas en los sistemas en los que interviene el hipotálamo.

Palabras clave: Hipotálamo posterior; Citrato de sildenafil; Neurona; Densidad neuronal.

1. Introdução

A empresa americana Pfizer®, com o intuito de encontrar um novo medicamento para tratar angina pectoris e também, hipertensão arterial pulmonar, criou em 1994 o Viagra®. Durante os testes do fármaco, os pesquisadores descobriram que um de seus efeitos colaterais era o aumento da irrigação sanguínea no pênis devido à potencialização do óxido nítrico. Sendo assim, realizaram testes clínicos que envolveram 3.700 pacientes escolhidos aleatoriamente em todo o mundo, com idades variando entre 19 e 87 anos, que sofriam de disfunções eréteis. Em 1996, o fármaco foi patenteado e os pesquisadores conseguiram sintetizar o composto numa pílula que dois anos depois, foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration). (Lucke, et al., 2011).

Nos últimos anos, com o surgimento de novos fármacos, além dos genéricos e similares do CS, houve contribuição para a “popularização” desses medicamentos, mas o uso indiscriminado, principalmente pela população jovem, é um fator preocupante. Buscando contornar a ansiedade e o medo de falhar no ato sexual, os jovens recorrem, sem a devida prescrição médica, às chamadas pílulas azuis. (Lucke, et al., 2011).

O Citrato de Sildenafil promove a dilatação dos vasos e como efeito secundário tende a facilitar a ereção por até seis horas após a ingestão da pílula. Como é um composto vasodilatador, pode influenciar no suprimento sanguíneo do coração e alterar a homeostase corporal, devido ao descontrole químico gerado (Zattar et al., 2013; Malta et al., 2018). Estudos mostram que é eficaz contra a hipertensão arterial (HA), uma doença que acomete um número considerável de pessoas no Brasil e no mundo, cuja a prevalência no Brasil é de 24,7% quando não há distinção por sexo, se olharmos apenas para o sexo feminino, esse número aumenta. (dos Santos Dias et al., 2021).

O uso indiscriminado da sildenafil e/ou a combinação com outros medicamentos causa alterações significativas no organismo. Sendo assim, o hipotálamo busca alertar ao sistema nervoso o que é necessário controlar, reduzindo ou aumentando tal substância ou atividade no organismo, desempenhando papel importante no controle do sistema nervoso autônomo e da temperatura corporal, regulação do apetite, balanço osmótico, ciclo vigília-sono, sistema límbico bem como no funcionamento metabólico de cada indivíduo (Rosa, 2018).

Diante disso, este estudo tem como objetivo investigar as possíveis alterações morfológicas (quantitativas de células nervosas - neurônios) na área hipotalâmica posterior de ratos tratados com o medicamento Citrato de Sildenafil.

2. Metodologia

Para este estudo foram utilizados 10 ratos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Os animais foram tratados com ração comercial e água “ad libitum” e mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro. O trabalho está em conformidade com os princípios éticos, tendo sido apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UNIFAL-MG) sob registro nº 574/2014.

2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois (2) grupos experimentais (n=5) sendo:

G1 - Grupo Controle: tratado com água filtrada durante 60 dias.

G2 - Grupo Sildenafil (CS): tratado com Citrato de Sildenafil na dose de 10 mg/kg durante 60 dias.

2.2 Tratamento

Os animais do Grupo Sildenafil (Viagra®) receberam o tratamento com o medicamento 3 (três) vezes por semana por meio de gavagem orogástrica (RINALDI et al., 2013). O Grupo Controle recebeu apenas água filtrada, também por meio de gavagem orogástrica, obedecendo aos mesmos horários e intervalos. Para calcular a dose de CS, foi utilizado o cálculo de extrapolação alométrica, levando em consideração a taxa metabólica do animal.

2.3 Coleta, processamento e coloração das amostras

Decorridos 60 dias, os animais foram eutanasiados por inalação de isoflurano e a craniotomia foi realizada com intuito de remover os encéfalos. Após a remoção, os órgãos foram lavados em solução fisiológica e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato por vinte e quatro horas. Após esse período, procedeu-se a sequência padronizada nos processamentos histológicos convencionais: desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. De cada encéfalo foram retiradas amostras seriadas e homotípicas em cortes frontais (Ribeiro et al., 2014; von Bartheld, Bahney, Herculano-Houzel, 2016 e Castro et al., 2021) com espessura de 7µm em micrótomo Yidi YD-315. Para avaliar as áreas estabelecidas para o estudo (Franklin e Paxinos, 2008), o material foi corado com violeta cresil (Kádár et al., 2010; Damião et al., 2012; von Bartheld et al., 2016; García-Cabezas et al., 2016).

2.4 Análise quantitativa das células

Para a análise quantitativa de neurônios, empregamos a metodologia de contagem aleatória simples (Mandarim-de-Lacerda, 2003; Boyce et al., 2010; Mühlfeld et al., 2010). O hipotálamo posterior teve três áreas quantificadas por hemisfério cerebral, totalizando 6 áreas por corte. Para evitar a contagem da mesma célula, foram analisados de 3 a 6 cortes semi-seriados por animal, ou seja, foram analisados, em média, 18 campos histológicos da estrutura estudada para cada animal. Todas as análises foram feitas em um computador com o Sistema Analisador de Imagens Axiovision4 Module Interactive Measurement acoplado ao microscópio AxioScope A1 da Carl Zeiss® (Castro et al., 2021).

2.5 Análise Estatística

Para a análise estatística utilizamos o software GraphPadPrism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo realizada por meio de Análise de Variância (One-Way ANOVA), seguida do teste de comparações de médias de Tukey, adotado o nível de significância de 5% para as análises.

3. Resultados e Discussão

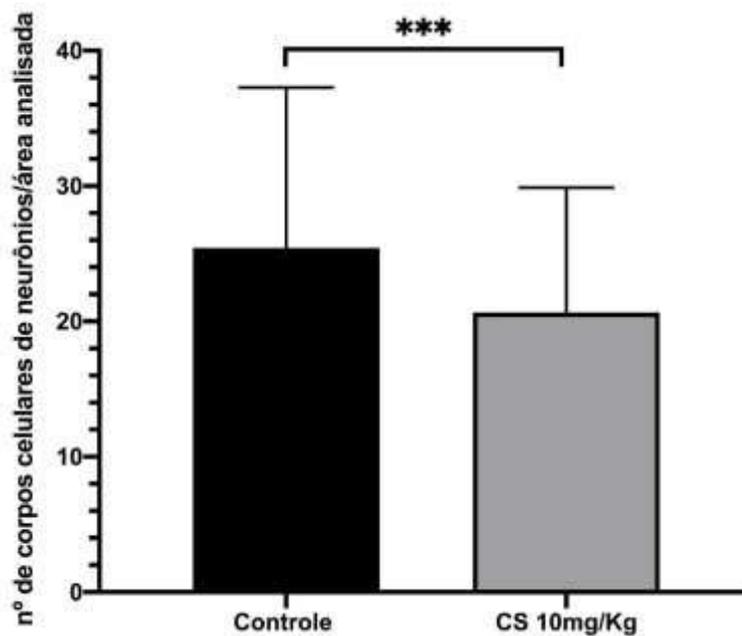
Conforme demonstra a tabela e o gráfico abaixo, podemos observar que houve uma diferença significativa do grupo controle ($25,43 \pm 11,82$) em relação ao grupo tratado cronicamente com 10 mg/Kg de Citrato de Sildenafil ($20,65 \pm 9,22$). Ou seja, em relação ao grupo controle, o grupo tratado com CS teve a densidade de células nervosas reduzida em 18% por área hipotalâmica analisada (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Dados dos grupos experimentais, média \pm desvio padrão, redução neuronal em porcentagem, valor de p e nível de significância. Sendo: ***Valores: Grupo controle x Grupo tratado com Citrato de Sildenafil (CS 10 mg/Kg).

Grupos	Média \pm Desvio Padrão	Redução neuronal (%)	Valor de p e nível de significância
Controle	$25,43 \pm 11,82$	0%	
CS 10 mg/Kg	$20,65 \pm 9,22$	18,79%	<0,0001***

Fonte: Autores.

Figura 1. Média do número de corpos celulares de neurônios (número de células nervosas/ área), do hipotálamo, em animais expostos ao Citrato de Sildenafil. Grupos experimentais: Grupo controle e Grupo CS 10mg/Kg. Sendo *** $p < 0,0001$.



Fonte: Autores.

4. Discussão

As doenças relacionadas com a pressão arterial são de fundamental importância clínica por trazer graves consequências para o indivíduo, inclusive podendo levar a óbito. O tratamento da hipertensão consiste na utilização de medicamentos anti-hipertensivos, que se associados a outros fármacos, podem acarretar graves problemas. Estudos mostram que a administração de Citrato de Sildenafil em ratos hipertensos reduz a pressão arterial e melhora o controle barorreflexo, além de reduzir os níveis de malondialdeído, indicador de estresse oxidativo (Cavalcanti, 2016). Mas o uso do CS combinado com medicamentos que apresentem nitratos em sua composição (normalmente prescritos para doenças do coração), dado que ambos podem causar a

dilatação de vasos sanguíneos, podem acarretar problemas graves como: queda severa de pressão, além de acidente vascular cerebral (AVC) e até a morte. Estas alterações podem estar envolvidas com o hipotálamo, área analisada neste estudo; já que quando os níveis de pressão arterial estão baixos, barorreceptores presentes nas artérias enviam sinais para áreas hipotalâmicas posteriores, e estes enviam a informação para que ocorra o aumento da pressão arterial e seja estabelecida a homeostase corpórea (Malacarne, et al., 2021).

Assim, como não há nenhum estudo sobre a relação do Citrato de Sildenafil com o hipotálamo e como existe um grande uso desse fármaco, faz-se necessário estudos que mostrem se este princípio ativo pode ou não causar danos ao hipotálamo, que é uma estrutura fundamental para o organismo.

O Citrato de Sildenafil atua em conjunto com o óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso sintetizado por células através da arginina. O NO, ao atravessar o endotélio em direção a musculatura lisa, cria um estímulo responsável pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel que promove a síntese de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, mensageiro celular mediador de hormônios e neurotransmissores (Kukreja et al., 2005; Wright, 2006), que causará a diminuição dos níveis de cálcio intracelular ocasionando a dilatação das artérias do pênis, relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e conseqüentemente a ereção (Costa, 2011). No entanto, para que haja contração do músculo liso e a ereção seja interrompida, uma enzima apresenta efeito inibitório na atuação do GMPc, a fosfodiesterase (PDEs), responsável pela hidrólise de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) promovendo vasoconstrição (Selbach, 2008). A administração de Citrato de Sildenafil inibe especificamente a quebra de GMPc por PDE5, aumentando assim os efeitos da via NO/GMPc.

Estudos mostram que o tratamento com CS provoca aumento da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica no hipotálamo (Kryastas et al., 2013). Um dos efeitos desse aumento pode estar relacionado com as mudanças causadas pelo CS na via NO/GMPc, pois o NO age inibindo a recaptção de dopamina (DA), e aumentando sua liberação (Kiss & Vizi, 2001; Rocchitta et al., 2005). Em relação à serotonina, pesquisas mostram que níveis elevados de NO aumentam sua liberação de forma direta e indireta, por uma via dependente de GMPc (Kaehler et al., 1999). Além disso, a administração crônica do CS pode ser associada a um feedback negativo sobre a NO sintase, com subsequente redução da produção de NO.

O ciclo circadiano é responsável pelo controle do sono nos seres vivos e é dividido em duas fases: fase clara e fase escura. A fase clara é correspondente ao período em que as reações biológicas e a secreção de alguns hormônios estão voltadas para a realização de atividades, e na fase escura estão voltadas para a manutenção do repouso. Esse ciclo é posteriormente comandado por uma área hipotalâmica, isso se dá por meio de conexões com a retina, que passam a informação sobre presença ou ausência de luz, ativando uma cascata de transdução de sinal, resultando na mudança de fase (claro-escuro) do ciclo circadiano (Martinez, et al., 2008). A via da proteína quinase (PKG), dependente de GMPc, está envolvida nas mudanças de fase do ritmo circadiano. Um estudo em hamsters mostrou que os níveis de GMPc no SNC apresentam variações circadianas, tendo seu valor máximo durante o dia. Além disso, foi observado que o GMPc tem um papel mediador nos avanços de fase do ciclo circadiano. A administração de CS, por aumentar os níveis de GMPc, pode aumentar as respostas à luz e diminuir a quantidade de tempo necessário para a reativação da enzima após as mudanças de fase do ciclo (Agostino, et al., 2007). Porém, não foi possível encontrar na literatura se este mecanismo também ocorre no uso crônico de Sildenafil ou se a resposta pode ser inversamente proporcional ao encontrado pelo trabalho citado.

5. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que, o uso indiscriminado e crônico de Citrato de Sildenafil, leva a uma diminuição na densidade de células nervosas no hipotálamo posterior de ratos machos e, como consequência, podendo, porventura, ocasionar diversas alterações nos sistemas em que o hipotálamo está envolvido, como: controle da pressão arterial,

controle da temperatura corporal, regulação do apetite, do balanço osmótico, do ciclo vigília-sono e no sistema límbico.

Pelo fato do Citrato de Sildenafil ser um fármaco frequentemente utilizado por homens em diferentes faixas etárias, sugere-se que outras áreas corticais sejam analisadas, por meio de um estudo morfológico. Além disso, sugere-se que sejam feitos estudos a fim de avaliar especificamente quais os efeitos colaterais associados ao uso crônico da substância, com a realização de testes comportamentais e avaliações metabólicas.

Referências

- Agostino, P. V., Plano, S. A. & Golombek, D. A. (2007). Sildenafil accelerates reentrainment of circadian rhythms after advancing light schedules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9834-9839. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703388104>
- Boyce, R. W., Dorph-Petersen, K. A., Lyck, L. & Gundersen, H. J. G. (2010). Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology*, 38(7), 1011-1025. <https://doi.org/10.1177/0192623310385140>
- Calzerra, N. T. M., Gomes, C. F. & De Queiroz, T. M. (2018). Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. *Acta Brasiliensis*, 2(2), 69-73. <https://doi.org/10.22571/2526-433876>
- Cavalcanti, C. D. O. (2016). Avaliação pré-clínica do efeito do citrato de sildenafil sobre o controle central da pressão arterial na hipertensão. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/8909>
- Corbin, J. D., Beasley, A., Blount, M. A., & Francis, S. H. (2004). Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochemistry international*, 45(6), 859-863. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.016>
- Costa, A. P. A. (2011). Inibidores da fosfodiesterase tipo V: aspectos clínicos e farmacológicos. *Seminários Aplicados*.
- Damião, B., de Souza, G. G., Nogueira, D. A., Junior, W. C. R., Fernandes, G. J. M. & Esteves, A. (2012). Quantificação de corpos de neurônios em camundongos submetidos ao uso de esteroides anabolizantes. *Revista Neurociências*, 20(1), 68-72. <https://doi.org/10.34024/rnc.2012.v20.8303>
- de Castro, R. M., Junior, W. C. R., Corsini, W., da Costa Siqueira, L., Ferreira, Í. A. S., da Costa Souza, K., & Esteves, A. (2021). Efeitos da associação de estresse físico e uso crônico de cloridrato de fluoxetina no córtex cerebral de ratos. *Research, Society and Development*, 10(11), e114101119509-e114101119509. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19509>
- de Sales Rodrigues, R. O., da Silva, I. S., Malacarne, P., de Barros, N. B. & de Carvalho, J. F. C. (2021). O Uso De Citrato De Sildenafil Como Estimulante Sexual E Os Efeitos Adversos. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 41841-41852. <https://doi.org/10.34117/bjd.v7n4-580>
- dos Santos Dias, G., Costa, M. C. B., das Neves Ferreira, T., dos Santos Fernandes, V., da Silva, L. L., Júnior, L. M. S., ... & Heliotério, M. C. (2021). Fatores de risco associados à Hipertensão Arterial entre adultos no Brasil: uma revisão integrativa. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 962-977. <https://doi.org/10.34117/bjd.v7i1.22600.g18111>
- Ferrari, F., Ottani, A. & Giuliani, D. (2002). Influence of sildenafil on central dopamine-mediated behaviour in male rats. *Life Sciences*, 70(13), 1501-1508. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01515-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01515-6)
- García-Cabezas, M. Á., John, Y. J., Barbas, H. & Zikopoulos, B. (2016). Distinction of neurons, glia and endothelial cells in the cerebral cortex: an algorithm based on cytological features. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00107>
- Guyenet, P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(5), 335-346. <https://doi.org/10.1038/nrn1902>
- Kádár, A., Sánchez, E., Wittmann, G., Singru, P. S., Füzesi, T., Marsili, A., ... & Fekete, C. (2010). Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 518(19), 3948-3961. <https://doi.org/10.1002/cne.22432>
- Kaehler, S. T., Singewald, N., Sinner, C. & Philippu, A. (1999). Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain research*, 835(2), 346-349. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01599-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01599-1)
- Kyratsas, C., Dalla, C., Anderzhanova, E., Polissidis, A., Kokras, N., Konstantinides, K. & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2013). Experimental Evidence for Sildenafil's Action in the Central Nervous System: Dopamine and Serotonin Changes in the Medial Preoptic Area and Nucleus Accumbens During Sexual Arousal. *The Journal of Sexual Medicine*, 10(3), 719-729. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2012.03000.x>
- Lucke, J. C., Bell, S. K., Partridge, B. J. & Hall, W. D. (2011). Academic doping or Viagra for the brain? The history of recreational drug use and pharmacological enhancement can provide insight into these uses of neuropharmaceuticals. *EMBO reports*, 12(3), 197-201. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.15>
- Malta, D. C., Gonçalves, R. P. F., Machado, Í. E., Freitas, M. I. D. F., Azeredo, C. & Szwarcwald, C. L. (2018). Prevalence of arterial hypertension according to different diagnostic criteria, National Health Survey. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 21. <https://doi.org/10.1590/1980-549720180021.supl.1>

- Mandarin-de-Lacerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(4), p. 469-486. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652003000400006>
- Martinez, D., Lenz, M. D. C. S. & Menna-Barreto, L. (2008). Diagnóstico dos transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 34, 173-180. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132008000300008>
- Mühlfeld, C., Papadakis, T., Krasteva, G., Nyengaard, J. R., Hahn, U. & Kummer, W. (2010). An unbiased stereological method for efficiently quantifying the innervation of the heart and other organs based on total length estimations. *Journal of Applied Physiology*, 108(5), 1402-1409. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01013.2009>
- Rezende, P. M., & da Silva Coimbra, M. V. (2021). Indicação de uso indiscriminado de sildenafila e tadalafila por jovens. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, 4(9), 66-77. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5093826>
- Ribeiro, C. M., Silva, D. K., Damião, B., Alves, D. M., de Freitas, A. C., Júnior, W. C. R. & Esteves, A. (2014). Análise quantitativa de células de Purkinje em camundongos sob o uso dos esteroides anabolizantes. *Revista Neurociências*, 22(3), 432-437. <https://doi.org/10.34024/rnc.2014.v22.8078>
- Rinaldi, B., Donniacuo, M., Sodano, L., Gritti, G., Signoriello, S., Parretta, E., & Rossi, F. (2013). Effects of sildenafil on the gastrocnemius and cardiac muscles of rats in a model of prolonged moderate exercise training. *PLoS One*, 8(7), e69954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069954>
- Rosa, M. C. N. (2018). Estruturas e Funções: Dossier de Fichas de Trabalho. <http://hdl.handle.net/10400.8/4669>
- Teixeira-da-Silva, J. J., Nunes-Moreira, H. S., Silva, C. O., Lahlou, S., Naro, F., Xavier, F. E. & Duarte, G. P. (2019). Chronic administration of sildenafil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by decreasing COX-2 expression and oxidative stress. *Life sciences*, 225, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.074>
- Von Bartheld, C. S., Bahney, J. & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3865-3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Zattar, L. C., Boing, A. F., Giehl, M. W. C. & d'Orsi, E. (2013). Prevalência e fatores associados à pressão arterial elevada, seu conhecimento e tratamento em idosos no sul do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 29(3), 507-521. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2013000300009>