



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

ALEX LUIZ MENEZES DA SILVA

**ALTERAÇÕES ELETROCORTICOGRÁFICAS
PROVOCADAS POR CITRATO DE SILDENAFIL E
TADALAFIL EM RATOS WISTAR**

BELÉM-PA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÕES ELETROCORTICOGRÁFICAS
PROVOCADAS POR CITRATO DE SILDENAFIL E
TADALAFIL EM RATOS WISTAR**

Autor (a): ALEX LUIZ MENEZES DA SILVA

Orientador (a): Prof. Dr. MOISÉS HAMOY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

BELÉM-PA

2023

ALEX LUIZ MENEZES DA SILVA

**ALTERAÇÕES ELETROCORTICOGRÁFICAS PROVOCADAS POR CITRATO DE
SILDENAFIL E TADALAFIL EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovada em 31 de março de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moisés Hamoy (orientador)

Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Dielly Catrina Favacho Lopes

Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Vanessa Joia de Mello

Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S586a Silva, Alex Luiz Menezes da.
Alterações eletrocorticográficas provocadas por Citrato
de Sildenafil e Tadalafil em ratos Wistar / Alex Luiz Menezes
da Silva. — 2023.
42 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Moisés Hamoy
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
graduação em Farmacologia e Bioquímica, Belém, 2023.

1. Citrato de Sildenafil. 2. Tadalafil. 3. Convulsões. 4.
Cérebro. 5. Convulsivantes. I. Título.

CDD 615

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os inibidores da fosfodiesterase 5 (iPDE5) são o tratamento de primeira linha para a disfunção erétil; no entanto, vários artigos e relatos de casos têm mostrado efeitos no sistema nervoso central que podem causar convulsões em pacientes suscetíveis. Este estudo tem como objetivo descrever as alterações causadas pelo uso de Sildenafil e Tadalafil por meio da análise das anormalidades expressas no eletrocorticograma (ECoG) de ratos e avaliar a resposta do limiar convulsivo, bem como a eficácia do tratamento com anticonvulsivantes. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O estudo utilizou 108 ratos (Wistar). Antes da cirurgia para colocação de eletrodos na dura-máter, os animais foram separados aleatoriamente em 3 experimentos para análise do ECoG. Experimento 1: Resposta do ECoG ao uso de iPDE5 (Sildenafil 20 mg/kg e Tadalafil 2,6 mg/kg p.o.). Experimento 2: Resposta do ECoG ao uso de iPDE5 em associação com Pentilenetetrazol (PTZ - 30 mg/kg i.p.), um modelo convulsivo. Experimento 3: Resposta do ECoG ao tratamento anticonvulsivante (Fenitoína, Fenobarbital e Diazepam) de convulsões induzidas pela associação iPDE5 + PTZ. Todas as gravações foram feitas trinta minutos após a administração da medicação e analisadas por dez minutos, apenas uma vez. Considerou-se um nível de significância estatística de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. **RESULTADOS:** Após a administração de Sildenafil e Tadalafil, observou-se um aumento na intensidade das gravações nas faixas de frequência das oscilações em Alfa ($p = 0,0920$) e Beta ($p = 0,602$) em comparação com o grupo de controle ($p < 0,001$). Após o uso de Sildenafil e Tadalafil associados ao PTZ, foram observadas maiores potências nas gravações durante as convulsões ($p < 0,001$), no entanto, o grupo do Sildenafil mostrou maior potência em comparação com o Tadalafil ($p < 0,05$). Fenobarbital e Diazepam mostraram uma melhor resposta no controle das descargas desencadeadas pela associação de drogas pró-convulsivantes. **CONCLUSÕES:** Os iPDE5 alteraram as gravações do ECoG no córtex motor dos ratos, demonstrando assincronia cerebral e potencializando a ação do PTZ. Esses achados demonstram que os iPDE5 podem diminuir o limiar de convulsões.

Palavras-chave: Citrato de Sildenafil; Tadalafil; Convulsões; Cérebro; Convulsivantes

ABSTRACT

BACKGROUND: Phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5i) are the first line treatment for erectile dysfunction; however, several articles and case reports have shown central nervous system effects, that can cause seizures in susceptible patients. This study aims to describe the changes caused by the use of Sildenafil and Tadalafil through the analysis of abnormalities expressed in the electrocorticogram (ECoG) of rats and evaluate the seizure threshold response and treatment of seizures with anticonvulsants. **MATERIALS AND METHODS:** The study used 108 rats (Wistar). Before surgery for electrode placement in dura mater, the animals were randomly separated into 3 experiments for electrocorticogram analysis. Experiment 1: ECoG response to using PD5i (Sildenafil 20mg/kg and Tadalafil 2.6mg/kg p.o.). Experiment 2: ECoG response to the use of PD5i in association with Pentylentetrazole (PTZ - 30 mg/kg i.p.), a convulsive model. Experiment 3: ECoG response to anticonvulsant treatment (Phenytoin, Phenobarbital and Diazepam) of seizures induced by association IPDE5 + PTZ. All recordings were made thirty minutes after administration of the medication and analyzed for ten minutes, only once. We considered statistical significance level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. **RESULTS:** After administration of Sildenafil and Tadalafil, there were increases in the power of recordings in the frequency bands in oscillations in alpha ($p = 0.0920$) and Beta ($p = 0.602$) when compared to the control group ($p < 0.001$). After the use of Sildenafil and Tadalafil associated with PTZ, greater potency was observed in the recordings during seizures ($p < 0.001$), however, the Sildenafil group showed greater potency when compared to Tadalafil ($p < 0.05$). Phenobarbital and Diazepam showed a better response in controlling discharges triggered by the association between proconvulsant drugs. **CONCLUSIONS:** PDE5i altered the ECoG recordings in the rats' motor cortexes, demonstrating cerebral asynchrony and potentiating the action of PTZ. These findings demonstrate that PDE5i can lower the seizure threshold.

Keywords: Sildenafil Citrate; Tadalafil; Seizures; Brain; Convulsants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cirurgia para colocação de eletrodos.....	16
Figura 2 . Desenho do experimento - 1.....	17
Figura 3 . Desenho do experimento - 2.....	18
Figura 4 . Desenho do experimento - 3: adição de drogas anticonvulsivantes.....	19
Figura 5 . Desenho do experimento - 3: grupos de estudo.....	19
Figura 6 - Atividade Cerebral do Grupo Controle.....	22
Figura 7 - Característica do registro eletrocorticográfico após administração de Sildenafil.....	23
Figura 8 - Característica do registro eletrocorticográfico após administração de Tadalafil.....	24
Figura 9 - Distribuição da potência espectral relativa aos registros dos grupos: controle, Sildenafil (SDF) e Tadalafil (TDF).....	25
Figura 10 - Gráficos demonstrando a variação das médias de potência linear para bandas de oscilação cerebral.....	26
Figura 11 - Traçado eletrocorticográfico (ECoG) de um rato Wistar após a aplicação da droga.....	28
Figura 12 - Potência linear média dos registros por grupos.....	29
Figura 13 - Registros eletrocorticográficos (ECoG) representativos obtidos após tratamento com Tadalafil seguido de Pentilenotetrazol.....	30
Figura 14 - Registros eletrocorticográficos (ECoG) representativos obtidos após tratamento com Sildenafil seguido de Pentilenotetrazol.....	31

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

DZP	Diazepam
ECoG	Eletrocorticografia/eletrocorticográfico
EEG	Eletroencefalograma
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBT	Fenobarbital
PDE	Fosfodiesterase
PSD	Densidade espectral de potência
PTN	Fenitoína
PTZ	Pentilenotetrazol
SDF	Sildenafil
TDF	Tadalafil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	15
3.2 ANIMAIS.....	15
3.3 CIRURGIA PARA COLOCAÇÃO DE ELETRODOS.....	16
3.4 DESIGN EXPERIMENTAL	17
3.4.1 Experimento -1.....	17
3.4.2 Experimento -2.....	18
3.3.3 Experimento -3.....	18
3.5 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES.....	20
3.6 REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS	20
3.7 ANÁLISES DE DADOS	20
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Os inibidores seletivos da fosfodiesterase (PDE) 5 são fármacos largamente utilizados para o manejo de patologias como hiperplasia prostática benigna, hipertensão pulmonar e disfunção erétil. Destes, destaca-se o tratamento da disfunção erétil, sendo o Sildenafil o primeiro composto introduzido clinicamente (em 1998), seguido por Vardenafil e Tadalafil (em 2003); e Avanafil em 2013 (ANDERSSON, 2018).

Na fisiologia da ereção peniana, durante a excitação sexual, a ereção ocorre a partir da síntese e acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), no músculo liso vascular do pênis (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013). As PDE controlam o nível intracelular de nucleotídeos cíclicos, havendo 3 isoformas (PDE-5, PDE-6 e PDE-9) que hidrolisam seletivamente o GMPc (NIEOCZYM et al., 2013).

No que tange a farmacodinâmica do Sildenafil em relação ao seu principal uso terapêutico, a literatura se mostra consolidada sobre os efeitos vasculares. Ao utilizar o Sildenafil para disfunção erétil, este fármaco provoca o acréscimo de GMPc, diminuindo a atividade catalítica da enzima PDE-5 no músculo liso vascular do pênis. Isto potencializa os efeitos endógenos do óxido nítrico (NO), sintetizado pelo óxido nítrico sintetase (NOS), que ativa a guanilato ciclase (GC) e induz a produção de GMPc. Este mecanismo provoca relaxamento da musculatura lisa do pênis e dilatação arterial, promovendo a ereção por meio da distensão do corpo cavernoso (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; DE CARVALHO et al., 2019; RAHIMIAN et al., 2020). Estudos in vitro mostram que a inibição da PDE-5 pelo Sildenafil é 10 vezes maior que da PDE-6, 100 vezes maior que da PDE-1 e 1000 vezes maior que da PDE-2, PDE-3 e PDE-4 (MARMOR; KESSLER, 1999).

As diretrizes atuais para o tratamento da disfunção erétil recomendam os inibidores da PDE-5 como terapia de primeira linha para a maioria dos homens com esta condição e que não apresentam contraindicações específicas para seu uso (HATZIMOURATIDIS et al., 2016). Eles afirmam que os inibidores da PDE-5 são

terapias eficazes, seguras e bem toleradas, e que não há diferenças significativas entre as drogas aprovadas para esta disfunção (HATZIMOURATIDIS et al., 2016).

Estudos hemodinâmicos constataram um efeito estável do Sildenafil de atenuação da pressão arterial sistêmica sem grandes prejuízos às vascularizações responsáveis pela permeabilidade tecidual periférica (JACKSON et al., 1999). Tal propriedade seria aproveitada posteriormente em ensaios para o tratamento de hipertensão pulmonar (BARNETT; MACHADO, 2006). Desta forma, caracterizam-se os dois principais usos terapêuticos dos inibidores da PDE-5, para disfunção erétil e hiperetensão pulmonar.

As isoenzimas PDE-5 foram identificadas em uma ampla variedade de tecidos, a exemplo das células musculares lisas do corpo cavernoso, assim como no músculo liso vascular e visceral, músculo esquelético, plaquetas, rim, pulmão, medula espinhal, cerebelo, pâncreas, próstata, uretra e bexiga (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; LIN et al., 2006; UCKERT; KUCZYK, 2011).

Apesar de se constituírem em um dos principais cerne de pesquisa por parte dos laboratórios farmacológicos desde meados da década de 80 e de serem comumente utilizados na prática clínica de diversas especialidades, os inibidores seletivos da PDE-5 não tiveram suas interações com o sistema nervoso central totalmente mapeadas (PUZZO et al., 2008). Tal barreira teórica, de certa forma, corroborou para que a seletividade da comercialização e utilização dos inibidores da PDE-5 se baseasse prioritariamente sobre os efeitos colaterais observáveis de imediato sobre o indivíduo, como cefaleia, rubor, congestão nasal, dispepsia, distúrbios visuais, e mialgia (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; RAHIMIAN et al., 2020).

Ao longo dos anos, após o desenvolvimento e comercialização dos inibidores da PDE-5, foi possível observar efeitos adversos no sistema nervoso central. Dentre eles, efeitos como tontura, depressão, insônia, agressividade, sonhos anormais e ansiedade (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; DE CARVALHO et al., 2019; HACKETT, 2006).

Ao se observar os aspectos bioquímicos e fisiológicos gerais do sistema nervoso, percebe-se que as atividades excitatórias e inibitórias se encontram diretamente ligadas à expressão e ao funcionamento de canais iônicos. A importância destes para a manutenção do comportamento neuronal eletrostático (dos potenciais) e eletrodinâmico (das sinapses elétricas e químicas) são cruciais. O manejo errado das propriedades elétricas da membrana dos neurônios, em estados de hiperexcitabilidade e de descontrole das sinapses, pode ocorrer em um grupo de células interligadas, gerando um foco convulsivo que pode se generalizar (KANDEL, 2012).

Diante disso, é pertinente destacar que as ações dos inibidores da PDE-5 não se restringem à atividade local. Tal medicamento apresenta capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e resultar em efeitos no sistema nervoso central e periférico (DE CARVALHO et al., 2019; LOUGHNEY et al., 1998). Estudos indicam a possibilidade de que fatores pró-inflamatórios estejam implicados na fisiopatologia das convulsões (HAJ-MIRZAIAN et al., 2019).

Nesse sentido, destaca-se o óxido nítrico (NO), que pode intensificar o estresse oxidativo por meio da superprodução de espécies reativas de oxigênio (LIN et al., 2020b; TAVAKOLI et al., 2023), resultando em danos celulares. Dado que os inibidores da PDE5 são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica (LOUGHNEY et al., 1998), sua ação potencializadora do NO, resulta no fenômeno de acúmulo de GMPc, atuando na via NO-GMPc, induzido pelo inibidor da PDE-5, o qual provoca abertura dos canais de potássio, que por sua vez levam a um estado de hiperpolarização neuronal, responsável por um efeito antinociceptivo, podendo ocasionar também ansiedade, cefaleia vasodilatadora, tontura e efeitos cerebrovasculares (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; HACKETT, 2006) e em última instância, eventos convulsivos.

No sistema nervoso central, o Sildenafil induz o aumento transitório dos níveis de glutamato no tronco encefálico, o que sugere aumento transitório da excitabilidade dos neurônios locais (YOUNIS et al., 2018). Vários artigos e relatos de casos mostraram alguma relação entre o aumento da excitabilidade neuronal e propriedades pró-convulsivas associadas ao uso de inibidores da PDE-5 (DEMCHENKO et al.,

2009; GHOLIPOUR et al., 2009; KHOSHNEVISZADEH et al., 2016; KOUSSA et al., 2006; MONTASER-KOUHSARI et al., 2011; NIEOCZYM et al., 2010, 2012; NIEOCZYM; SOCAŁA; WLAŹ, 2009, 2018; RIAZI et al., 2006; STRIANO et al., 2006). Contudo, esses eventos são considerados raros se tratando desta classe de medicamentos, podendo acometer pessoas sem históricos prévios de convulsão ou epilepsia (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; GILAD et al., 2002; RAHIMIAN et al., 2020).

Em estudos experimentais, De Carvalho et al. (2019) observaram que o limiar convulsivo é reduzido pelo uso do Sildenafil, para o modelo de convulsão da Pilocarpina, envolvendo vias colinérgicas no sistema nervoso central. Além disso, Okuyucu et al.(2009) relatam que os inibidores da PDE-5 podem produzir anormalidades na eletrocorticografia (ECoG).

Em vista do exposto, os inibidores da PDE-5 ainda guardam uma gama de efeitos adversos, em especial após administração excessiva de seus compostos. Para tanto, o Conselho Federal de Farmácia, através de nota oficial expedida em 2013, relata a utilização inapropriada e excessiva dos inibidores da PDE-5, destacando-se o uso de Sildenafil por homens que não apresentam qualquer tipo de dificuldade em ter ou manter uma ereção peniana (FREITAS; HOEFLER; PALHANO, 2013). Apesar disto, projeta-se que mais de 40% da população masculina acima dos 40 anos apresente algum tipo de disfunção sexual (JULIÁ-ROMERO, 2021).

No Brasil, a utilização dos inibidores da PDE-5 sem prescrição médica quadruplicou durante a primeira década do século 21, tornando-se uma epidemia entre os indivíduos com idade de 18 a 30 anos (FREITAS; HOEFLER; PALHANO, 2013). O Ministério da Saúde em relatório expedido sobre o Programa de Orientação e Atendimento a Dependentes (PROAD) em 2008, considerava a existência de utilização indiscriminada e excessiva dos inibidores da PDE-5, associado a evidências de uso concomitante com o cigarro, drogas ilícitas (maconha e cocaína) e álcool (FREITAS; HOEFLER; PALHANO, 2013). Desta forma, o uso indiscriminado contribui para o aumento na frequência dos efeitos adversos (COSTA COUTO, 2011).

Em vista do exposto, percebe-se o grave problema de saúde pública ao associar o uso indiscriminado de inibidores da PDE-5, com a carência de informações acerca de seus efeitos adversos, em especial no que tange sua possível interação e/ou sinergia a nível neuronal. Nesta perspectiva, considera-se justificável maiores estudos sobre os efeitos a nível central do uso dos inibidores da PDE-5, utilizando registros objetivos de sua influência, como ECoG, por exemplo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as alterações causadas pelo uso do Sildenafil e Tadalafil através da análise de anormalidades expressas no eletrocorticograma.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e analisar as possíveis alterações eletrocorticográficas nas ondas cerebrais de baixa frequência a partir da ação do Sildenafil e Tadalafil sobre o sistema nervoso central.
- Comparar as oscilações cerebrais de baixa frequência na presença e na ausência do uso do Sildenafil e Tadalafil, ressaltando a relevância das diferenças encontradas.
- Avaliar a possível alteração no limiar epilético após o teste com Pentilenotetrazol.
- Avaliar a refratariedade das crises convulsivas aos anticonvulsivantes Diazepam, Fenitoína e Fenobarbital, após a administração do Sildenafil mais Pentilenotetrazol e Tadalafil mais Pentilenotetrazol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

Projeto executado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará em Belém do Pará, no período de abril de 2021 a setembro de 2022

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 108 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com idade entre 100 e 120 dias e peso entre 200 e 220g. Os animais foram mantidos em gaiolas específicas para a espécie, com 3 ratos por gaiola, com dimensões de 60 x 40 x 20 cm. O ambiente foi enriquecido com cama de maravalha, temperatura mantida em 22 ± 2 °C, período claro-escuro de 12 horas, com água e ração à vontade (ração comercial da marca Purina® com 20% de proteína).

A escolha deste animal ocorreu pela experiência com registro ECoG de roedores por parte do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais (HAMOY et al., 2018). Além disto, a fisiologia e a vascularização cerebral destes roedores são semelhantes aos dos humanos, sendo usados, por exemplo, como modelo de estudo para acidente vascular cerebral isquêmico (YAMORI et al., 1976). Por fim, as obtenções dos 108 espécimes do animal foram necessárias para comprovar os efeitos e permitir a reprodutibilidade desse experimento por outros cientistas.

Todos os procedimentos seguiram a legislação brasileira vigente relacionada à ética na experimentação animal, e este projeto foi previamente aprovado pelo CEUA/UFPA (o número de aprovação do projeto é 5735240419).

3.3 CIRURGIA PARA COLOCAÇÃO DE ELETRODOS

Para implantação dos eletrodos, os animais foram anestesiados com associação de Cloridrato de Xilazina (5mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (50mg/kg) por meio de injeção intraperitoneal, com infiltração prévia de Lidocaína (2%) no local da incisão cirúrgica. Os eletrodos foram implantados na coordenada estereotáxica Bregma -0,96 mm (PAXINOS; WATSON, 2005) e ± 1 mm lateralmente à região da dura-máter logo acima do córtex motor (HAMOY et al., 2018; RODRIGUES DE OLIVEIRA et al., 2020; SILVA DE MELO et al., 2020; SOUZA-MONTEIRO et al., 2015) (**Figura 1**). Durante os primeiros dois dias após a cirurgia do implante, os animais receberam Cetoprofeno 1mg/kg i.p. e no quinto dia pós-operatório foi realizado o experimento.

Figura 1 - Cirurgia para colocação de eletrodos.



Nota: (A) Pontos de perfuração cirúrgica craniana. (B) Eletrodos implantados na coordenada estereotáxica de Bregma -0,96mm e ± 1 mm lateral à região da dura-máter. (C) fixação com acrílico autopolimerizável para uso odontológico. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Na anestesia e no pós-operatório, os animais foram acompanhados com monitoração de frequência cardíaca e temperatura, com análises feitas a cada 06 horas, durante 3 minutos. Por fim, foi garantido o manuseio dos animais em condições assépticas durante todos os experimentos.

3.4 DESIGN EXPERIMENTAL

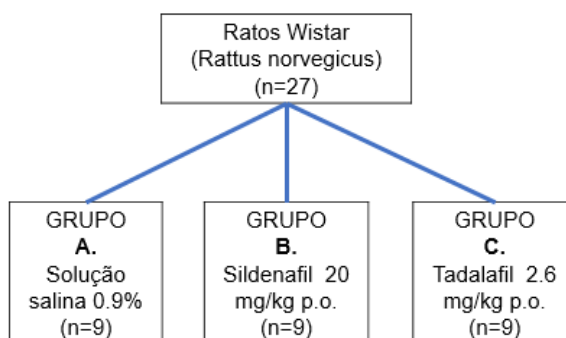
Os animais foram separados aleatoriamente em grupos para cada experimento. Os roedores permaneceram em gaiolas individualizadas desde a implantação dos eletrodos até as gravações de ECoG, com os registros sendo realizados das 08h às 10h (manhã). Todas as gravações foram realizadas trinta minutos após a administração dos medicamentos e analisadas por um período de dez minutos, apenas uma vez.

Foram realizados três experimentos. Para cada um, foram adotadas as seguintes dosagens: os grupos controle receberam oralmente solução salina a 0,9%; os grupos tratados com Sildenafil receberam 20 mg/kg por via oral (KORKMAZ et al., 2016); os grupos tratados com Tadalafil receberam 2,6 mg/kg por via oral (SARHAN; OMAR, 2018); os grupos tratados com Pentilenotetrazol (PTZ) receberam 30 mg/kg por via intraperitoneal (MUTO et al., 2022).

3.4.1 Experimento -1

Os animais foram separados em 3 grupos: a) o grupo controle (n=9); b) o grupo tratado com doses de Sildenafil (n=9); e c) o grupo tratado com Tadalafil (n=9) (**Figura 2**).

Figura 2. Desenho do experimento - 1.

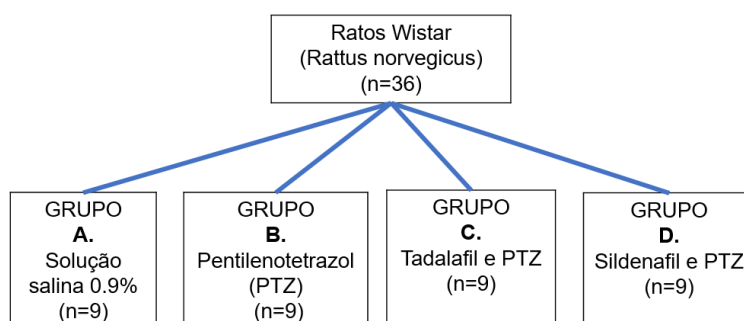


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

3.4.2 Experimento -2

Composto por quatro grupos em análise: a) Grupo de Controle (n=9); b) Grupo PTZ (n=9); c) Grupo Tadalafil e PTZ (n=9); e d) Grupo Sildenafil e PTZ (n=9) (**FIGURA 3**). Os grupos foram tratados com Tadalafil e Sildenafil trinta minutos antes da aplicação de PTZ para avaliar a atividade convulsiva por meio do ECoG nos ratos. As potências desses EcoG foram avaliadas e comparadas com os grupos controle através da diferença de potencial captada pelo eletrodo.

Figura 3. Desenho do experimento - 2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

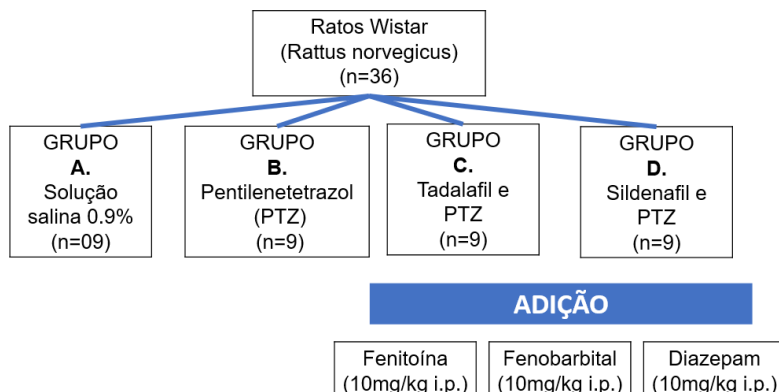
3.3.3 Experimento -3

Os grupos que receberam Tadalafil e Sildenafil associado ao PTZ (30 mg/kg i.p.) foram tratados com os seguintes anticonvulsivantes: Fenitoína (10mg/kg i.p.), Fenobarbital (10mg/kg i.p.) e Diazepam (10mg/kg i.p.). Portanto, os grupos formados foram comparados entre si e com os grupos controle que receberam oralmente uma solução salina de 0,9%.

No experimento 3, nove grupos foram analisados: a) grupo controle (n=9); b) grupo Tadalafil e PTZ (n=9); c) grupo Tadalafil, PTZ e Fenitoína (n=9); d) grupo Tadalafil, PTZ e Fenobarbital (n=9); e) grupo Tadalafil, PTZ e Diazepam (n=9); f) grupo Sildenafil e PTZ (n=9); g) grupo Sildenafil, PTZ e Fenitoína (n=9); h) grupo Sildenafil,

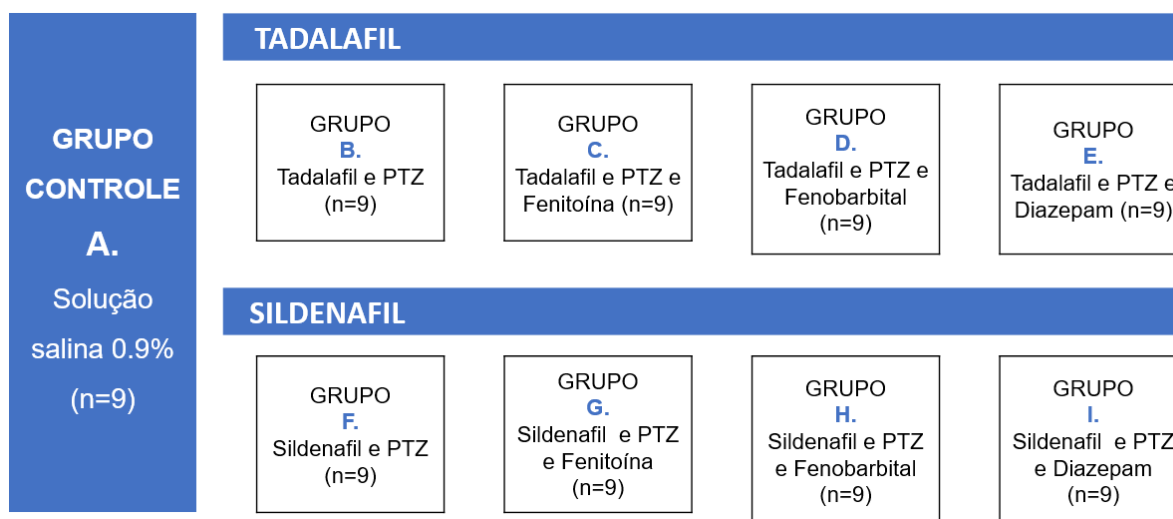
PTZ e Fenobarbital (n=9); i) grupo Sildenafil, PTZ e Diazepam (n=9) (**Figura 4 e 5**). Cada registro durou 10 minutos.

Figura 4. Desenho do experimento - 3: adição de drogas anticonvulsivantes.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 5. Desenho do experimento - 3: grupos de estudo. *PTZ – Pentilenotetrazol.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Com o objetivo de reduzir o número de animais utilizados no experimento, em conformidade com as diretrizes da CEUA / UFPA, os dados obtidos de grupos equivalentes foram reutilizados entre os experimentos: grupo controle (Experimentos 1, 2 e 3); grupo Tadalafil e PTZ (Experimentos 2 e 3); e grupo Sildenafil e PTZ (Experimentos 2 e 3).

Após o período de registro, os animais foram sacrificados por um profissional veterinário com altas doses de Cetamina (300 mg/kg), Xilazina (20 mg/kg) e Diazepam (10 mg/kg) (i.p.), seguindo os requisitos para a eutanásia desses animais.

3.5 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

O anestésico Cetamina foi adquirido da König (Santana de Parnaíba SP Brasil) e a Xilazina da Vallée (Montes Claros MG Brasil), enquanto o anestésico local Lidocaína foi adquirido da Hipolabor (Sabará MG Brasil). Os compostos anticonvulsivantes Fenobarbital foram adquiridos da Aventis-Pharma (Ribeirão Preto, SP, Brasil), Diazepam e Fenitoína da União Química (Embu-Guaçu, SP, Brasil). O PTZ foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Por fim, Citrato de Sildenafil 50 mg, Viagra® (Pfizer) (Guarulhos São Paulo – Brasil) e Tadalafil 20 mg, Cialis® (Lilly) (São Paulo SP- Brasil).

3.6 REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS

Os eletrodos foram conectados a um sistema digital de aquisição de dados composto por um amplificador de alta impedância (Grass Technologies, P511), um osciloscópio (Protek, 6510) e uma placa para aquisição e digitalização de dados (National Instruments, Austin, TX). Os dados foram amostrados continuamente a 1 kHz em uma passagem baixa de 3 kHz e uma passagem alta de 0,3 Hz. As gravações seguiram um protocolo padrão: 10 min de acomodação do animal, cuidadosamente imobilizado para evitar interferência de registros (HAMOY et al., 2018).

3.7 ANÁLISES DE DADOS

Análise realizada *off-line*, com delineamento duplo-cego controlado, por meio de uma ferramenta construída com a linguagem de programação Python (versão 2.7). As bibliotecas “Numpy” e “Scipy” foram usadas para o processamento matemático e a biblioteca “matplotlib” foi usada para obter gráficos e plotagens. Uma interface gráfica

foi desenvolvida utilizando a biblioteca PyQt4. Os espectrogramas foram calculados usando a janela de Hamming com 256 pontos (256/1000 s). Para a densidade espectral de potência (PSD), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro, o PSD foi calculado pelo método do periodograma médio de Welch. Os histogramas de frequência foram obtidos calculando o PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos sem sobreposição, resultando em uma resolução de 1 Hz por bin. Cada onda exibida no PSD é uma média de um conjunto de experimentos. PSDs foram calculados em cada grupo e as médias são mostradas por bins individuais (HAMOY et al., 2018).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

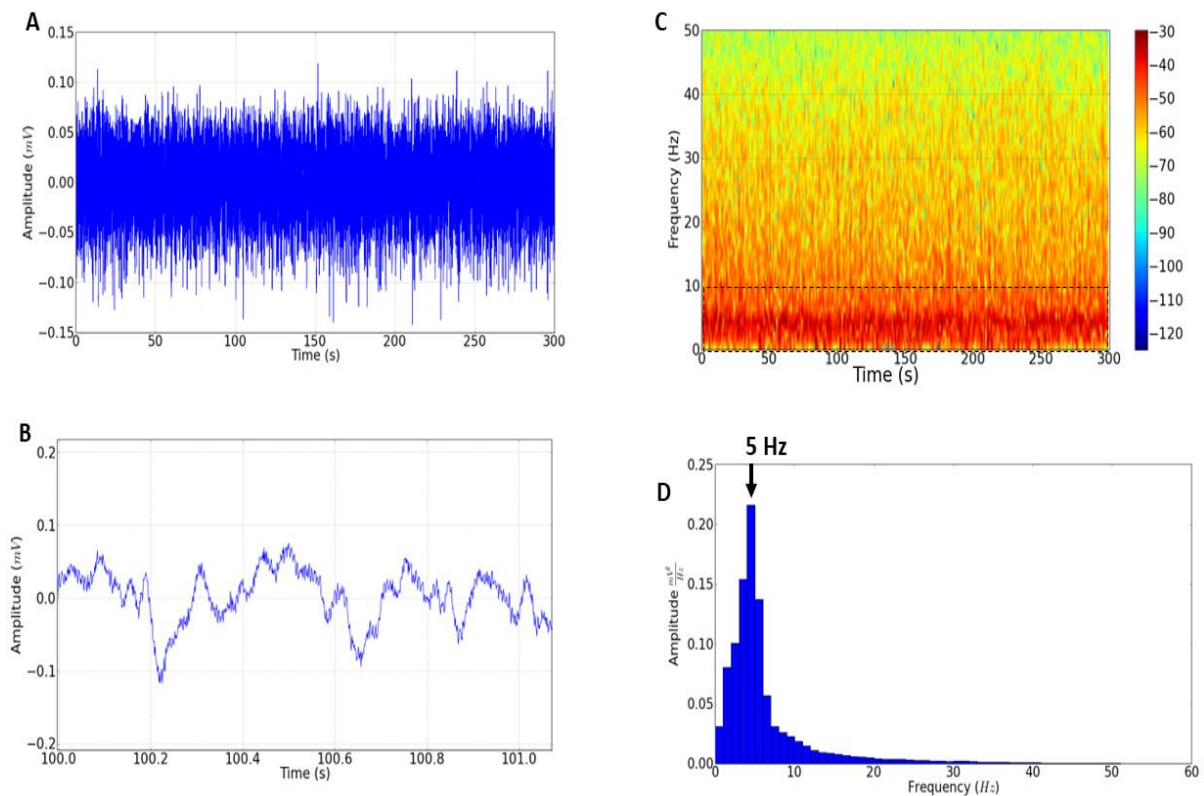
A normalidade e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Para apresentação dos gráficos e cálculo estatístico foi utilizado o software prism®. Para comparar os registros de potência dos grupos (controle, Sildenafil e Tadalafil) foram aplicados os testes ANOVA (análise de variância) e Tukey visando um nível de significância estatística de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os dados e a análise estatística estão de acordo com as recomendações sobre desenho experimental e análise em farmacologia (CURTIS et al., 2018).

Para a análise das oscilações das ondas cerebrais, foram considerados as seguintes frequências: Delta (1,0–4,0Hz), Theta (4,0–8,0Hz), Alfa (8,0–12,0Hz), Beta (12,0–28,0Hz) e Gama (28,0–40,0 Hz).

4. RESULTADOS

O registro do grupo controle apresentou amplitude variando de 0,05 a 0,1mV (**Figura 6A e 6B**) e o espectrograma demonstrou maior intensidade energética nas frequências entre 1,0 a 10,0 Hz (**Figura 6C**). O histograma mostrou maior amplitude em 5,0 Hz corroborando com a distribuição de energia observada no espectrograma (**Figura 6D**).

Figura 6 - Atividade Cerebral do Grupo Controle.

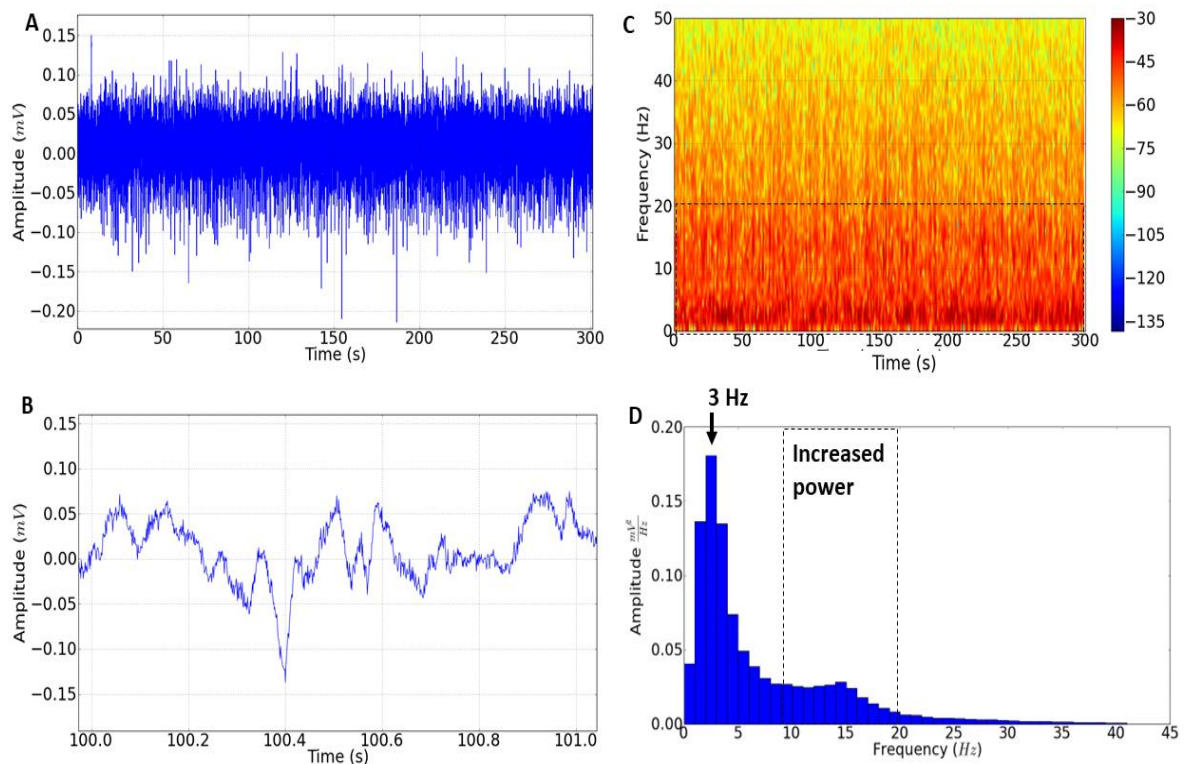


Nota: (A) Registro eletrocorticográfico do animal em estado basal com duração de 300 segundos (s); (B) Amplificação do registro eletrocorticográfico em tempo de 1 s (para demonstração do traçado padrão de controle); (C) O espectrograma demonstra a concentração da distribuição de energia espectral no grupo controle (indicado pela linha tracejada); (D) O histograma mostra maior intensidade de energia na frequência de 5 Hz (indicado pela seta). **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Após a administração do Sildenafil, o registro eletrocorticográfico mostrou variação de amplitude de 0,05 a 0,1 mV, semelhante à observada no registro do grupo controle (**Figura 7A e 7B**). A diferença entre o grupo Sildenafil e o grupo controle está

relacionada à distribuição de energia, que se mantém entre 1,0 a 20,0 Hz, podendo ser observada na distribuição espectral de energia (**Figura 7C**). O histograma de distribuição da amplitude nas frequências individuais até 40 Hz, demonstra uma maior amplitude na frequência de 3,0 Hz. Pode-se observar também o aumento de amplitude nas frequências entre 10,0 a 20,0 Hz, após o uso do Sildenafil (**figura 7D**).

Figura 7 - Característica do registro electrocorticográfico após administração de Sildenafil.

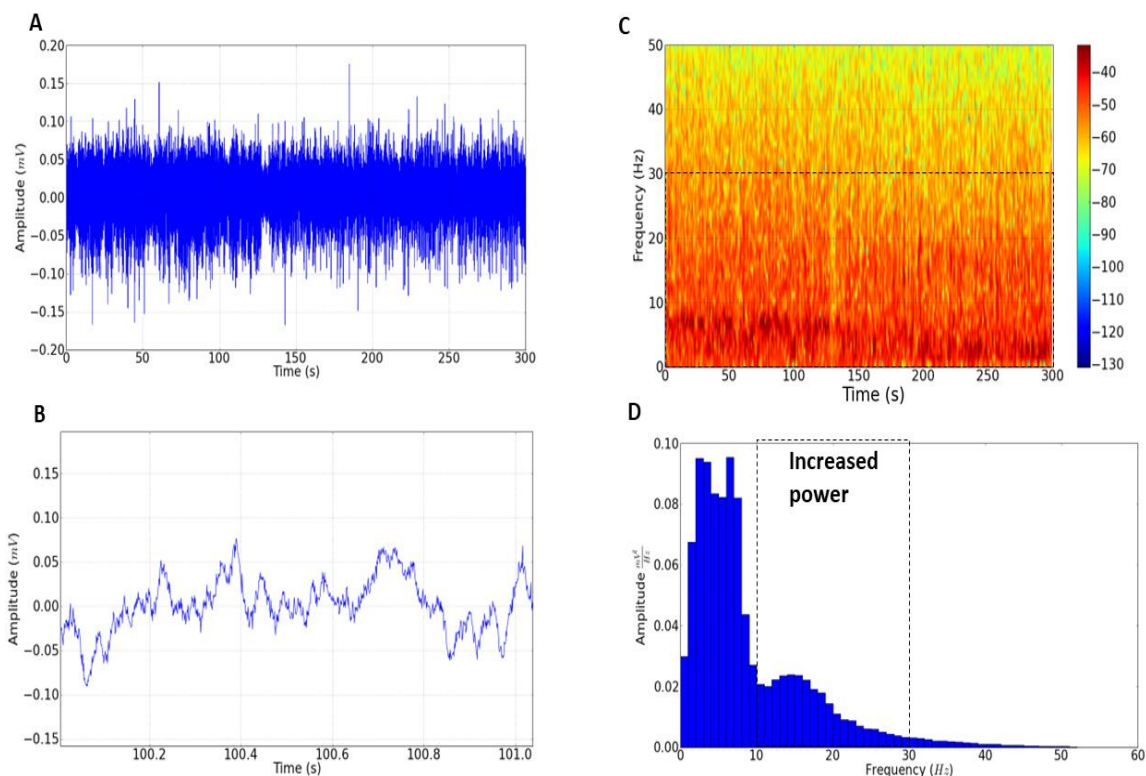


Nota: (A) Gravação electrocorticográfica com duração de 300s (demonstrando amplitude em mV); (B) Amplificação do registro electrocorticográfico (1,0 s) demonstrando as características das frequências e amplitude; (C) Espectrograma demonstrando distribuição de energia com aumento da assincronia cerebral em frequências de até 20 Hz (linha tracejada); (D) Histograma de distribuição de amplitude. A frequência predominante é de 3 Hz (indicada pela seta). Mostra um aumento de potência nas frequências até 20 Hz (indicado pela linha tracejada). **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Após a aplicação do Tadalafil, observou-se alteração na distribuição de potência nas frequências de até 30 Hz (indicada pela linha tracejada) (**Figura 8C**). O grupo tratado com Tadalafil obteve maior assincronia cerebral captada pelo eletrodo; no entanto, apresentou amplitudes com variação semelhante ao grupo controle de 0,05 a 0,1 mV (**Figura 8A e 8B**). O espectrograma mostrou mudanças nas potências espectrais em frequências entre 1,0 a 30,0 Hz, que causaram mudanças nas

oscilações cerebrais (**Figura 8C**). O histograma mostrou que as amplitudes dominantes estão entre 2,0 a 8,0 Hz (**Figura 8D**), e houve aumento da assincronia cerebral nas bandas de frequência em Alfa (8-12 Hz) e Beta (12-28 Hz).

Figura 8 - Característica do registro eletrocorticográfico após administração de Tadalafil.

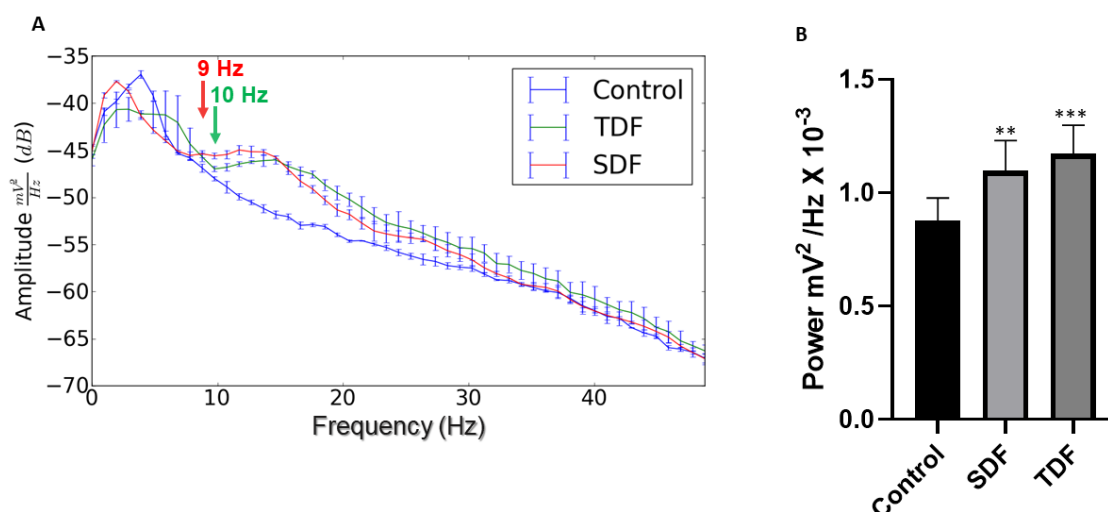


Nota: (A) Registro eletrocorticográfico com duração de 300s, traçado com amplitude em mV; (B) Amplificação do registro eletrocorticográfico (1,0 s) demonstrando característica do traçado; (C) Espectrograma demonstrando distribuição de energia com aumento da assincronia cerebral em frequências de até 30 Hz (linha tracejada). (D) O histograma de distribuição de amplitude mostrou perda da frequência predominante, com aumento da potência nas frequências até 30 Hz (indicado pela linha tracejada). **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Assim, os inibidores da PDE-5 apresentaram aumento de potência nas bandas de frequência Alfa (8-12 Hz) e Beta (12-28 Hz), porém o espectrograma demonstra maior intensidade espectral para o Tadalafil (**Figura 7 e 8**).

A análise de Fourier mostrou maior aumento de potência de forma sincronizada para Sildenafil (9 Hz) e Tadalafil (10 Hz), demonstrando assincronia cerebral causada pelos inibidores da PDE-5 (**Figura 9A**).

Figura 9 - Distribuição da potência espectral relativa aos registros dos grupos: controle, Sildenafil (SDF) e Tadalafil (TDF).



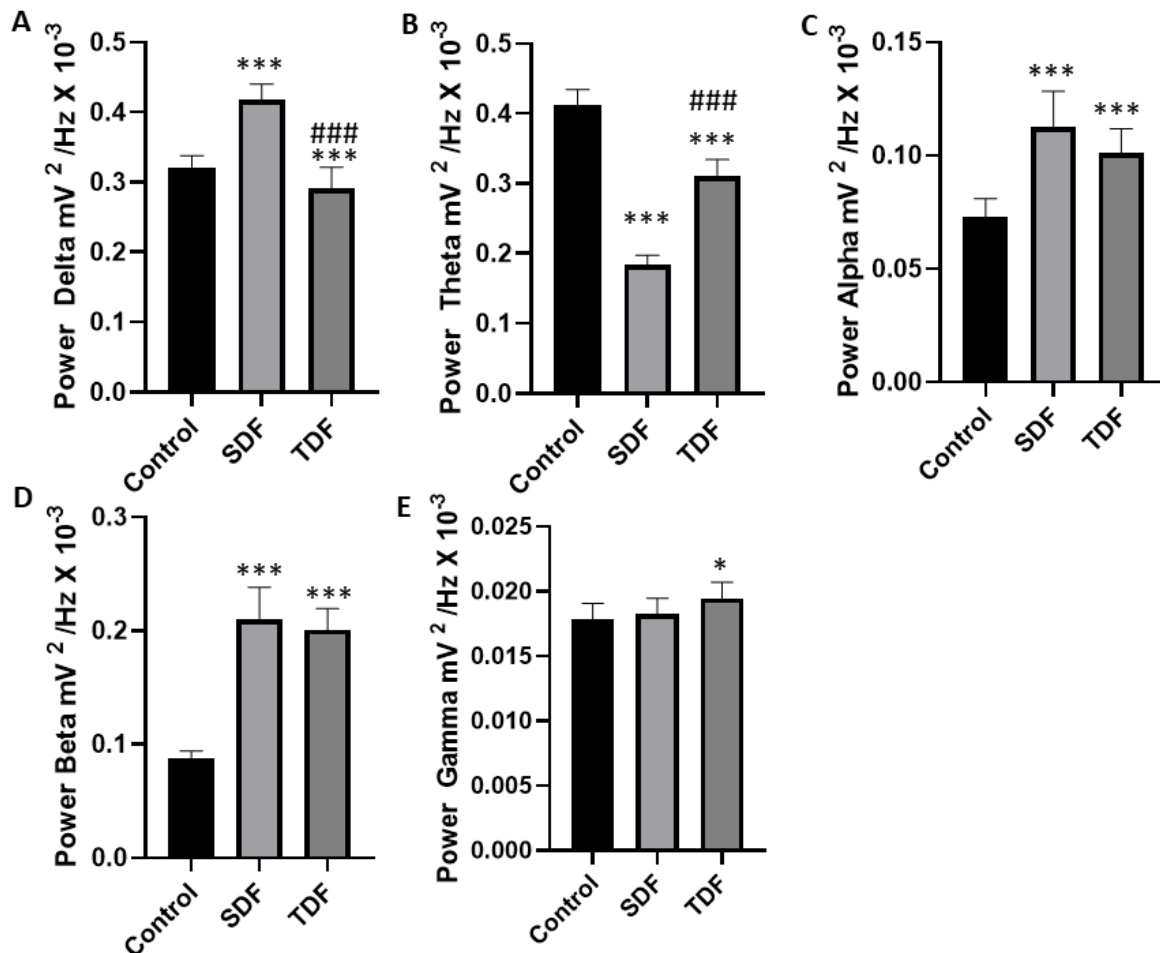
Nota: (A) Distribuição espectral das médias de potência (SD) nas frequências de até 50 Hz do controle (linha azul), SDF (linha vermelha) e TDF (linha verde). A seta vermelha indica o início do aumento da assincronia cerebral para o SDF, e a seta verde indica o início do aumento da assincronia cerebral para o TDF. (B) Distribuição linear de potência em frequências de até 50 Hz. *indica diferença estatística para o grupo controle. (ANOVA e pós-teste de Tukey) (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. (n = 9). **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Na distribuição da potência linear nas frequências até 50 Hz, observou-se que a potência média para o grupo controle foi de $0,8766 \pm 0,1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, apresentando diferença estatística para o grupo Sildenafil com média de $1,096 \pm 0,1345 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p=0,0021$). Diferenças estatísticas também foram observadas no grupo tratado com Tadalafil, cuja média foi de $1,172 \pm 0,1256 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ (ANOVA Tukey post-test $F= 14,48$) ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados (**Figura 9B**).

A análise das médias de potência Delta mostraram maior intensidade de energia medida no grupo tratado com Sildenafil (**Figura 10A**). A análise das oscilações Delta mostraram que a média do grupo controle foi de $0,3565 \pm 0,04375 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, apresentando diferença estatística quando comparada ao grupo tratado com Sildenafil com média de $0,4213 \pm 0,02084 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, revelando aumento desse parâmetro ($p < 0,001$). Também foi observada diferença estatística para o tratamento com Tadalafil cuja média foi de $0,2869 \pm 0,03019 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ com diminuição da potência de oscilações Delta para Tadalafil ($p < 0,001$). Quando comparado aos grupos

tratados, houve uma diferença estatística indicando a dominância das oscilações Delta para o Sildenafil (**Figura 10A**).

Figura 10 - Gráficos demonstrando a variação das médias de potência linear para bandas de oscilação cerebral.



Nota: (A) Oscilações cerebrais na banda Delta (1,0 - 4,0 Hz), (B) Oscilações cerebrais na banda Theta (4,0 - 8,0 Hz). (C) Variação nas oscilações na banda Alfa (8-12 Hz), (D) Oscilação de frequência na banda Beta (12-28 Hz), (E) Variação nas oscilações Gama (28-40 Hz). (SDF) grupo Sildenafil, (TDF) grupo Tadalafil; (*) indica uma diferença estatística do grupo controle, (#) indica uma diferença estatística para o grupo SDF. (ANOVA e pós-teste de Tukey) *p <0,05, ** p<0,01, *** p<0,0001 (n = 9).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A análise das médias de potência em Theta mostraram maior intensidade energética para o grupo controle (**Figura 10B**). A análise das oscilações Theta mostraram que a média do grupo controle foi de $0,4123 \pm 0,02223 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, apresentando diferença estatística para o grupo Sildenafil ($0,1846 \pm 0,01326 \text{ mV}^2/\text{Hz}$

$\times 10^{-3}$); o grupo Tadalafil, cuja média foi de $0,3107 \pm 0,02359 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, manteve diferença estatística em relação ao grupo controle. Ao comparar o grupo Sildenafil com o grupo Tadalafil, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (**Figura 10B**).

A partir do aumento das bandas de frequência em Alfa, ocorreu a sincronização entre os agentes inibidores da PDE, com aumento da potência a partir de 9 Hz para o Sildenafil e 10 Hz para o Tadalafil (**Figura 9A**). Ao analisar as oscilações Alfa de forma linear, o registro médio do grupo controle foi de $0,07278 \pm 0,008246 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, apresentando diferenças estatísticas para o grupo Sildenafil com média de $0,1128 \pm 0,01563 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e Tadalafil com média de $0,1012 \pm 0,01066 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p < 0,001$). Quando comparados, os grupos tratados com Sildenafil e Tadalafil não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre eles ($p = 0,0920$) conforme mostrado na **Figura 10C**.

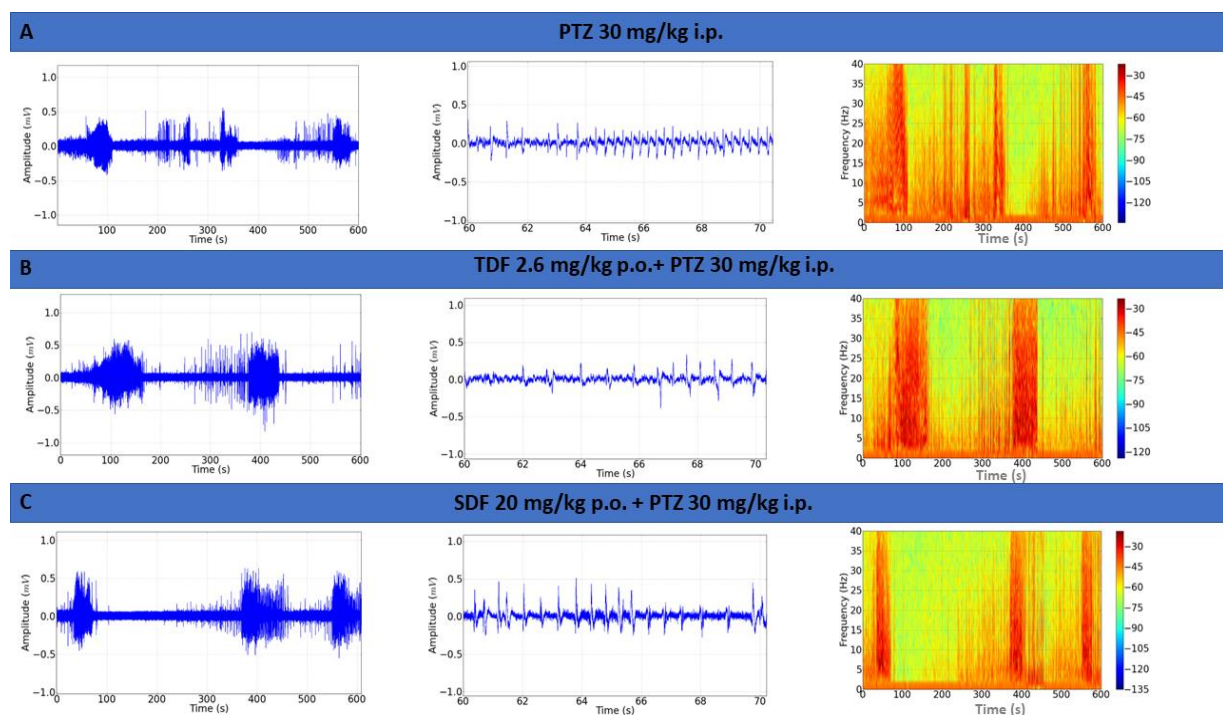
A análise das médias de potência em Beta mostrou maior diferença de intensidade energética para os grupos Sildenafil e Tadalafil em relação ao controle. Os grupos tratados com Sildenafil e Tadalafil não diferiram em intensidade ($p = 0,6022$), mas ambos tiveram intensidades muito acima dos registros do grupo controle, conforme mostrado na **Figura 10D**. Ao analisar linearmente as oscilações Beta a média do grupo controle foi de $0,08700 \pm 0,007088 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, apresentando diferença estatística em relação ao grupo tratado com Sildenafil com média de $0,2095 \pm 0,02854 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ e o tratado com Tadalafil de $0,2009 \pm 0,01841 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p < 0,001$).

Ao analisar as oscilações Gama linearmente, a média do grupo controle foi de $0,01786 \pm 0,001188 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, não apresentando diferença estatística em relação ao grupo Sildenafil ($0,01822 \pm 0,001221 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p = 0,7801$). O grupo Tadalafil ($0,01945 \pm 0,001243 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0182$), conforme mostrado na **Figura 10E**. Os grupos tratados não apresentaram diferença estatística ($p = 0,801$).

Os traçados ECoG obtidos após a aplicação do PTZ mostraram irregularidade e mudanças de amplitude com presença de *clusters* de potenciais, a amplificação

demonstra picos de ondas nos registros e o espectrograma demonstra a concentração de energia nos *clusters* de potenciais **figura 11A**. Após o uso do Tadalafil, a indução das crises com PTZ manteve as características de maior duração dos picos de potencial, as irregularidades observadas durante a amplificação e as observadas no espectrograma (**Figura 11B**). Após o uso do Sildenafil, a indução de convulsões por PTZ apresentou características como aumento da amplitude, com maior duração dos picos de potencial em relação ao grupo PTZ, observado com picos na amplificação e concentração de energia no espectrograma (**Figura 11C**).

Figura 11 - Traçado eletrocorticográfico (ECoG) de um rato Wistar após a aplicação da droga.

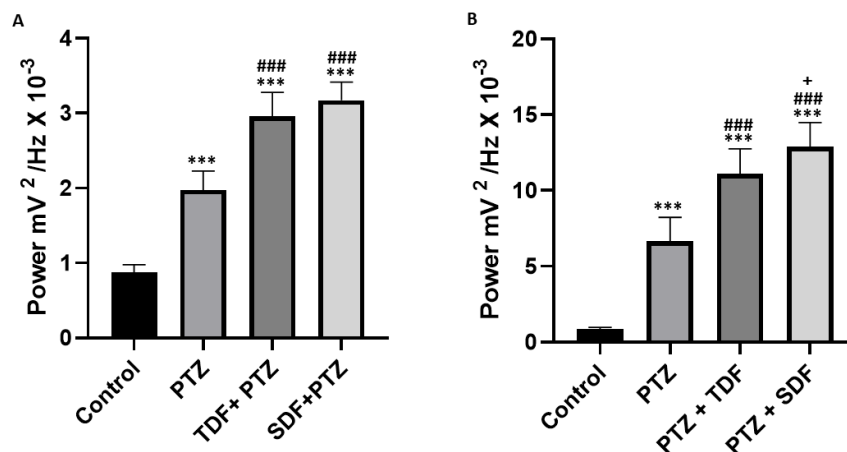


Nota: (A) Registro do ECoG após administração de Pentilenotetrazol (PTZ) (esquerda), amplificação do traçado em 10 segundos (60-70 s) (centro), registro em espectrograma (direita); (B) Gravação ECoG após administração de Tadalafil (TDF) seguido de aplicação de Pentilenotetrazol (PTZ) (esquerda), amplificação de registro (centro), registro em espectrograma de registro (direita); (C) Gravação demonstrativa do ECoG para grupo Sildenafil (SDF) e PTZ (esquerda), amplificação do registro (centro) e espectrograma correspondente (direita). **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

No grupo controle, o gráfico de distribuição de potência linear apresentou uma média de $0,8766 \pm 0,1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, houve diferença estatística para o grupo PTZ ($1,974 \pm 0,2527 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0,001$). O grupo Tadalafil mais PTZ apresentou média de $2,957 \pm 0,3201 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, resultando em diferença estatística para os grupos controle e PTZ ($p < 0,001$). O grupo Sildenafil mais PTZ com média de $3,172 \pm$

0,2428 mV²/Hz × 10⁻³, apresentou diferença estatística para os grupos controle e PTZ (p<0,001) (**Figura 12A**).

Figura 12 - Potência linear média dos registros por grupos.



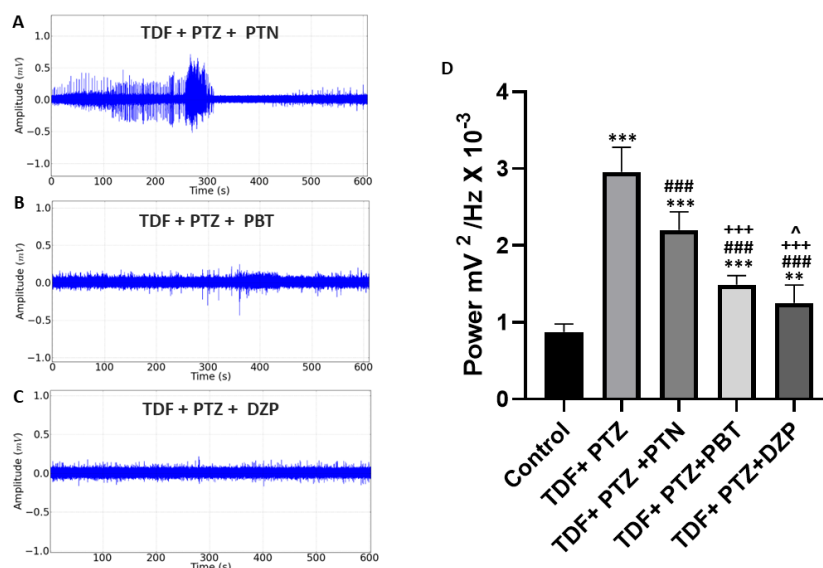
Nota: (A) durante a convulsão induzida por Pentilenotetrazol; (B) durante salva potencial em registros de convulsões induzidas por PTZ. As diferenças estatísticas foram obtidas após ANOVA e teste de Tukey (n=9). (*) indica diferença estatística para o grupo controle, (#) indica diferença estatística para PTZ e (+) indica diferença estatística para o grupo Tadalafil+PTZ. Os valores de *p* entre as amplitudes médias são representados pelos asteriscos *p<0,05, **p<0,01 e ***p < 0,001. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

Considerando os aumentos de potenciais causadas pelo PTZ, pode-se observar que o grupo Tadalafil mais PTZ (11,10 ± 1,647 mV²/Hz × 10⁻³) apresentou uma potência média significativamente menor do que o grupo Sildenafil mais PTZ (12,88 ± 1,600 mV²/Hz × 10⁻³) (p<0,05). Os grupos Tadalafil mais PTZ e Sildenafil mais PTZ mostraram uma diferença significativa quando comparada à potência média do grupo PTZ (6,646 ± 1,587 mV²/Hz × 10⁻³) e do grupo controle (0,8766 ± 0,1009 mV²/Hz × 10⁻³) (p< 0,001) (**Figura 12B**).

O controle da convulsão induzida após aplicação de Tadalafil mais PTZ foi observado em diferentes registros ECoG após aplicação de Fenitoína, Fenobarbital e Diazepam. O traçado observado após a aplicação da Fenitoína mostra um aumento de potenciais com amplitude superior a 0,5 mV, seguida de diminuição progressiva da amplitude (**Figura 13A**). O grupo Fenitoína (2,202 ± 0,2354 mV²/Hz × 10⁻³) apresentou potência média menor que o grupo Tadalafil mais PTZ (2,957 ± 0,3201 mV²/Hz × 10⁻³) (p<0,001), também apresentando diferença para o grupo controle (0,8766 ± 0,1009

mV²/Hz × 10⁻³) ($p < 0,001$) (**Figura 13D**). O grupo que recebeu Fenobarbital para controle de convulsões apresentou traçado com diminuição dos picos de amplitude (**Figura 13B**), o gráfico de potência linear mostrou que o grupo Fenobarbital apresentou potência média ($1,489 \pm 0,1184$ mV²/Hz × 10⁻³) inferior ao grupo Tadalafil mais PTZ e Fenitoína ($p < 0,001$), e mostrou maior potência do que o grupo controle ($p < 0,001$). O grupo que recebeu Diazepam apresentou traçado mais regular e de baixa amplitude (**Figura 13C**), apresentando uma potência média de $1,253 \pm 0,2308$ mV²/Hz × 10⁻³, com diminuição em relação ao grupo Tadalafil mais PTZ e Fenitoína ($p < 0,001$), para o grupo Fenobarbital ($p < 0,05$) e para o grupo controle ($p < 0,01$) (**Figura 13D**).

Figura 13 - Registros eletrocorticográficos (ECoG) representativos obtidos após tratamento com Tadalafil seguido de Pentilenotetrazol.



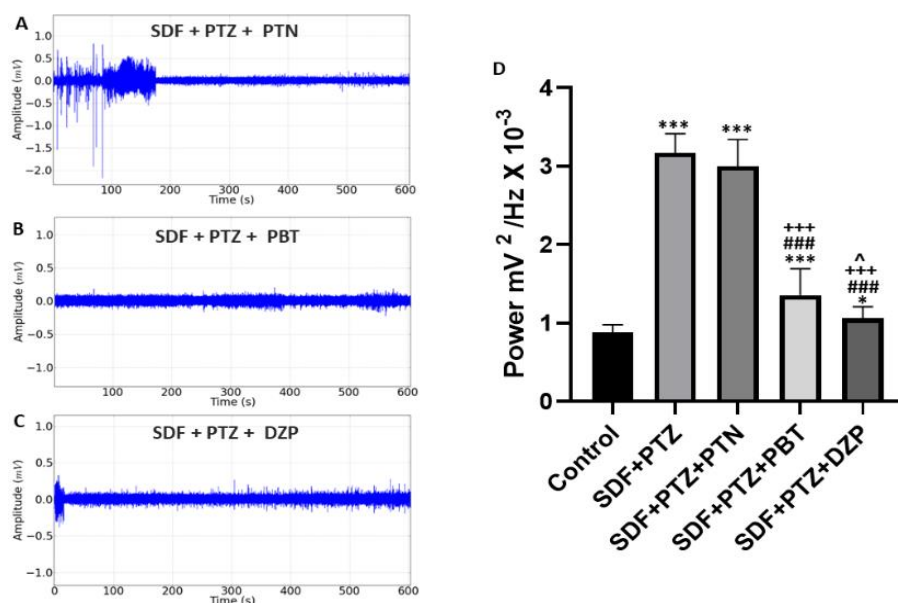
Nota: (A) Traçado obtido após aplicação de Fenitoína (PTN); (B) traçado obtido após aplicação de Fenobarbital (PBT); (C) traçado obtido após a aplicação do Diazepam (DZP). (D) Gráfico demonstrando as médias de potência linear dos registros após aplicação de anticonvulsivantes. Diferenças estatísticas obtidas após ANOVA e teste de Tukey (n=9). (*) indica diferença estatística para o grupo controle, (#) indica diferença estatística para o grupo que recebeu TDF+PTZ, (+) indica diferença estatística para o grupo TDF+PTZ+ PTN e (^) indica diferença estatística para o grupo TDF+PTZ+ PBT. Os valores de p entre as amplitudes médias são representados pelos asteriscos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

O controle da convulsão induzida após aplicação de Sildenafil mais PTZ foi observado por registros ECoG após aplicação de anticonvulsivantes. O traçado observado após a aplicação da Fenitoína apresenta inicialmente irregularidades e

amplitude elevada, acima de 0,5 mV, seguida de diminuição progressiva da amplitude (**Figura 14A**). O grupo Fenitoína ($3,001 \pm 0,3412 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) apresentou potência média sem diferença estatística para o grupo Sildenafil mais PTZ ($3,172 \pm 0,2428 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p=0,2938$), apresentando diferença para o grupo controle ($0,8766 \pm 0,1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p<0,001$) (**Figura 14D**). O grupo que recebeu Fenobarbital para controle das convulsões apresentou traçado com diminuição da amplitude dos picos (**Figura 14B**), menor que o grupo Tadalafil mais PTZ e Fenitoína ($p<0,001$) e mostrou maior potência que o grupo controle ($p<0,001$). O grupo que recebeu Diazepam (**Figura 14C**) apresentou decréscimo da potência média ($1,061 \pm 0,1458 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) em relação ao grupo Tadalafil mais PTZ e Fenitoína ($p<0,001$); para o grupo Fenobarbital ($p<0,01$) e para o grupo controle houve diferença estatística ($p<0,05$) (**Figura 14D**).

Figura 14 - Registros electrocorticográficos (ECoG) representativos obtidos após tratamento com Sildenafil seguido de Pentilenotetrazol.



Nota: (A) Traçado obtido após aplicação de Fenitoína (PTN); (B) traçado obtido após aplicação de Fenobarbital (PBT); (C) traçado obtido após a aplicação do Diazepam (DZP). (D) Gráfico demonstrando as médias de potência linear dos registros após aplicação de anticonvulsivantes. As diferenças estatísticas foram obtidas após ANOVA e teste de Tukey ($n=9$). (*) indica diferença estatística para o grupo controle, (#) indica diferença estatística para o grupo que recebeu SDF + PTZ, (+) indica diferença estatística para o grupo SDF+PTZ+ PTN e (^) indica diferença estatística para o grupo SDF + PTZ + PBT. Os valores de p entre as amplitudes médias são representados pelos asteriscos * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p < 0,001$. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2022.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que inibidores da PDE-5 são capazes de diminuir o limiar de convulsões. Essa descoberta pode estar relacionada à modulação desse medicamento na via nitrérgica.

Atualmente, o principal uso clínico dos inibidores da PDE-5 envolve o tratamento da disfunção erétil, cujo mecanismo ocorre pela redução da atividade catalítica da enzima PDE-5 no músculo liso vascular do pênis. Isso potencializa os efeitos endógenos do NO, sintetizado pela NOS, que ativa a GC e induz a produção de GMPc. Esse mecanismo causa relaxamento dos músculos lisos do pênis e dilatação arterial, promovendo a ereção ao distender os corpos cavernosos (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; DE CARVALHO et al., 2019; RAHIMIAN et al., 2020).

Como os inibidores da PDE5 podem atravessar a barreira hematoencefálica (LOUGHNEY et al., 1998), efeitos na via nitrérgica podem ser esperados nas células cerebrais. Nesse sentido, estudos demonstram a associação entre a via nitrérgica e a diminuição do limiar de convulsões (AMIRI et al., 2016, 2016; HAJ-MIRZAIAN et al., 2019; TAVAKOLI et al., 2023). O NO desempenha um papel excitatório na patogênese das convulsões (AMIRI et al., 2016; HAJ-MIRZAIAN et al., 2019), em que a administração de antagonistas da NO sintase (L-NAME) pode aumentar o limiar de convulsões (HAJ-MIRZAIAN et al., 2019), e a produção excessiva de NO em condições patológicas diminui o limiar de convulsões induzido por PTZ (AMIRI et al., 2016).

As variações nas intensidades de potência nas oscilações cerebrais podem ser causadas pelo uso de drogas (DAVIDSON, 2004; SICLARI; TONONI, 2017), como distúrbios hormonais e terapia de reposição de testosterona (ESTUMANO et al., 2019). Estudos sobre o ritmo das ondas Alfa mostram que o aumento da amplitude está relacionado à gravidade da somatização observada nos pacientes, após considerar a influência da ansiedade e da depressão (GRUBER et al., 2014; YE et al., 2019). Outros estudos também acrescentam consequências como a piora do

desempenho em simuladores automotivos em pacientes com aumento das ondas Theta, Alfa e Beta na região occipital (LIN et al., 2020). Nossa análise dos registros ECoG em ratos demonstraram um aumento de potência nas bandas de frequência em Alfa após a aplicação de Sildenafil e Tadalafil. Também demonstraram sincronização da elevação das potências nas oscilações cerebrais em Alfa, Beta e Gama, após aplicação de inibidores de PDE-5 (**Figura 9A**).

Experimentos prévios encontraram presença de PDE-5 no córtex cerebral de roedores e regiões do hipocampo onde a administração de inibidores seletivos de PDE causaria acúmulo de GMPc (PUZZO et al., 2008). No entanto, também é importante destacar as possibilidades de efeitos adversos (GOFF et al., 2009). Além disso, foi relatada diminuição do limiar epiléptico (ação pró-convulsivante) após o uso de inibidores da PDE (GILAD et al., 2002; KHOSHNEVISZADEH et al., 2016; MONTASER-KOUHSARI et al., 2011; NIEOCZYM et al., 2010, 2012; NIEOCZYM; SOCAŁA; WLAŻ, 2018). De acordo com Hamoy et al. (2018) e Silva de Melo et al. (2020), um aumento na banda de frequência em Beta no córtex motor de ratos está relacionado ao aparecimento de convulsões. Esses dados corroboram com nossos resultados, em que o uso de Sildenafil e Tadalafil aumentam a potência na faixa de frequência em Beta.

A faixa Beta é modulada por tarefas cognitivas que requerem uma relação entre estados sensoriais e motores (HERRMANN et al., 2016; ZAEPFFEL et al., 2013). A estimulação cerebral por eletroterapia mostra um aumento significativo nas ondas Beta, bem como aumento do foco de atenção e concentração (LANDE; GRAGNANI, 2018). Existem divergências entre os autores, pois existem textos científicos que correlacionam o aumento dessa faixa de frequência específica com ansiedade, inquietação, irritação, distúrbios do sono (O'NEIL et al., 2012; PRICHEP, 2007) ou associações dessa banda de frequência junto com forças Theta em condições depressivas e de dependência química (NEWSON; THIAGARAJAN, 2018). O uso de Sildenafil e Tadalafil aumentou as oscilações cerebrais em Beta, que podem estar relacionadas a um ou mais dos vários distúrbios neurológicos mencionados (**Figura 10D**).

Outros achados de interesse são o aumento das amplitudes das ondas Gama observadas em roedores submetidos a experimentos com Tadalafil, que foi relacionado ao aumento da presença de neurotransmissores catecolaminérgicos no córtex (BERRIDGE et al., 2006). Também observado em pacientes que usam modafinil para o tratamento da esquizofrenia (MINZENBERG et al., 2016) e usado para melhora das atividades de percepção sensorial, manutenção da atenção, processamento da informação, memória e estado de consciência (FINK et al., 2009; HERRMANN et al., 2016).

Há também aumentos nas potências Delta, Alfa e Beta no uso de heroína e morfina que exibem um perfil de eletroencefalograma (EEG) semelhante aos resultados obtidos com o Sildenafil, pois esta droga causou uma alteração semelhante às três ondas mencionadas acima (ZANETTINI et al., 2019). O trabalho em andamento na modulação da plasticidade sináptica baseada em micromoléculas, como NYX-2925 - modulando os receptores NMDA - para o tratamento da dor em doenças como fibromialgia e neuropatia periférica diabética, também busca aumentar as ondas Alfa (BURGDORF et al., 2019). Nosso trabalho demonstrou a sincronização do aumento das potências nas bandas Alfa e Beta após o uso de Sildenafil e Tadalafil (**Figura. 10C e 10D**).

Segundo Sroykham & Wongsawat (2018), na análise do EEG de pacientes em repouso, a proporção de oscilações Delta/Beta pode estimar os níveis hormonais de testosterona e cortisol, sendo biomarcadores de distúrbios fisiológicos e psicológicos.

O aumento da potência Beta está relacionado ao comportamento agressivo observado nos animais, devido à atividade na região talâmica/cortical (ESTUMANO et al., 2019; KIEHL, 2006; MORIHISA; DUFFY; WYATT, 1983). Segundo nossos dados, o aumento da potência das oscilações em Beta pode estar relacionado à diminuição do limiar convulsivo, pois após a aplicação do PTZ houve aumento da potência registrada para os grupos que receberam Tadalafil e Sildenafil previamente (**Figura 12**). Milman & Arnold (2002) mostraram evidências de associação entre Sildenafil e vários efeitos adversos no sistema nervoso central, incluindo convulsões.

Marcadores de EEG de ondas rápidas observaram atividades Alfa e Beta aumentados no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (CALLAWAY; HALLIDAY; NAYLOR, 1983). Em população semelhante, foi identificado aumento da potência Beta nas regiões parietal e do lobo occipital após o uso de metilfenidato ou atomoxetina (ALDEMIR et al., 2018). Os animais que receberam Sildenafil e Tadalafil apresentaram oscilações Alfa e Beta aumentadas (**Figura 10C e 10D**).

A dessincronização Beta é um processo importante na geração do movimento (MORILLON et al., 2019), o Alfa está associado ao recrutamento de um conjunto funcional necessário para gerar a saída motora (ATHANASIOU et al., 2018; RHODES et al., 2018). Portanto, ao relacionar Alfa e Beta é possível inferir que a proporção de Beta aumenta de forma não sincronizada com Alfa, ao analisar a distribuição de potência espectral (**Figura 9, 10C e 10D**). Por conseguinte, tanto o Sildenafil quanto o Tadalafil podem causar um atraso na execução dos movimentos planejados.

Segundo Carvalho et al. (2019), a redução do limiar epiléptico pelo Sildenafil estaria relacionada ao aumento da atividade colinérgica e nitrérgica no cérebro. Nieoczym et al. (2010) observaram que o Sildenafil não influenciou significativamente o limiar de convulsão focal na amígdala em modelo de epilepsia em rato, nem influenciou a gravidade da convulsão e teve fraca ação anticonvulsivante. Nieoczym, Socała & Wlaż (2009), observaram que não houve influência do Sildenafil na latência para convulsões clônicas induzidas pela administração de cocaína, não influenciando na incidência e mortalidade.

No entanto, na literatura, há relatos de alterações na homeostase cerebral relacionadas ao uso de inibidores da PDE-5 (CALABRÒ; REITANO; BRAMANTI, 2013; FAROOQ et al., 2008; JULIÁ-ROMERO, 2021; OKUYUCU et al., 2009; SOCAŁA et al., 2018). Nossos dados demonstram que tanto o Sildenafil quanto o Tadalafil aumentaram a força dos registros de potencial de campo após a administração de PTZ, no entanto, os registros para o grupo PTZ e Sildenafil apresentou picos de maior intensidade energética quando comparado ao grupo PTZ e Tadalafil (**Figura 12**).

Gholipour et al. (GHOLIPOUR et al., 2009) sugerem que os inibidores de PDE-5 podem facilitar a inibição mediada por GABA (A) e podem potencializar a ação de benzodiazepínicos contra convulsões induzidas por PTZ. Para avaliar a possível refratariedade das crises, os anticonvulsivantes dos grupos Tadalafil-PTZ e Sildenafil-PTZ apresentaram maior resistência à ação da Fenitoína. Para o grupo Sildenafil e PTZ, a Fenitoína não teve efeito. Fenobarbital e Diazepam foram mais eficientes no controle das crises (**Figura 13 e 14**).

6. CONCLUSÕES

Os inibidores da PDE5 alteraram as gravações eletrocorticográficas no córtex motor dos ratos, provocando um aumento na potência nas bandas de frequência Alfa e Beta de forma síncrona. Após a indução de convulsões com PTZ, houve um aumento na energia durante o potencial mais persistente para o grupo Sildenafil. A Fenitoína não conseguiu controlar eficazmente as convulsões do modelo; uma resposta mais eficaz foi observada com o uso de Fenobarbital e Diazepam. Esses achados indicam que o uso de inibidores da PDE5 pode precipitar alterações no sistema neurológico com comprometimento da via nitrérgica.

Diante do exposto, observa-se a necessidade de investigar a reprodutibilidade desses achados no *Homo sapiens*, por meio do desenvolvimento de novos métodos de estudo para averiguar a influência dos inibidores da PDE-5 no sistema nervoso dos seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

- ALDEMIR, R. et al. Evaluation of Two Types of Drug Treatment with QEEG in Children with ADHD. **Translational Neuroscience**, v. 9, p. 106–116, 2018.
- AMIRI, S. et al. Lithium attenuates the proconvulsant effect of adolescent social isolation stress via involvement of the nitrenergic system. **Epilepsy & Behavior: E&B**, v. 61, p. 6–13, ago. 2016.
- ANDERSSON, K.-E. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2554–2565, jul. 2018.
- ATHANASIOU, A. et al. Investigating the Role of Alpha and Beta Rhythms in Functional Motor Networks. **Neuroscience**, v. 378, p. 54–70, 15 maio 2018.
- BARNETT, C. F.; MACHADO, R. F. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 4, p. 411–422, dez. 2006.
- BERRIDGE, C. W. et al. Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 10, p. 1111–1120, 15 nov. 2006.
- BURGDORF, J. S. et al. A translational EEG-based approach to assess modulation of long-lasting NMDAR-dependent synaptic plasticity. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 12, p. 3687–3693, dez. 2019.
- CALABRÒ, R. S.; REITANO, S.; BRAMANTI, P. Tadalafil-induced tonic-clonic seizures in a 23-year-old man. **Epilepsy & Behavior: E&B**, v. 28, n. 3, p. 519–520, set. 2013.
- CALLAWAY, E.; HALLIDAY, R.; NAYLOR, H. Hyperactive children's event-related potentials fail to support underarousal and maturational-lag theories. **Archives of General Psychiatry**, v. 40, n. 11, p. 1243–1248, nov. 1983.
- COSTA COUTO, O. H. Tudo azul com o sexual?: Viagra e sexualidade. **Reverso**, v. 33, n. 61, p. 83–89, 2011.
- CURTIS, M. J. et al. Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 7, p. 987–993, abr. 2018.
- DAVIDSON, R. J. What does the prefrontal cortex “do” in affect: perspectives on frontal EEG asymmetry research. **Biological Psychology**, v. 67, n. 1–2, p. 219–233, out. 2004.
- DE CARVALHO, M. A. J. et al. Proconvulsant effects of sildenafil citrate on pilocarpine-induced seizures: Involvement of cholinergic, nitrenergic and pro-oxidant mechanisms. **Brain Research Bulletin**, v. 149, p. 60–74, jul. 2019.
- DEMCHENKO, I. T. et al. Phosphodiesterase-5 inhibitors oppose hyperoxic vasoconstriction and accelerate seizure development in rats exposed to hyperbaric oxygen. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 106, n. 4, p. 1234–1242, abr. 2009.
- ESTUMANO, D. P. et al. Alteration of Testosterone Levels Changes Brain Wave Activity Patterns and Induces Aggressive Behavior in Rats. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 654, 2019.

FAROOQ, M. U. et al. Role of sildenafil in neurological disorders. **Clinical Neuropharmacology**, v. 31, n. 6, p. 353–362, dez. 2008.

FINK, A. et al. The creative brain: investigation of brain activity during creative problem solving by means of EEG and fMRI. **Human Brain Mapping**, v. 30, n. 3, p. 734–748, mar. 2009.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 651–690, abr. 2011.

FREITAS, A. DE; HOEFLER, R.; PALHANO, T. Uso recreacional dos inibidores da fosfodiesterase-5 (sildenafil, tadalafila e vardenafila): um novo problema para a saúde pública. **NTCebrim/CFF**, 2013.

GHOLIPOUR, T. et al. The interaction of sildenafil with the anticonvulsant effect of diazepam. **European Journal of Pharmacology**, v. 617, n. 1–3, p. 79–83, 1 set. 2009.

GILAD, R. et al. Tonic-clonic seizures in patients taking sildenafil. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 325, n. 7369, p. 869, 19 out. 2002.

GOFF, D. C. et al. A placebo-controlled study of sildenafil effects on cognition in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1–3, p. 411–417, jan. 2009.

GRUBER, W. R. et al. Alpha phase, temporal attention, and the generation of early event related potentials. **NeuroImage**, v. 103, p. 119–129, dez. 2014.

HACKETT, G. PDE5 inhibitors in diabetic peripheral neuropathy. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 9, p. 1123–1126, set. 2006.

HAJ-MIRZAIAN, A. et al. Protective effect of minocycline on LPS-induced mitochondrial dysfunction and decreased seizure threshold through nitric oxide pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 858, p. 172446, 5 set. 2019.

HAMOY, M. et al. Cuananiol-elicited seizures: Behavior characterization and electroencephalographic analyses. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 360, p. 193–200, 1 dez. 2018.

HATZIMOURATIDIS, K. et al. Pharmacotherapy for Erectile Dysfunction: Recommendations From the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015). **The Journal of Sexual Medicine**, v. 13, n. 4, p. 465–488, abr. 2016.

HERRMANN, C. S. et al. EEG oscillations: From correlation to causality. **International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology**, v. 103, p. 12–21, maio 2016.

JACKSON, G. et al. Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics. **The American Journal of Cardiology**, v. 83, n. 5A, p. 13C–20C, 4 mar. 1999.

JULIÁ-ROMERO, C. Status epilepticus secondary to a high dose sildenafil intake. **Medicina Clinica**, v. 157, n. 7, p. 356–357, 8 out. 2021.

KANDEL, E. R. **Principles of Neural Science**. 5ª edição ed. New York: Mc Graw Hill, 2012.

KHOSHNEVISZADEH, M. et al. Oxytocin is involved in the proconvulsant effects of Sildenafil: Possible role of CREB. **Toxicology Letters**, v. 256, p. 44–52, 10 ago. 2016.

- KIEHL, K. A. A cognitive neuroscience perspective on psychopathy: evidence for paralimbic system dysfunction. **Psychiatry Research**, v. 142, n. 2–3, p. 107–128, 15 jun. 2006.
- KORKMAZ, M. F. et al. The Effect of Sildenafil on Recuperation from Sciatic Nerve Injury in Rats. **Balkan Medical Journal**, v. 33, n. 2, p. 204–211, mar. 2016.
- KOUSSA, S. et al. [Epileptic seizures and vardenafil]. **Revue Neurologique**, v. 162, n. 5, p. 651–652, maio 2006.
- LANDE, R. G.; GRAGNANI, C. T. Prospective Study of Brain Wave Changes Associated With Cranial Electrotherapy Stimulation. **The primary care companion for CNS disorders**, v. 20, n. 1, p. 17m02214, 18 jan. 2018.
- LIN, C.-S. et al. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 27, p. 3439–3457, 2006.
- LIN, C.-T. et al. Exploring the Brain Responses to Driving Fatigue Through Simultaneous EEG and fNIRS Measurements. **International Journal of Neural Systems**, v. 30, n. 1, p. 1950018, jan. 2020.
- LOUGHNEY, K. et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Gene**, v. 216, n. 1, p. 139–147, 17 ago. 1998.
- MARMOR, M. F.; KESSLER, R. Sildenafil (Viagra) and ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 44, n. 2, p. 153–162, out. 1999.
- MILMAN, H. A.; ARNOLD, S. B. Neurologic, psychological, and aggressive disturbances with sildenafil. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 36, n. 7–8, p. 1129–1134, ago. 2002.
- MINZENBERG, M. J. et al. Sustained Modafinil Treatment Effects on Control-Related Gamma Oscillatory Power in Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 5, p. 1231–1240, abr. 2016.
- MONTASER-KOUHSARI, L. et al. A role for opioid system in the proconvulsant effects of sildenafil on the pentylenetetrazole-induced clonic seizure in mice. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 409–413, jun. 2011.
- MORIHISA, J. M.; DUFFY, F. H.; WYATT, R. J. Brain electrical activity mapping (BEAM) in schizophrenic patients. **Archives of General Psychiatry**, v. 40, n. 7, p. 719–728, jul. 1983.
- MORILLON, B. et al. Prominence of delta oscillatory rhythms in the motor cortex and their relevance for auditory and speech perception. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 107, p. 136–142, dez. 2019.
- MUTO, N. A. et al. Extract of *Euterpe oleracea* Martius Stone Presents Anticonvulsive Activity via the GABAA Receptor. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, p. 872743, 2022.
- NEWSON, J. J.; THIAGARAJAN, T. C. EEG Frequency Bands in Psychiatric Disorders: A Review of Resting State Studies. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 12, p. 521, 2018.
- NIEOCZYM, D. et al. Effects of sildenafil on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice and amygdala-kindled seizures in rats. **Pharmacological reports: PR**, v. 62, n. 2, p. 383–391, abr. 2010.

NIEOCZYM, D. et al. Influence of sildenafil on the anticonvulsant action of selected antiepileptic drugs against pentylentetrazole-induced clonic seizures in mice. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 119, n. 8, p. 923–931, ago. 2012.

NIEOCZYM, D. et al. Effect of sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, on the anticonvulsant action of some antiepileptic drugs in the mouse 6-Hz psychomotor seizure model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 47, p. 104–110, 2 dez. 2013.

NIEOCZYM, D.; SOCAŁA, K.; WLAŹ, P. Lack of effect of sildenafil on cocaine-induced convulsions in mice. **Pharmacological reports: PR**, v. 61, n. 5, p. 930–934, out. 2009.

NIEOCZYM, D.; SOCAŁA, K.; WLAŹ, P. Evaluation of the role of different neurotransmission systems in the anticonvulsant action of sildenafil in the 6 Hz-induced psychomotor seizure threshold test in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 107, p. 1674–1681, nov. 2018.

OKUYUCU, E. E. et al. EEG abnormalities during treatment with tadalafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor. **Neurological Research**, v. 31, n. 3, p. 313–315, abr. 2009.

O'NEIL, B. et al. Quantitative brain electrical activity in the initial screening of mild traumatic brain injuries. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 13, n. 5, p. 394–400, nov. 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set**. [s.l.] Elsevier Science, 2005.

PRICHEP, L. S. Quantitative EEG and electromagnetic brain imaging in aging and in the evolution of dementia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1097, p. 156–167, fev. 2007.

PUZZO, D. et al. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 2, p. 371–387, abr. 2008.

RAHIMIAN, R. et al. Oxytocinergic system mediates the proconvulsant effects of sildenafil: The role of calcineurin. **Hormones and Behavior**, v. 122, p. 104753, jun. 2020.

RHODES, E. et al. Transient Alpha and Beta Synchrony Underlies Preparatory Recruitment of Directional Motor Networks. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 867–875, jun. 2018.

RIAZI, K. et al. The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 8, p. 935–943, abr. 2006.

RODRIGUES DE OLIVEIRA, F. et al. Fatty Acid Amides Synthesized from Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet.) Exhibit Anticonvulsant Action with Modulation on GABA-A Receptor in Mice: A Putative Therapeutic Option. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 3, p. E43, 10 mar. 2020.

SARHAN, N. R.; OMAR, N. M. An immunohistochemical and ultrastructural analysis of the retina in tadalafil (Cialis) treated rats. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 312–322, maio 2018.

SICLARI, F.; TONONI, G. Local aspects of sleep and wakefulness. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 44, p. 222–227, jun. 2017.

SILVA DE MELO, B. et al. Behavioural, electrocorticographic, and electromyographic alterations induced by Nerium oleander ethanolic extract: Anticonvulsant therapeutics assessment. **Neurotoxicology**, v. 78, p. 21–28, maio 2020.

SOCAŁA, K. et al. Effect of Tadalafil on Seizure Threshold and Activity of Antiepileptic Drugs in Three Acute Seizure Tests in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 34, n. 3, p. 333–346, out. 2018.

SOUZA-MONTEIRO, J. R. et al. Anticonvulsant properties of Euterpe oleracea in mice. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 20–27, nov. 2015.

SROYKHAM, W.; WONGSAWAT, Y. Estimation of testosterone/cortisol ratio by resting state eeg delta/beta ratio in elderly people. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 39, n. 1, p. 75–82, mar. 2018.

STRIANO, P. et al. Epileptic seizures can follow high doses of oral vardenafil. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 333, n. 7572, p. 785, 14 out. 2006.

TAVAKOLI, Z. et al. Anticonvulsant effect of quercetin in pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures in male mice: The role of anti-neuroinflammatory and anti-oxidative stress. **International Immunopharmacology**, v. 116, p. 109772, mar. 2023.

UCKERT, S.; KUCZYK, M. A. Cyclic nucleotide metabolism including nitric oxide and phosphodiesterase-related targets in the lower urinary tract. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 202, p. 527–542, 2011.

YAMORI, Y. et al. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. **Stroke**, v. 7, n. 1, p. 46–53, fev. 1976.

YE, Q. et al. Hyperexcitability of Cortical Oscillations in Patients with Somatoform Pain Disorder: A Resting-State EEG Study. **Neural plasticity**, v. 2019, 7 set. 2019.

YOUNIS, S. et al. Effects of sildenafil and calcitonin gene-related peptide on brainstem glutamate levels: a pharmacological proton magnetic resonance spectroscopy study at 3.0 T. **The Journal of Headache and Pain**, v. 19, n. 1, p. 44, 18 jun. 2018.

ZAEPFFEL, M. et al. Modulations of EEG beta power during planning and execution of grasping movements. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e60060, 2013.

ZANETTINI, C. et al. Pharmacological classification of centrally acting drugs using EEG in freely moving rats: an old tool to identify new atypical dopamine uptake inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 161, p. 107446, 15 dez. 2019.

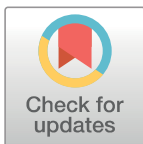
RESEARCH ARTICLE

Unmasking hidden risks: The surprising link between PDE5 inhibitors and seizure susceptibility

Alex Luiz Menezes da Silva^{1*}, Chirlene Pinheiro Nascimento¹, Julianne Elba Cunha Azevedo¹, Luana Rodrigues Vieira¹, Akira Otake Hamoy¹, Allan Carlos da Silva Tiago¹, João Cleiton Martins Rodrigues², Daniella Bastos de Araujo¹, Dielly Catrina Favacho Lopes², Vanessa Jóia de Mello¹, Moisés Hamoy¹

1 Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, UFPA, Belém, Pará, Brazil, **2** Laboratory of Experimental Neuropathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, UFPA, Belém, Pará, Brazil

* aalexmenezess@gmail.com



Abstract

Background

Phosphodiesterase 5 inhibitors (PDE5i) are the first line treatment for erectile dysfunction; however, several articles and case reports have shown central nervous system effects, that can cause seizures in susceptible patients. This study aims to describe the changes caused by the use of Sildenafil and Tadalafil through the analysis of abnormalities expressed in the electrocorticogram (ECoG) of rats and evaluate the seizure threshold response and treatment of seizures with anticonvulsants.

Materials and methods

The study used 108 rats (Wistar). Before surgery for electrode placement in dura mater, the animals were randomly separated into 3 experiments for electrocorticogram analysis. Experiment 1: ECoG response to using PD5i (Sildenafil 20mg/kg and Tadalafil 2.6mg/kg p. o.). Experiment 2: ECoG response to the use of PD5i in association with Pentylenetetrazole (PTZ—30 mg/kg i.p.), a convulsive model. Experiment 3: ECoG response to anticonvulsant treatment (Phenytoin, Phenobarbital and Diazepam) of seizures induced by association IPDE5 + PTZ. All recordings were made thirty minutes after administration of the medication and analyzed for ten minutes, only once. We considered statistical significance level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Results

After administration of Sildenafil and Tadalafil, there were increases in the power of recordings in the frequency bands in oscillations in alpha ($p = 0.0920$) and beta ($p = 0.602$) when compared to the control group ($p < 0.001$). After the use of Sildenafil and Tadalafil associated with PTZ, greater potency was observed in the recordings during seizures ($p < 0.001$), however, the Sildenafil group showed greater potency when compared to Tadalafil ($p < 0.05$).

OPEN ACCESS

Citation: Silva ALMd, Nascimento CP, Azevedo JEC, Vieira LR, Hamoy AO, Tiago ACdS, et al. (2023) Unmasking hidden risks: The surprising link between PDE5 inhibitors and seizure susceptibility. PLoS ONE 18(11): e0294754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754>

Editor: Arvin Haj-Mirzaian, Massachusetts General Hospital, UNITED STATES

Received: February 6, 2023

Accepted: November 8, 2023

Published: November 30, 2023

Copyright: © 2023 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data is now available on Zenodo data repository under the DOI [10.5281/zenodo.7949279](https://doi.org/10.5281/zenodo.7949279).

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Phenobarbital and Diazepam showed a better response in controlling discharges triggered by the association between proconvulsant drugs.

Conclusions

PDE5i altered the ECoG recordings in the rats' motor cortexes, demonstrating cerebral asynchrony and potentiating the action of PTZ. These findings demonstrate that PDE5i can lower the seizure threshold.

Introduction

Phosphodiesterase 5 (PDE5) isoenzymes have been identified in a wide variety of tissues, e.g., the smooth muscle cells of the corpus cavernosum, vascular and visceral smooth muscle, skeletal muscle, platelets, kidney, lung, spinal cord, cerebellum, pancreas, prostate, urethra, and bladder [1–3].

Current guidelines for the treatment of erectile dysfunction recommend PDE5 inhibitors as the first-line therapy for most men with erectile dysfunction who do not have a specific contraindication to their use [4]. They state that PDE5 inhibitors are effective, safe, and well-tolerated therapies and that there are no significant differences in efficacy, safety, and tolerability between the approved drugs [4].

Sildenafil was the first (in 1998) compound introduced clinically, followed by Vardenafil and Tadalafil (in 2003) and Avanafil (in 2013) [5]. Studies in vitro have shown that Sildenafil's inhibition of PDE5 is 10-fold greater than that of PDE6, 100-fold greater than that of PDE1 and 1000-fold greater than that of PDE2, PDE3, and PDE4 [6].

PDE5 inhibitors can cause side effects in the central nervous system by crossing the blood-brain barrier [7]. Sildenafil induces transiently increased glutamate levels in the brainstem, which suggests transiently increased excitability of the brainstem neurons [8]. Several articles and case reports have shown some relationship between increased neuronal excitability and even proconvulsant properties associated with using PDE5 inhibitors [9–19].

De Carvalho et al. [20] noted that the seizure threshold was lowered by Sildenafil for the Pilocarpine seizure model, involving cholinergic pathways in the central nervous system.

In addition, articles point to the possibility that pro-inflammatory factors are involved in the pathophysiology of seizures [21]. Thus, Nitric oxide (NO) stands out, which can intensify oxidative stress through the overproduction of reactive oxygen species [22, 23], resulting in cell damage. Considering that PDE5 inhibitors are able to cross the blood-brain barrier [7], their NO potentiating action, increasing the GMPc, could result in convulsive effects.

According to Okuyucu et al. [24], PDE5 inhibitors can produce electroencephalogram (EEG) abnormalities. This study aims to describe the changes caused by the use of Sildenafil and Tadalafil through the analysis of abnormalities expressed in the Electrocorticogram (ECoG) and to evaluate the possible change in the epileptic threshold after the test with Pentylentetrazole.

Materials and methods

Animals

This study used 108 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged between 100 and 120 days and weighing between 200 to 220g. The rats were kept in cages, 3 per cage, measuring 60cm x

40cm x 20cm. The environment was enriched with wood shavings as bedding material, the temperature was maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a light-dark period of 12 hours, water and feed offered at will; Purina® brand commercial feed with 20% protein.

The experience with recording ECoG rodents from the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products facilitated the choice of Wistar rats for the experiments [25]. Furthermore, the physiology and cerebral vasculature of rodents are similar to that of humans, so they were selected as a study model for ischemic stroke [25]. Finally, this choice and sample number were necessary to prove the effects and allow other scientists to reproduce this experiment.

All procedures followed the current Brazilian legislation related to ethics in animal experimentation. This project was previously approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA / UFPA). The project's approval number is 5735240419.

Surgery for electrode placement

For electrode implantation, the animals were anesthetized with an association of Xylazine Hydrochloride (5mg/kg) and Ketamine Hydrochloride (50mg/kg) through intraperitoneal injection, with an initial infiltration of lidocaine (2%) at the surgical incision site. The electrodes were implanted at the Bregma -0.96mm stereotaxic coordinate [26] and ± 1 mm lateral to the dura mater region just above the motor cortex [27–30]. The electrode was in contact with the surface of the dura mater. During the first two days after the implant surgery, the animals received Ketoprofen 1mg/kg i.p., and on the fifth post-surgical day, the experiment was carried out.

During anesthesia and post-surgery, the animals heart rate and temperature were monitored, with analyses done every 6 hours, for 3 minutes. The conditions of asepsis in the handling of the animals were guaranteed throughout the entire experiment.

Experimental design

The animals were randomly separated into groups for each experiment. Rodents remained in individualized cages from electrode implantation to ECoG recordings, with the registrations being made between 8:00 and 10:00 a.m. All recordings were made thirty minutes after the administration of the medications and analyzed for a period of ten minutes, only once.

Three experiments were carried out. For each one, the following dosages were adopted: control groups received orally 0.9% saline solution; Sildenafil-treated groups received 20 mg/kg p.o. [31]; tadalafil-treated groups received 2.6 mg/kg p.o. [32]; Pentylentetrazole (PTZ)-treated groups received 30 mg/kg i.p. [33].

Experiment -1. Composed of 3 analyzed groups: a) the Control group (n = 9); b) the Sildenafil group (n = 9) and c) the Tadalafil group (n = 9).

Experiment -2. Composed of 4 analyzed groups: a) Control group (n = 9); b) PTZ group (n = 9); c) Tadalafil and PTZ group (n = 9); and d) Sildenafil and PTZ group (n = 9). The groups were treated with Tadalafil and Sildenafil thirty minutes before the application of PTZ to assess seizure activity through ECoG in the rats.

Experiment -3. The groups that received Tadalafil and Sildenafil associated with PTZ were treated with anticonvulsant drugs: Phenytoin (10mg/kg i.p.), Phenobarbital (10mg/kg i.p.) or Diazepam (10mg/kg i.p.). Therefore, the groups formed were compared with each other and the control groups who received orally 0.9% saline solution.

In experiment 3, nine groups were analyzed: a) Control group (n = 9); b) Tadalafil and PTZ group (n = 9); c) Tadalafil, PTZ and Phenytoin group (n = 9); d) Tadalafil, PTZ and Phenobarbital group (n = 9); e) Tadalafil, PTZ and Diazepam group (n = 9); f) Sildenafil and PTZ group

(n = 9); g) Sildenafil, PTZ and Phenytoin group (n = 9); h) Sildenafil, PTZ and Phenobarbital group (n = 9); i) Sildenafil, PTZ and Diazepam group (n = 9).

Aiming to reduce the number of animals used in the experiment, in line with the CEUA / UFPA guidelines, data obtained from equivalent groups were reused between experiments: Control group (Experiments 1, 2 and 3); Tadalafil and PTZ group (Experiments 2 and 3); and Sildenafil and PTZ group (Experiments 2 and 3).

After the registration period, the animals were euthanised by a professional veterinarian and given high doses of ketamine (300 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), and Diazepam (10 mg/kg) (i.p.) to avoid suffering. This follows institutional requirements for the euthanasia of these animals.

Chemicals and reagents

The anaesthetic Ketamine was purchased from König (Santana de Parnaíba SP Brazil) and Xylazine from Vallée (Montes Claros MG Brazil), while the local anesthetic Lidocaine was obtained from Hipolabor (Sabará MG Brazil). The anticonvulsant compound Phenobarbital was purchased from Aventis-Pharma (Ribeirão Preto, SP, Brazil), and Diazepam and Phenytoin from União Química (Embu-Guaçu, SP, Brazil). The PTZ was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, United States), and Sildenafil citrate 50 mg Viagra® from Pfizer (Guarulhos São Paulo–Brazil) and Tadalafil 20 mg Cialis® from Lilly (São Paulo SP- Brazil).

Electroencephalographic records

Electrodes were connected to a digital data-acquisition system composed of a high impedance-amplifier (Grass Technologies, P511), an oscilloscope (Protek, 6510), and a board for data acquisition and digitalization (National Instruments, Austin, TX). Data was continuously sampled at 1 kHz at a low pass of 3 kHz and a high pass of 0.3 Hz. The recordings followed a standard protocol: the animals were meticulously immobilized and given a 10-minute acclimation period before the start of the recordings, all to prevent any potential interference with the recording process [27].

Data analyses

Analysis performed offline: a double-blind controlled design through a tool built using Python programming language (version 2.7). “Numpy” and “Scipy” libraries were used for mathematical processing and the “matplotlib” library was used to obtain graphs and plots. A graphic interface was developed using the PyQt4 library. Spectrograms were calculated using a Hamming window with 256 points (256/1000 s). For power spectral density (PSD), each frame was generated with an overlap of 128 points per window. For each frame, the PSD was calculated by Welch’s average periodogram method. Frequency histograms were obtained by calculating the PSD of the signal using the Hamming window with 256 points without overlap, yielding a resolution of 1Hz per bin. Each wave displayed in PSD is an average from a set of experiments. PSDs were calculated in each group, and the means are shown by individual bins [27].

Statistical analysis

Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were used to verify data normality and variance homogeneity, respectively. For graphics presentation and statistics calculation, prism® software was used. Comparisons of mean power values were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s post hoc test, applied to aim for a statistical significance

level of $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$. The data and statistical analysis complied with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology [34].

For the analysis of brain wave oscillations, the following frequency values were considered: delta (1.0–4.0 Hz), theta (4.0–8.0 Hz), alpha (8.0–12.0 Hz), beta (12.0–28.0 Hz) and gamma (28.0–40.0 Hz).

Results

The record of the control group showed an amplitude ranging from 0.05 to 0.1 mV (Fig 1A and 1B), and the spectrogram demonstrated higher energy intensity on frequencies between 1.0 to 10.0 Hz (Fig 1C). The histogram shows greater amplitude at 5.0 Hz, corroborating the energy distribution observed in the spectrogram (Fig 1D).

After administration of Sildenafil, the electrocorticographic record showed an amplitude variation of 0.05 to 0.1 mV, similar to that observed in the control group record (Fig 2A and 2B). The difference between the Sildenafil group and the control group is related to the energy distribution, which is maintained between 1.0 to 20.0 Hz, which can be observed in the spectral energy distribution (Fig 2C). The histogram of amplitude distribution in the frequencies individually until 40 Hz, the greatest amplitude is in the frequency of 3.0 Hz. The increase in amplitude in the frequencies between 10.0 to 20.0 Hz can also be observed after the use of Sildenafil (Fig 2D).

After Tadalafil application, a change in power distribution was observed at frequencies up to 30 Hz (indicated by the dashed line) (Fig 3C). The group treated with Tadalafil observed a greater cerebral asynchrony captured by the electrode; however, it showed amplitudes with a range similar to the control group from 0.05 to 0.1 mV (Fig 3A and 3B). The spectrogram showed changes in spectral powers at frequencies between 1.0 to 30.0 Hz, which caused changes in brain oscillations (Fig 3C). The histogram showed that the dominant amplitudes

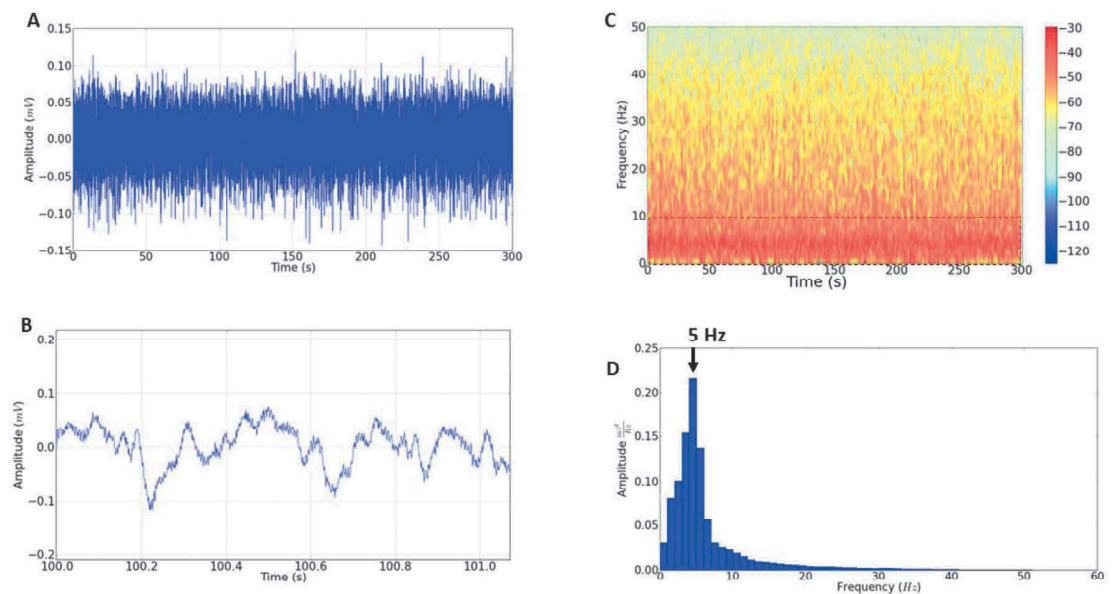


Fig 1. Brain activity of the control group. (A) Electrocorticographic record of the animal in basal state lasting 300 seconds (s); (B) Amplification of the electrocorticographic record in a time of 1 second (to demonstrate the control tracing pattern); (C) Spectrogram demonstrates the concentration of the spectral energy distribution in the control (indicated by dashed line); (D) Histogram shows greater energy intensity at the frequency of 5 Hz (Indicated by the arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g001>

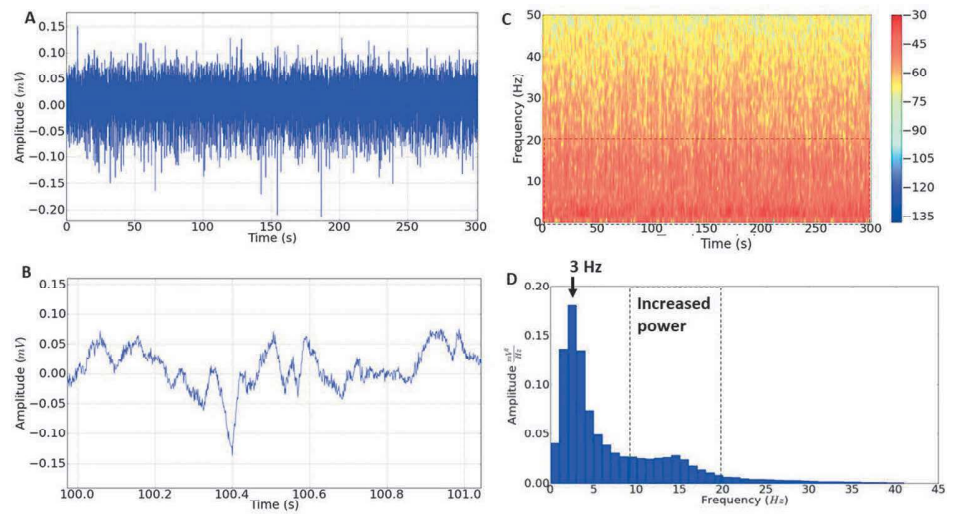


Fig 2. Characteristic of the electrocorticographic record after the administration of Sildenafil. (A) Electrocorticographic recording lasting 300s (demonstrating amplitude in mV); (B) Amplification of the electrocorticographic record (1.0 s) demonstrating the characteristic of frequencies and amplitude; (C) Spectrogram demonstrating energy distribution with increased cerebral asynchrony at frequencies up to 20 Hz (dashed line). (D) Amplitude distribution histogram. The predominant frequency is 3 Hz (indicated by the arrow) which shows an increase in power in the frequencies up to 20 Hz (indicated by the dashed line).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g002>

are between 2.0 to 8.0 Hz (Fig 3D), and there was an increase in cerebral asynchrony in the frequency bands in alpha (8–12 Hz) and beta (12–28 Hz).

Thus, the PDE inhibitors showed an increase in power in the alpha (8–12 Hz) and beta (12–28 Hz) frequency bands. However, the spectrogram demonstrates greater spectral intensity for Tadalafil (Figs 2 and 3).

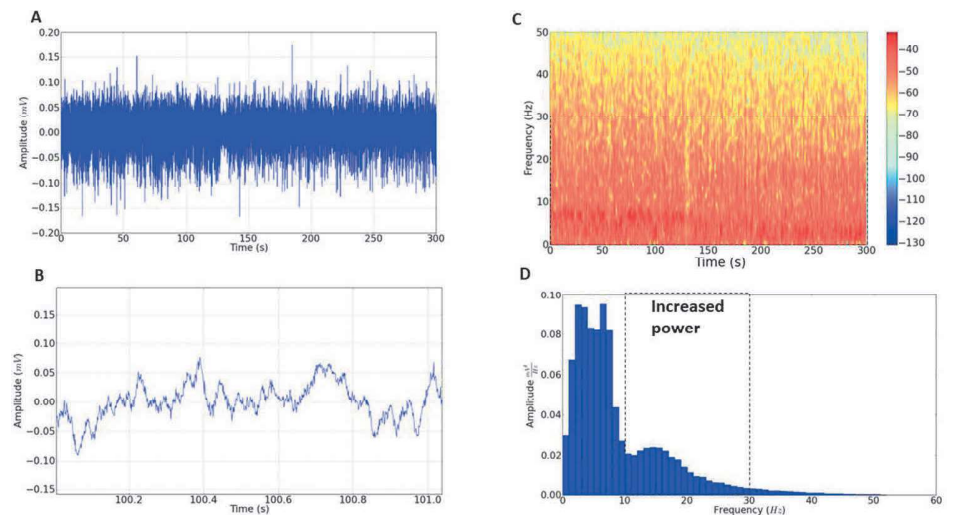


Fig 3. Characteristic of the electrocorticographic record after administration of Tadalafil. (A) Electrocorticographic recording lasting 300s, tracing with amplitude in mV; (B) Amplification of the electrocorticographic record (1.0 s) demonstrating the characteristic of tracing; (C) Spectrogram demonstrating energy distribution with increased cerebral asynchrony at frequencies up to 30 Hz (dashed line). (D) The amplitude distribution histogram showed a loss of predominant frequency, with increased power given in frequencies up to 30 Hz (indicated by the dashed line).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g003>

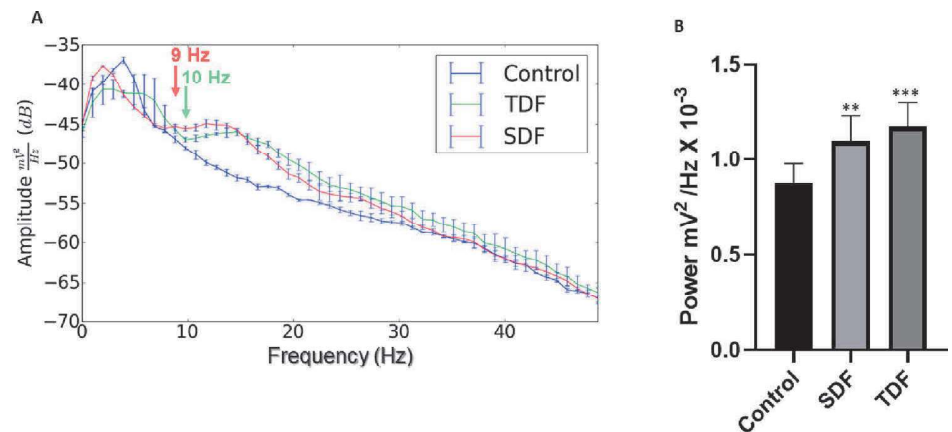


Fig 4. Power spectral distribution relating to the control of, Sildenafil (SDF), and Tadalafil (TDF) records. (A) Spectral distribution of power means (SD) at frequencies up to 50 Hz of the control (blue line), SDF (red line), and (TDF) (green line). The red arrow indicates the start of increased cerebral asynchrony for SDF, and the green arrow indicates the beginning of the increase in TDF cerebral asynchrony. (B) Linear power distribution at frequencies up to 50 Hz. * indicates statistical difference for the control group. (ANOVA and Tukey's post-test) (*) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$. (n = 9).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g004>

The Fourier analysis showed a greater increase in power in a synchronized way for Sildenafil (9 Hz) and Tadalafil (10 Hz), demonstrating cerebral asynchrony caused by PDE inhibitors (Fig 4A).

In the distribution of linear power at frequencies up to 50 Hz, it was observed that the average power for the control group was $0.8766 \pm 0.1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, which presented a statistical difference to the Sildenafil group with an average of $1.096 \pm 0.1345 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p = 0.0021$). Statistical differences were also observed in the group treated with Tadalafil which averaged $1.172 \pm 0.1256 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ (ANOVA Tukey post-test $F = 14.48$) ($p < 0.001$). There was no statistical difference between the treated groups (Fig 4B).

The analysis of delta power averages showed greater energy intensity measured in the Sildenafil-treated group (Fig 5A). The analysis of delta oscillations showed that the mean of the control group was $0.3565 \pm 0.04375 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, which presented a statistical difference when compared to the group treated with Sildenafil with a mean of $0.4213 \pm 0.02084 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, revealing an increase in this parameter ($p < 0.001$). A statistical difference was also observed for the treatment with Tadalafil, whose mean was $0.2869 \pm 0.03019 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ with a decrease in the power of delta oscillations for Tadalafil ($p < 0.001$). When compared to the treated groups, there was a statistical difference indicating the dominance of delta oscillations for Sildenafil (Fig 5A).

The analysis of the power averages in theta showed the highest energy intensity for the control group (Fig 5B). The analysis of theta oscillations showed that the mean of the control group was $0.4123 \pm 0.02223 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, which presented a statistical difference for the Sildenafil group ($0.1846 \pm 0.01326 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$); the Tadalafil group whose mean was $0.3107 \pm 0.02359 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ maintained a statistical difference from the control group. When comparing the Sildenafil group with the Tadalafil group, a statistically significant difference was observed ($p < 0.001$) (Fig 5B).

From the increase in the frequency bands in alpha, synchronization between the PDE inhibitor agents occurred, with an increase in power starting at 9 Hz for Sildenafil and 10 Hz for Tadalafil (Fig 4A). When analyzing the alpha oscillations linearly, the control group's mean registry was $0.07278 \pm 0.008246 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, which presented statistical differences

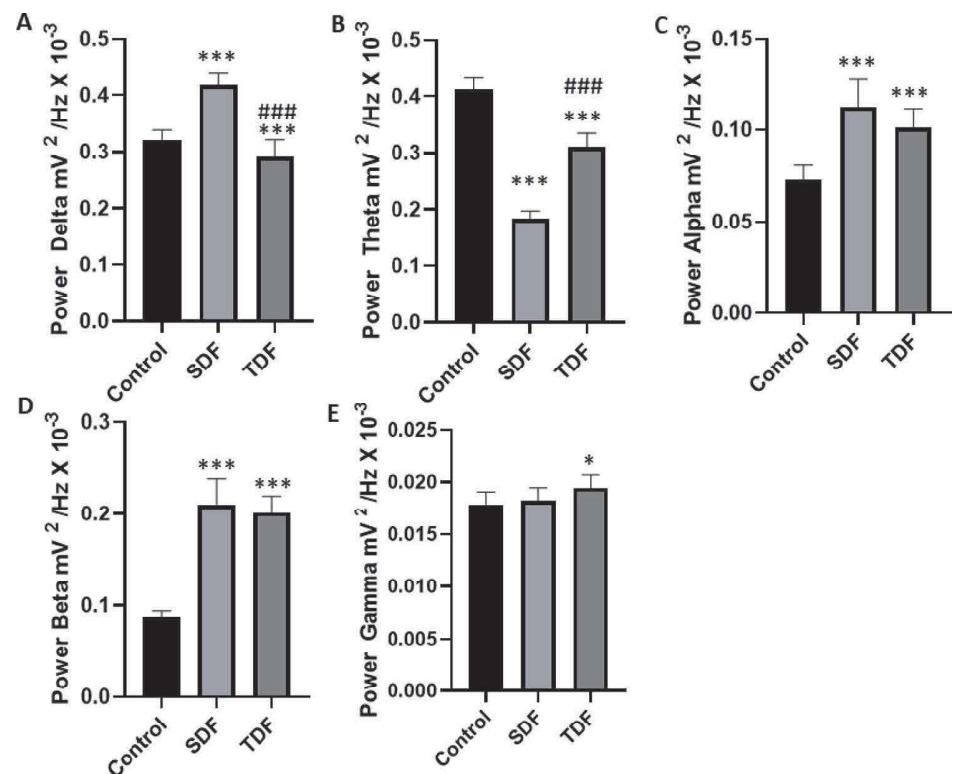


Fig 5. Graphs demonstration of the variation of linear power averages for brain oscillation bands. (A) Brain oscillations in the Delta band (1.0–4.0 Hz), (B) Brain oscillations in the theta band (4.0–8.0 Hz), (C) Variation in alpha oscillations (8–12 Hz), (D) Frequency oscillation in the beta band (12–28 Hz), (E) Variation in gamma Oscillations (28–40 Hz). (SDF) Sildenafil group, (TDF) Tadalafil group, (Control) Control group; (*) indicates a statistical difference between the control group, (#) indicates a statistical difference for the SDF group. (ANOVA and Tukey's post-test) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ ($n = 9$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g005>

to the Sildenafil group with a mean of $0.1128 \pm 0.01563 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ and Tadalafil with a mean of $0.1012 \pm 0.01066 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p < 0.001$). When compared, the Sildenafil and Tadalafil-treated groups did not show significant statistical differences between them ($p = 0.0920$), as shown in Fig 5C.

The analysis of power means in beta showed the largest difference in energy intensity for the Sildenafil and Tadalafil groups about the control. The Sildenafil and Tadalafil-treated groups did not differ in intensity ($p = 0.6022$), but both had intensities far above the registries from the control group, as shown in Fig 5D. When analyzing beta oscillations linearly, the control group's mean was $0.08700 \pm 0.007088 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, which presented a statistical difference compared to the Sildenafil-treated group with a mean of $0.2095 \pm 0.02854 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ and treated with Tadalafil of $0.2009 \pm 0.01841 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ ($p < 0.001$).

When analyzing gamma oscillations linearly the control group means was $0.01786 \pm 0.001188 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$, it showed no statistical difference in comparison to the Sildenafil group ($0.01822 \pm 0.001221 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p = 0.7801$). The Tadalafil group ($0.01945 \pm 0.001243 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) showed a statistically significant difference compared to the control group ($p < 0.0182$) as shown in Fig 5E. The treated groups showed no statistical difference ($p = 0.801$).

ECoG tracings obtained after the application of PTZ showed irregularity and changes in amplitude with the presence of clusters of potentials; the amplification demonstrates spike

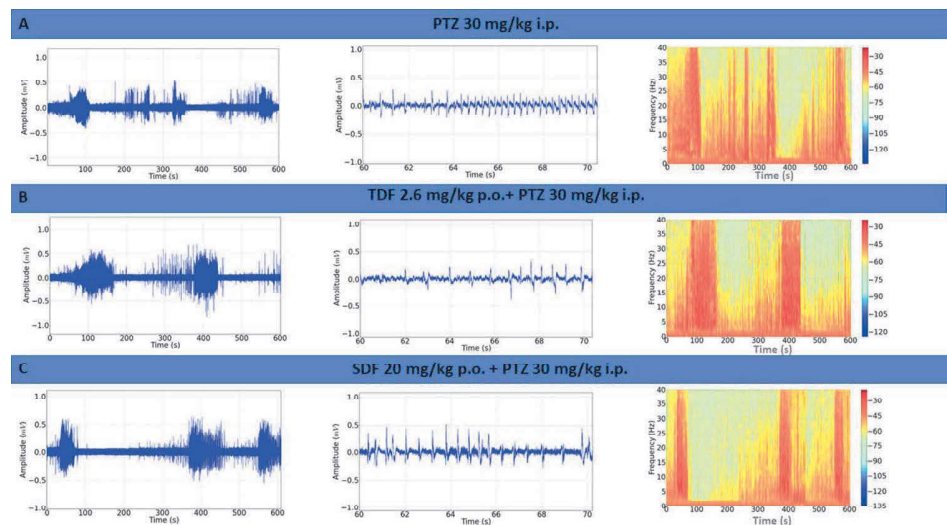


Fig 6. Electroencephalographic (ECoG) tracing of a Wistar rat after drug application. (A) ECoG recording after administration of Pentylentetrazole (PTZ) (left), 10-second amplification of the tracing (60–70 s) (centre), recording spectrogram (right); (B) ECoG demonstrative recording after administration of Tadalafil (TDF) followed by application of Pentylentetrazole (PTZ) (left), recording amplification (centre), recording spectrogram (right); (C) ECoG demonstrative recording after administration of Sildenafil (SDF) followed by application of PTZ (left), recording amplification (centre) and corresponding spectrogram (right).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g006>

waves in the recordings, and the spectrogram demonstrates the concentration of energy in the clusters of the potentials [Fig 6A](#). After the use of Tadalafil, the seizure induction with PTZ maintained the characteristics of a longer duration of potential burst, the irregularities observed during amplification, and observed in the spectrogram ([Fig 6B](#)). After the use of Sildenafil, PTZ induction of seizures showed characteristics such as increased amplitude, with longer duration of potential bursts than the PTZ group, which can be observed with spikes in the amplification and energy concentration in the spectrogram ([Fig 6C](#)).

In the graph of linear power distribution in the record for the control group with a mean ($0.8766 \pm 0.1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), there was a statistical difference for the PTZ group ($1.974 \pm 0.2527 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.001$). The Tadalafil plus PTZ group presented a mean ($2.957 \pm 0.3201 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) that presented a statistical difference for the control and PTZ groups ($p < 0.001$). The Sildenafil and PTZ group with a mean ($3.172 \pm 0.2428 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) showed a statistical difference for the control and PTZ groups ($p < 0.001$) ([Fig 7A](#)).

Considering the volleys of potentials caused by PTZ, it can be observed that the Tadalafil PTZ group ($11.10 \pm 1.647 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) had a significantly lower mean potency than the Sildenafil PTZ group ($12.88 \pm 1.600 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.05$). The Tadalafil PTZ and Sildenafil PTZ groups showed a statistically significant difference when compared to the mean potency of the PTZ group ($6.646 \pm 1.587 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) and the control group ($0.8766 \pm 0.1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.001$) ([Fig 7B](#)).

The control of the induced seizure after the application of Tadalafil PTZ was observed in different electroencephalographic recordings after the application of Phenytoin, Phenobarbital, and Diazepam. The tracing observed after the application of Phenytoin shows a surge of potentials at an amplitude above 0.5 mV, followed by a progressive decrease in amplitude ([Fig 8A](#)). The Phenytoin group ($2.202 \pm 0.2354 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) had a lower mean potency than the Tadalafil PTZ group ($2.957 \pm 0.3201 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.001$), also showing a difference for the group control ($0.8766 \pm 0.1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.001$) ([Fig 8D](#)). The group that

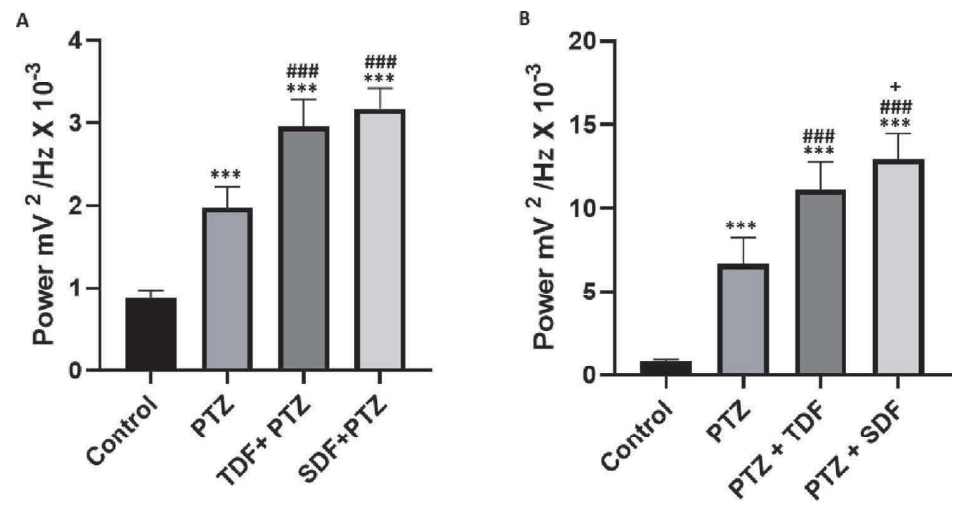


Fig 7. Mean linear power of recordings for groups. (A) During the Pentylentetrazole-induced seizure; (B) During potential salvo in PTZ-induced seizure recordings. Statistical differences were obtained after ANOVA and Tukey's test ($n = 9$). (*) indicates statistical difference for the control group, (#) indicates statistical difference for PTZ, and (+) indicates statistical difference for the Tadalafil +PTZ group. (Control) Control group, (PTZ) Pentylentetrazole, (TDF) Tadalafil, (SDF) Sildenafil. The p values between the mean amplitudes are represented by asterisks * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g007>

received Phenobarbital to help control seizures presented a tracing with decreased spike amplitude (Fig 8B). The linear power graph showed that the Phenobarbital group presented a mean potency ($1.489 \pm 0.1184 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$), which was lower than the Tadalafil PTZ and Phenytoin group ($p < 0.001$), and showed greater potency than the control group ($p < 0.001$). The group that received Diazepam presented a more regular and low amplitude tracing (Fig 8C) presented a mean power ($1.253 \pm 0.2308 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) presented a decrease about the Tadalafil PTZ and Phenytoin group ($p < 0.001$), for the Phenobarbital group ($p < 0.05$) and the control group ($p < 0.01$) (Fig 8D).

The control of the induced seizure after the application of Sildenafil and PTZ was observed in ECoG recordings after the application of anticonvulsants. The tracing observed after the application of Phenytoin initially presented with irregularities and high amplitude above 0.5 mV, followed by a progressive decrease in amplitude (Fig 9A). The Phenytoin group ($3.001 \pm 0.3412 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) showed a mean potency with no statistical difference for the Sildenafil and PTZ group ($3.172 \pm 0.2428 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p = 0.2938$), showing a difference for the group control ($0.8766 \pm 0.1009 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) ($p < 0.001$) (Fig 9D). The group that received Phenobarbital to control seizures presented a tracing with a decrease in the amplitude of the spikes (Fig 9B), was lower than the Tadalafil, PTZ and Phenytoin group ($p < 0.001$), and showed higher potency than the control group ($p < 0.001$). The group that received Diazepam (Fig 9C) showed a mean potency ($1.061 \pm 0.1458 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) presented a decrease in potency in relation to the Tadalafil, PTZ and Phenytoin group ($p < 0.001$), for the Phenobarbital group ($p < 0.01$) and the control group there was a statistical difference ($p < 0.05$) (Fig 9D).

Discussion

The present work demonstrates that PDE5 inhibitors are able to decrease the seizure threshold. This finding could be related to the modulation of this drug in the nitric pathway.

Currently, the main clinical use of PDE5 inhibitors involves the treatment of erectile dysfunction, whose mechanism occurs through decreasing the catalytic activity of the PDE5

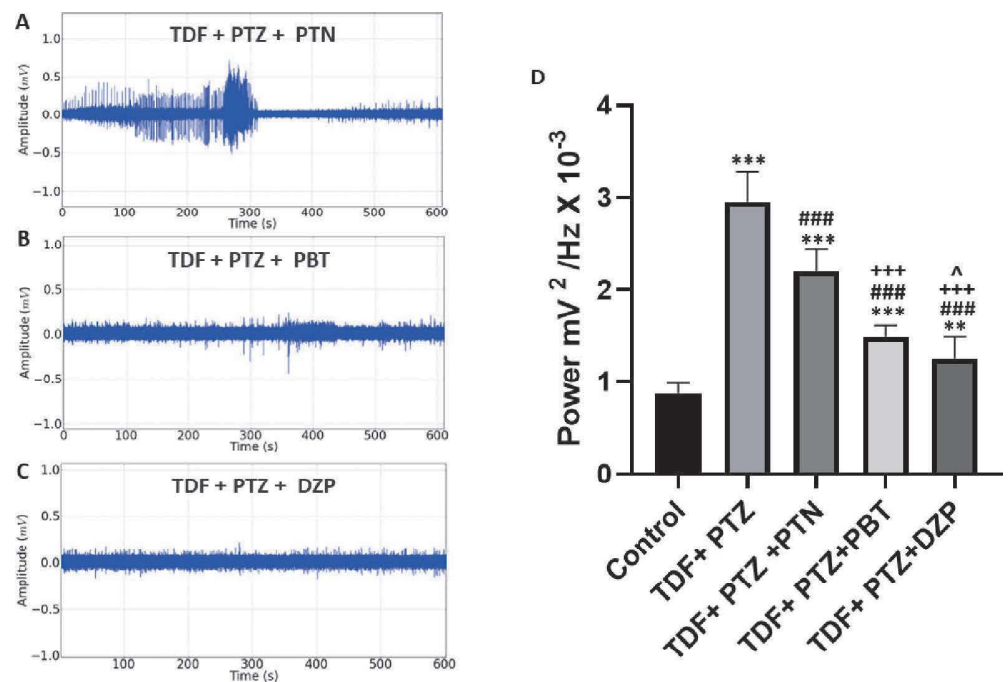


Fig 8. Representative electrocorticographic (ECoG) recordings were obtained after treatment with Tadalafil (TDF) followed by Pentylentetrazole (PTZ). (A) Tracing obtained after the application of Phenytoin (PTN); (B) tracing obtained after the application of Phenobarbital (PBT); (C) Tracing obtained after application of Diazepam (DZP). (D) Graph demonstrating linear power averages of recordings after application of anticonvulsant drugs. Statistical differences were obtained after ANOVA and Tukey's test ($n = 9$). (*) indicates a statistical difference for the control group, (#) indicates a statistical difference for the group that received TDF+PTZ, (+) indicates a statistical difference for the TDF+PTZ+ PTN group, and (^) indicates a statistical difference for the TDF +PTZ+ PBT group. The p values between the mean amplitudes are represented by asterisks * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g008>

enzyme in the vascular smooth muscle of the penis. This potentiates the endogenous effects of NO, synthesized by nitric oxide synthetase (NOS), which activates guanylate cyclase (GC) and induces cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production. This mechanism causes relaxation of the smooth muscles of the penis and arterial dilation, promoting erection by distending the corpora cavernosa [20, 35, 36].

As PDE5 inhibitors can cross the blood-brain barrier [7], effects on the nitrenergic pathway can be expected in brain cells. In this sense, studies demonstrate the association between the nitrenergic pathway and a decrease in the seizure threshold [21, 23, 37]. NO has an excitatory role in the pathogenesis of seizures [21, 37], in which the administration of NO SYNTASE antagonists (L-NAME) may increase the seizure threshold [21], and excessive NO production under pathological conditions lowers the PTZ-induced seizure threshold [37].

The variations in power intensities in brain oscillations can be caused by the use of drugs [38, 39], like hormonal disorders and testosterone replacement therapy [40]. Studies on alpha rhythm show that increased amplitude in the alpha is related to somatization severity observed in patients after accounting for the influence of anxiety and depression [41, 42]. Other studies also add consequences like worsening performance in automotive simulators among patients with increased theta, alpha, and beta waves in the occipital region [43]. Our analysis of ECoG records in rats demonstrated an increase in power in the frequency bands in alpha after the application of Sildenafil and Tadalafil. It also demonstrated the synchronization of the elevation of the powers in the brain oscillations in alpha, beta, and gamma after the application of PDE5 inhibitors.

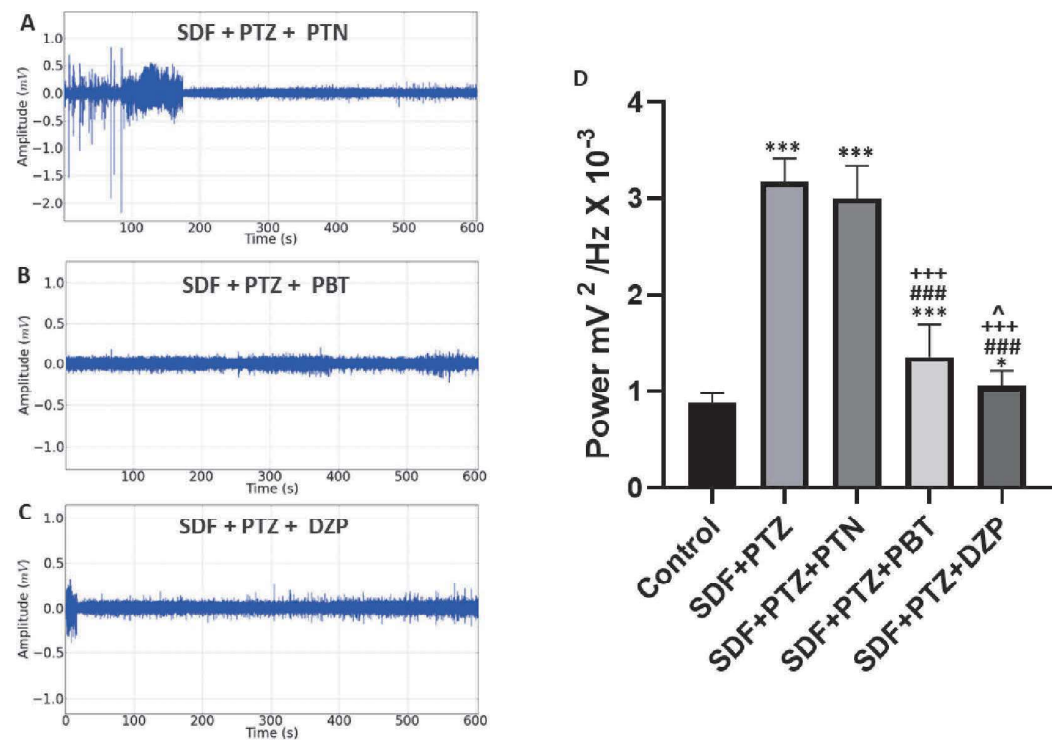


Fig 9. Representative electrocorticographic (ECoG) recordings were obtained after treatment with Sildenafil (SDF) followed by Pentylentetrazole (PTZ). (A) Tracing obtained after the application of Phenytoin (PTN); (B) tracing obtained after the application of Phenobarbital (PBT); (C) Tracing obtained after the application of Diazepam (DZP); (D) Graph demonstrating linear power averages of recordings after the application of anticonvulsant drugs. Statistical differences were obtained after ANOVA and Tukey's test (n = 9). (*) indicates a statistical difference for the control group, (#) indicates a statistical difference for the group that received TDF+PTZ, (+) indicates a statistical difference for the TDF+PTZ+ PTN group, and (^) indicates a statistical difference for the TDF group +PTZ+ PBT. The p values between the mean amplitudes are represented by asterisks *p<0.05, **p<0.01 and ***p < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294754.g009>

The presence of PDE5 has been found in the rodent cerebral cortex and hippocampus regions, where administration of selective PDE inhibitors would cause accumulation of cGMP [44]. However, it is also important to highlight the possibilities of adverse effects [45]. Furthermore, decreased epileptic threshold (proconvulsant action) has been reported following the use of PDE inhibitors [15–19, 46]. According to Hamoy et al. [27] and Silva de Melo et al. [28], an increase in the frequency band in beta in the motor cortex of rats is related to the onset of seizures. This data corroborates with our results, which demonstrate that the use of Sildenafil and Tadalafil increased the power of the frequency band in beta.

The beta range is modulated by cognitive tasks that require a relationship between sensory and motor states [47, 48]. Brain stimulation by electrotherapy shows a significant increase in beta waves as well as increased alertness, focus and concentration [49]. There are disagreements between authors as scientific texts are correlating the increase of this particular frequency range with anxiety, restlessness, and irritation in sleep disorders [50, 51] or associations of this band along with theta forces in depressive conditions and chemical dependence [52]. The use of Sildenafil and Tadalafil increased brain oscillations in beta, which may be related to one or more of the various neurological disorders mentioned.

Other findings of interest include the increase in gamma wave amplitudes observed in rodents undergoing Tadalafil experiments, which was related to the increased presence of

catecholaminergic neurotransmitters in the cortex [53]. It is also observed in patients who use Modafinil for the treatment of schizophrenia [54] and used for the improvement of sensory perception activities, attention and maintenance processing of memory information, and state of consciousness [47, 55].

There are also increases in delta, alpha, and beta potency in the use of heroin and morphine that exhibit an EEG profile similar to the results obtained with Sildenafil, as this drug has caused a similar change to the three waves mentioned above [56]. Work in progress on modulating micromolecule-based synaptic plasticity such as NYX-2925—modulating NMDA receptors—for the treatment of pain in diseases such as fibromyalgia and diabetic peripheral neuropathy also seeks to increase alpha waves [57]. Our work demonstrated the synchronization of increased powers in the alpha and beta bands after the use of Sildenafil and Tadalafil.

According to Sroykham & Wongsawat [58], in the analysis of the EEG of patients at rest, the proportion of delta and beta oscillations can estimate the hormonal levels of testosterone and cortisol, being biomarkers for physiological and psychological disorders.

The increase in beta potency is related to the aggressive behaviour observed in the animal, due to activity observed in the thalamic and cortical regions [40, 59, 60]. According to our data, the increase in the potency of the beta oscillations may be related to the decrease in the seizure threshold since, after the application of PTZ, there was an increase in the recorded potency for the groups that received Tadalafil and Sildenafil in advance. Milman & Arnold [61] showed evidence of an association between Sildenafil and several adverse effects on the central nervous system, including seizures.

Fast-wave EEG markers have been revealed, with the observation of increased alpha and beta activities in attention deficit hyperactivity disorder [62]. In a similar population, an increase in beta potency in the parietal and occipital lobe regions was identified after the use of methylphenidate or atomoxetine [63]. Animals receiving Sildenafil and Tadalafil showed increased alpha and beta oscillations.

Beta desynchronization is an essential process in the generation of movement [64]. Alpha is associated with the recruitment of a functional assembly required to generate the motor output [65, 66]. Therefore, when relating alpha and beta, it is possible to infer that the proportion of beta increases synchronized with alpha, observed in the spectral power distribution. Therefore, both Sildenafil and Tadalafil can cause a delay in the execution of planned movements.

According to de Carvalho et al. [20], Sildenafil lowers the epileptic threshold which could be related to increased cholinergic and nitrergic activity in the brain. Nieoczym et al. [15] noted that Sildenafil did not significantly influence the focal seizure threshold in the rat model with amygdala epilepsy, nor did it influence seizure severity and had weak anticonvulsant action. Nieoczym et al. [14], observed that there was no influence of Sildenafil on the latency of clonic seizures induced by cocaine administration, and it did not influence the incidence of mortality.

However, in the literature, there are reports of alterations in brain homeostasis related to the use of PDE5 inhibitors [24, 35, 67–69]. Our data demonstrates that both Sildenafil and Tadalafil increased the recording potency after PTZ administration. However, the recordings of the PTZ Sildenafil group showed higher energy intensity bursts when compared to the PTZ and Tadalafil groups.

Gholipour et al. [13] suggests that PDE5 inhibitors may facilitate GABA (A)-mediated inhibition and may potentiate the action of Benzodiazepine against PTZ-induced seizures. Assessing the possible decrease in seizures, anticonvulsants in the Tadalafil-PTZ and Sildenafil-PTZ groups showed Phenytoin did not adequately control the model seizures. For the Sildenafil +PTZ group, Phenytoin had no effect. Phenobarbital and Diazepam were more efficient in controlling seizures.

Conclusion

PDE5 inhibitors altered the electrocorticographic recordings in the motor cortex of the rats, causing an increase in potency in the alpha and beta frequency bands synchronously. After the induction of seizures with PTZ, there was an increase in energy during the more persistent potential for the Sildenafil group. Phenytoin did not adequately control the model seizures and showed a better response to Phenobarbital and Diazepam. These findings indicate that the use of PDE5 inhibitors may precipitate changes in the neurological system with impairment of the nitrenergic pathway.

Author Contributions

Conceptualization: Alex Luiz Menezes da Silva, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Data curation: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Formal analysis: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Funding acquisition: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Investigation: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Methodology: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Project administration: Alex Luiz Menezes da Silva, Akira Otake Hamoy, Moisés Hamoy.

Resources: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Software: Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Supervision: Alex Luiz Menezes da Silva, Daniella Bastos de Araujo, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Validation: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João

Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Moisés Hamoy.

Visualization: Alex Luiz Menezes da Silva, Akira Otake Hamoy, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Writing – original draft: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

Writing – review & editing: Alex Luiz Menezes da Silva, Chirlene Pinheiro Nascimento, Julianne Elba Cunha Azevedo, Luana Rodrigues Vieira, Akira Otake Hamoy, Allan Carlos da Silva Tiago, João Cleiton Martins Rodrigues, Daniella Bastos de Araujo, Dielly Catrina Favacho Lopes, Vanessa Jóia de Mello, Moisés Hamoy.

References

1. Lin C-S, Lin G, Xin Z-C, Lue TF. Expression, distribution and regulation of phosphodiesterase 5. *Curr Pharm Des.* 2006; 12: 3439–3457. <https://doi.org/10.2174/138161206778343064> PMID: 17017938
2. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev.* 2011; 91: 651–690. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2010> PMID: 21527734
3. Uckert S, Kuczyk MA. Cyclic nucleotide metabolism including nitric oxide and phosphodiesterase-related targets in the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* 2011; 527–542. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6_23 PMID: 21290241
4. Hatzimouratidis K, Salonia A, Adaikan G, Buvat J, Carrier S, El-Meliegy A, et al. Pharmacotherapy for Erectile Dysfunction: Recommendations From the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015). *J Sex Med.* 2016; 13: 465–488. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2016.01.016> PMID: 27045254
5. Andersson K-E. PDE5 inhibitors—pharmacology and clinical applications 20 years after Sildenafil discovery. *Br J Pharmacol.* 2018; 175: 2554–2565. <https://doi.org/10.1111/bph.14205> PMID: 29667180
6. Marmor MF, Kessler R. Sildenafil (Viagra) and ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 1999; 44: 153–162. [https://doi.org/10.1016/s0039-6257\(99\)00079-x](https://doi.org/10.1016/s0039-6257(99)00079-x) PMID: 10541153
7. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene.* 1998; 216: 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00303-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00303-5) PMID: 9714779
8. Younis S, Hougaard A, Christensen CE, Vestergaard MB, Petersen ET, Paulson OB, et al. Effects of Sildenafil and calcitonin gene-related peptide on brainstem glutamate levels: a pharmacological proton magnetic resonance spectroscopy study at 3.0 T. *J Headache Pain.* 2018; 19: 44. <https://doi.org/10.1186/s10194-018-0870-2> PMID: 29916084
9. Demchenko IT, Ruehle A, Allen BW, Vann RD, Piantadosi CA. Phosphodiesterase-5 inhibitors oppose hyperoxic vasoconstriction and accelerate seizure development in rats exposed to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2009; 106: 1234–1242. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91407.2008> PMID: 19179645
10. Striano P, Zara F, Minetti C, Striano S. Epileptic seizures can follow high doses of oral Vardenafil. *BMJ.* 2006; 333: 785. <https://doi.org/10.1136/sbmj.38953.758565.79> PMID: 17038735
11. Koussa S, Hage Chahine S, Tohmé A, Riachi M. [Epileptic seizures and Vardenafil]. *Rev Neurol (Paris).* 2006; 162: 651–652. [https://doi.org/10.1016/s0035-3787\(06\)75062-7](https://doi.org/10.1016/s0035-3787(06)75062-7) PMID: 16710134
12. Riazi K, Roshanpour M, Rafiei-Tabatabaei N, Homayoun H, Ebrahimi F, Dehpour AR. The proconvulsant effect of Sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: 935–943. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706680> PMID: 16474413
13. Gholipour T, Rasouli A, Jabbarzadeh A, Nezami BG, Riazi K, Sharifzadeh M, et al. The interaction of Sildenafil with the anticonvulsant effect of diazepam. *Eur J Pharmacol.* 2009; 617: 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.061> PMID: 19595687
14. Nieoczym D, Socala K, Wlaż P. Lack of effect of sildenafil on cocaine-induced convulsions in mice. *Pharmacol Rep PR.* 2009; 61: 930–934. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(09\)70151-3](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70151-3) PMID: 19904018

15. Nieoczym D, Socala K, Rundfeldt C, Wlaz P. Effects of sildenafil on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice and amygdala-kindled seizures in rats. *Pharmacol Rep PR*. 2010; 62: 383–391. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(10\)70278-4](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(10)70278-4) PMID: 20508294
16. Montaser-Kouhsari L, Payandemehr B, Gholipour T, Ziai P, Nabavizadeh P, Ghasemi A, et al. A role for opioid system in the proconvulsant effects of Sildenafil on the Pentylenetetrazole-induced clonic seizure in mice. *Seizure*. 2011; 20: 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.014> PMID: 21377383
17. Nieoczym D, Socala K, Łuszczki JJ, Czuczwar SJ, Wlaz P. Influence of sildenafil on the anticonvulsant action of selected antiepileptic drugs against entylenetetrazole-induced clonic seizures in mice. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2012; 119: 923–931. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0767-1> PMID: 22315091
18. Khoshneviszadeh M, Rahimian R, Fakhfour G, Payandemehr B, Khodaghali F, Ejtemaei Mehr S, et al. Oxytocin is involved in the proconvulsant effects of Sildenafil: Possible role of CREB. *Toxicol Lett*. 2016; 256: 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.018> PMID: 27220266
19. Nieoczym D, Socala K, Wlaz P. Evaluation of the role of different neurotransmission systems in the anti-convulsant action of Sildenafil in the 6 Hz-induced psychomotor seizure threshold test in mice. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2018; 107: 1674–1681. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.163> PMID: 30257385
20. de Carvalho MAJ, Chaves-Filho A, de Souza AG, de Carvalho Lima CN, de Lima KA, Rios Vasconcelos ER, et al. Proconvulsant effects of Sildenafil citrate on pilocarpine-induced seizures: Involvement of cholinergic, nitrenergic and pro-oxidant mechanisms. *Brain Res Bull*. 2019; 149: 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.04.008> PMID: 31004733
21. Haj-Mirzaian A, Ramezanzadeh K, Tafazolimoghdam A, Kazemi K, Nikbakhsh R, Nikbakhsh R, et al. Protective effect of minocycline on LPS-induced mitochondrial dysfunction and decreased seizure threshold through nitric oxide pathway. *Eur J Pharmacol*. 2019; 858: 172446. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172446> PMID: 31202800
22. Lin T-K, Chen S-D, Lin K-J, Chuang Y-C. Seizure-Induced Oxidative Stress in Status Epilepticus: Is Antioxidant Beneficial? *Antioxid Basel Switz*. 2020; 9: 1029. <https://doi.org/10.3390/antiox9111029> PMID: 33105652
23. Tavakoli Z, Tahmasebi Dehkordi H, Lorigooini Z, Rahimi-Madiseh M, Korani MS, Amini-Khoei H. Anti-convulsant effect of quercetin in Pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures in male mice: The role of anti-neuroinflammatory and anti-oxidative stress. *Int Immunopharmacol*. 2023; 116: 109772. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.109772> PMID: 36731152
24. Okuyucu EE, Guven O, Duman T, Gorur S, Melek IM, Akcin S, et al. EEG abnormalities during treatment with Tadalafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Neurol Res*. 2009; 31: 313–315. <https://doi.org/10.1179/174313209X382548> PMID: 19036180
25. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*. 1976; 7: 46–53. <https://doi.org/10.1161/01.str.7.1.46> PMID: 1258104
26. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—The New Coronal Set*. Elsevier Science; 2005.
27. Hamoy M, Dos Santos Batista L, de Mello VJ, Gomes-Leal W, Farias RAF, Dos Santos Batista P, et al. Cunaniol-elicited seizures: Behavior characterization and electroencephalographic analyses. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018; 360: 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.10.008> PMID: 30296455
28. Silva de Melo B, de Moraes BP, de Souza Ferreira Sá VS, Lourinho FD, Pinheiro Toda IPS, do Nascimento JLM, et al. Behavioural, electrocorticographic, and electromyographic alterations induced by Nerium oleander ethanolic extract: Anticonvulsant therapeutics assessment. *Neurotoxicology*. 2020; 78: 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.02.001> PMID: 32035075
29. Rodrigues de Oliveira F, Eleuterio Rodrigues K, Hamoy M, Sarquis ÍR, Otake Hamoy A, Crespo Lopez ME, et al. Fatty Acid Amides Synthesized from Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet.) Exhibit Anti-convulsant Action with Modulation on GABA-A Receptor in Mice: A Putative Therapeutic Option. *Pharm Basel Switz*. 2020; 13: E43. <https://doi.org/10.3390/ph13030043> PMID: 32164340
30. Souza-Monteiro JR, Hamoy M, Santana-Coelho D, Arrifano GPF, Paraense RSO, Costa-Malaquias A, et al. Anticonvulsant properties of Euterpe oleracea in mice. *Neurochem Int*. 2015; 90: 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.06.014> PMID: 26142570
31. Korkmaz MF, Parlakpınar H, Ceylan MF, Ediz L, Şamdancı E, Kekilli E, et al. The Effect of Sildenafil on Recuperation from Sciatic Nerve Injury in Rats. *Balk Med J*. 2016; 33: 204–211. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2016.14701> PMID: 27403391
32. Sarhan NR, Omar NM. An immunohistochemical and ultrastructural analysis of the retina in Tadalafil (Cialis) treated rats. *Acta Histochem*. 2018; 120: 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.002> PMID: 29526379

33. Muto NA, Hamoy M, da Silva Ferreira CB, Hamoy AO, Lucas DCR, de Mello VJ, et al. Extract of *Euterpe oleracea* Martius Stone Presents Anticonvulsive Activity via the GABAA Receptor. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16: 872743. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.872743> PMID: 35634465
34. Curtis MJ, Alexander S, Cirino G, Docherty JR, George CH, Giembycz MA, et al. Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol*. 2018; 175: 987–993. <https://doi.org/10.1111/bph.14153> PMID: 29520785
35. Calabrò RS, Reitano S, Bramanti P. Tadalafil-induced tonic-clonic seizures in a 23-year-old man. *Epilepsy Behav*. 2013; 28: 519–520. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.06.012> PMID: 23896325
36. Rahimian R, Khoshneviszadeh M, Bahremand T, Zirak MR, Dehpour AR, Mousavizadeh K. Oxytocinergic system mediates the proconvulsant effects of Sildenafil: The role of calcineurin. *Horm Behav*. 2020; 122: 104753. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104753> PMID: 32302594
37. Amiri S, Haj-Mirzaian A, Amini-Khoei H, Shirzadian A, Rahimi-Balaei M, Razmi A, et al. Lithium attenuates the proconvulsant effect of adolescent social isolation stress via involvement of the nitric system. *Epilepsy Behav*. 2016; 61: 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.04.035> PMID: 27232376
38. Davidson RJ. What does the prefrontal cortex “do” in affect: perspectives on frontal EEG asymmetry research. *Biol Psychol*. 2004; 67: 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2004.03.008> PMID: 15130532
39. Siclari F, Tononi G. Local aspects of sleep and wakefulness. *Curr Opin Neurobiol*. 2017; 44: 222–227. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.008> PMID: 28575720
40. Estumano DP, Ferreira LO, Bezerra PAL, da Silva MCP, Jardim GC, Santos GFS, et al. Alteration of Testosterone Levels Changes Brain Wave Activity Patterns and Induces Aggressive Behavior in Rats. *Front Endocrinol*. 2019; 10: 654. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00654> PMID: 31616380
41. Ye Q, Yan D, Yao M, Lou W, Peng W. Hyperexcitability of Cortical Oscillations in Patients with Somatoform Pain Disorder: A Resting-State EEG Study. *Neural Plast*. 2019; 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2687150> PMID: 31360161
42. Gruber WR, Zauner A, Lechinger J, Schabus M, Kutil R, Klimesch W. alpha phase, temporal attention, and the generation of early event related potentials. *NeuroImage*. 2014; 103: 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.08.055> PMID: 25219334
43. Lin C-T, King J-T, Chuang C-H, Ding W, Chuang W-Y, Liao L-D, et al. Exploring the Brain Responses to Driving Fatigue Through Simultaneous EEG and fNIRS Measurements. *Int J Neural Syst*. 2020; 30: 1950018. <https://doi.org/10.1142/S0129065719500187> PMID: 31366249
44. Puzzo D, Sapienza S, Arancio O, Palmeri A. Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008; 4: 371–387. <https://doi.org/10.2147/ndt.s2447> PMID: 18728748
45. Goff DC, Cather C, Freudenreich O, Henderson DC, Evins AE, Culhane MA, et al. A placebo-controlled study of Sildenafil effects on cognition in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 202: 411–417. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1278-5> PMID: 18716761
46. Gilad R, Lampl Y, Eshel Y, Sadeh M. Tonic-clonic seizures in patients taking Sildenafil. *BMJ*. 2002; 325: 869. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7369.869> PMID: 12386039
47. Herrmann CS, Strüber D, Helfrich RF, Engel AK. EEG oscillations: From correlation to causality. *Int J Psychophysiol Off J Int Organ Psychophysiol*. 2016; 103: 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2015.02.003> PMID: 25659527
48. Zaepffel M, Trachel R, Kilavik BE, Brochier T. Modulations of EEG beta power during planning and execution of grasping movements. *PLoS One*. 2013; 8: e60060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060060> PMID: 23555884
49. Lande RG, Gragnani CT. Prospective Study of Brain Wave Changes Associated With Cranial Electrotherapy Stimulation. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2018; 20: 17m02214. <https://doi.org/10.4088/PCC.17m02214> PMID: 29360291
50. O’Neil B, Prichep LS, Naunheim R, Chabot R. Quantitative brain electrical activity in the initial screening of mild traumatic brain injuries. *West J Emerg Med*. 2012; 13: 394–400. <https://doi.org/10.5811/westjem.2011.12.6815> PMID: 23359586
51. Prichep LS. Quantitative EEG and electromagnetic brain imaging in aging and in the evolution of dementia. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1097: 156–167. <https://doi.org/10.1196/annals.1379.008> PMID: 17413018
52. Newson JJ, Thiagarajan TC. EEG Frequency Bands in Psychiatric Disorders: A Review of Resting State Studies. *Front Hum Neurosci*. 2018; 12: 521. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00521> PMID: 30687041

53. Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AFT, Kelley AE, Schmeichel B, et al. Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry*. 2006; 60: 1111–1120. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.022> PMID: [16806100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16806100/)
54. Minzenberg MJ, Yoon JH, Cheng Y, Carter CS. Sustained Modafinil Treatment Effects on Control-Related Gamma Oscillatory Power in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2016; 41: 1231–1240. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.271> PMID: [26329382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26329382/)
55. Fink A, Grabner RH, Benedek M, Reishofer G, Hauswirth V, Fally M, et al. The creative brain: investigation of brain activity during creative problem solving by means of EEG and fMRI. *Hum Brain Mapp*. 2009; 30: 734–748. <https://doi.org/10.1002/hbm.20538> PMID: [18266217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18266217/)
56. Zanettini C, Scaglione A, Keighron JD, Giancola JB, Lin S-C, Newman AH, et al. Pharmacological classification of centrally acting drugs using EEG in freely moving rats: an old tool to identify new atypical dopamine uptake inhibitors. *Neuropharmacology*. 2019; 161: 107446. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.034> PMID: [30481526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30481526/)
57. Burgdorf JS, Christian EP, Sørensen L, Stanton PK, Leaderbrand K, Madsen TM, et al. A translational EEG-based approach to assess modulation of long-lasting NMDAR-dependent synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019; 236: 3687–3693. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05341-w> PMID: [31392357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31392357/)
58. Sroykham W, Wongsawat Y. Estimation of testosterone/cortisol ratio by resting state eeg delta/beta ratio in elderly people. *Neuro Endocrinol Lett*. 2018; 39: 75–82. PMID: [29803211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29803211/)
59. Morihisa JM, Duffy FH, Wyatt RJ. Brain electrical activity mapping (BEAM) in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry*. 1983; 40: 719–728. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1983.01790060017002> PMID: [6860073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6860073/)
60. Kiehl KA. A cognitive neuroscience perspective on psychopathy: evidence for paralimbic system dysfunction. *Psychiatry Res*. 2006; 142: 107–128. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2005.09.013> PMID: [16712954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16712954/)
61. Milman HA, Arnold SB. Neurologic, psychological, and aggressive disturbances with Sildenafil. *Ann Pharmacother*. 2002; 36: 1129–1134. <https://doi.org/10.1345/aph.1A402> PMID: [12086542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12086542/)
62. Callaway E, Halliday R, Naylor H. Hyperactive children's event-related potentials fail to support underarousal and maturational-lag theories. *Arch Gen Psychiatry*. 1983; 40: 1243–1248. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1983.01790100089012> PMID: [6639294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6639294/)
63. Aldemir R, Demirci E, Bayram AK, Canpolat M, Ozmen S, Per H, et al. Evaluation of Two Types of Drug Treatment with QEEG in Children with ADHD. *Transl Neurosci*. 2018; 9: 106–116. <https://doi.org/10.1515/tnsci-2018-0017> PMID: [30191077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191077/)
64. Morillon B, Arnal LH, Schroeder CE, Keitel A. Prominence of delta oscillatory rhythms in the motor cortex and their relevance for auditory and speech perception. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 107: 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.012> PMID: [31518638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518638/)
65. Rhodes E, Gaetz WC, Marsden J, Hall SD. Transient alpha and beta Synchrony Underlies Preparatory Recruitment of Directional Motor Networks. *J Cogn Neurosci*. 2018; 30: 867–875. https://doi.org/10.1162/jocn_a_01250 PMID: [29488848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29488848/)
66. Athanasiou A, Klados MA, Styliadis C, Foroglou N, Polyzoidis K, Bamidis PD. Investigating the Role of alpha and beta Rhythms in Functional Motor Networks. *Neuroscience*. 2018; 378: 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.044> PMID: [27241945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27241945/)
67. Farooq MU, Naravetla B, Moore PW, Majid A, Gupta R, Kassab MY. Role of Sildenafil in neurological disorders. *Clin Neuropharmacol*. 2008; 31: 353–362. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e31815cd94c> PMID: [19050413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19050413/)
68. Juliá-Romero C. Status epilepticus secondary to a high dose Sildenafil intake. *Med Clin (Barc)*. 2021; 157: 356–357. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.07.048> PMID: [33277021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33277021/)
69. Socala K, Nieoczym D, Pieróg M, Wyska E, Szafarz M, Doboszewska U, et al. Effect of Tadalafil on Seizure Threshold and Activity of Antiepileptic Drugs in Three Acute Seizure Tests in Mice. *Neurotox Res*. 2018; 34: 333–346. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9876-4> PMID: [29427285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29427285/)