

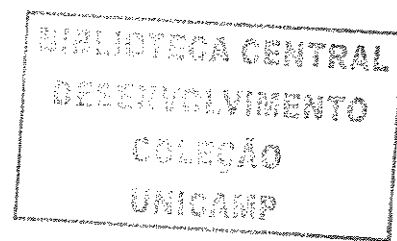
C

ALISTER DE MIRANDA CARÁ

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO CANAL
DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTE NA EREÇÃO PENIANA
EM CÃES**

CAMPINAS

2005



ALISTER DE MIRANDA CARÁ

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO CANAL
DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTE NA EREÇÃO PENIANA
EM CÃES**

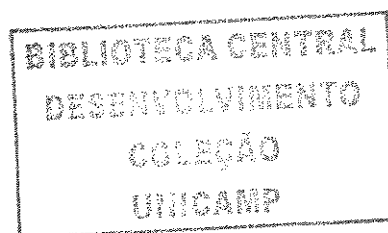
*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.*

Orientador: Prof. Dr Adriano Fregonesi

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Jr.

CAMPINAS

2005



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C175p Cará, Alister de Miranda
Participação do óxido nítrico e do canal de potássio ATP-dependente na ereção peniana em cães / Alister de Miranda Cará. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Adriano Fregonesi, Nelson Rodrigues Netto Júnior
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ereção peniana. 2. Óxido nítrico. 3. Pressão intracavernosa.
I. Fregonesi, Adriano. II. Netto Júnior, Nelson Rodrigues. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Título em ingles: Role of adenosine triphosphate –dependent potassium channels in canine penile erection

Keywords: • Penile erection
• Nitric oxide
• Intracavernous pressure

Área de concentração : Cirurgia

Titulação: Doutorado

Banca examinadora: Prof Dr Adriano Fregonesi

Prof Dr Sidney Glina

Prof Dr Carlos Teodósio Da Ros

Prof Dr Ronilson Agnaldo Moreno

Prof Dr Cássio Luis Zanettini Riccetto

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
C175p
V EX
TOMBO BC/ 70051
PROC 16.123-06
C D X
PREÇO 11,00
DATA 22/09/06
Vº CPD

Sub ID 381777

Data da defesa: 07/12/2005

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Adriano Fregonesi

Membros:

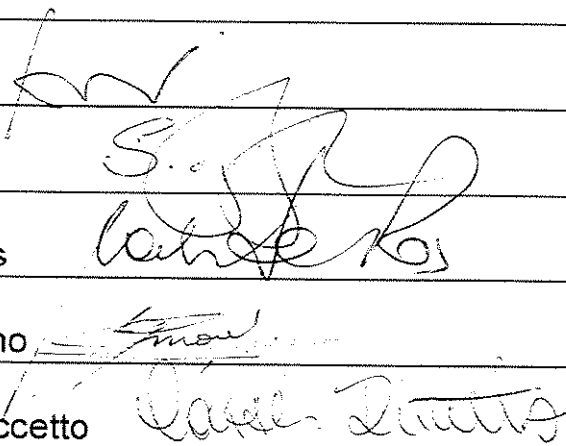
1. Prof. Dr. Adriano Fregonesi

2. Prof. Dr. Sidney Glina

3. Prof. Dr. Carlos Teodósio Da Ros

4. Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

5. Prof. Dr. Cássio Luis Zanettini Riccetto



Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/12/2005

DEDICO ESTA TESE

*Aos meus pais, Ceres e Eugênio
pelo amor e dedicação.*

*A minha esposa e filhas, Rosa, Maria Eugênia, Maria Eduarda,
pelo carinho e união.*

*A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente nesta tese,
pelo amor ao próximo.*

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Neto Jr., orientador, amigo e conselheiro. Principal incentivador para o meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Adriano Fregonesi, orientador e amigo. Principal colaborador na realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pelo estímulo na realização de pesquisa básica e uma das principais pessoas responsáveis pelo elo entre o Departamento de Farmacologia e a Disciplina de Urologia.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela amizade e confiança que depositou na união do Departamento de Farmacologia à Disciplina de Urologia, para que trabalhos como este pudessem se tornar realidade.

A Prof. Dra. Carmita Abdo, pela presteza na correção da epidemiologia e principalmente pela amizade e incentivo ao desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Fernandes Denardi mentor deste trabalho.

Ao veterinário Flávio Faro e a Dra. Aldete Zappellini, pela ajuda inestimável na execução do trabalho experimental.

À Sra. Maria Rita Barbosa Frezzarin, pelo carinho, atenção e presteza na correção das normas desta tese e pela revisão ortográfica.

À Sílvia Auxiliadora de Lúcio, pela organização e editoração deste trabalho.

À Sra. Mercedes de Fátima Santos pela elaboração das figuras.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxi</i>
1- INTRODUÇÃO.....	35
1.1- Fisiologia da ereção peniana.....	38
1.2- Hemodinâmica da ereção peniana.....	39
1.3- Farmacologia da ereção peniana.....	42
1.3.1- Transmissores/moduladores da contração da musculatura lisa do corpo cavernoso.....	44
1.3.2- Transmissores/moduladores do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso.....	54
1.4- Regulação do tônus dos corpos cavernosos.....	70
2- OBJETIVOS.....	75
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.1- Escolha do modelo experimental.....	81
3.2- Grupos experimentais.....	81
3.3- Grupo piloto.....	82
3.4- Preparo dos animais.....	82
3.5- Padronização dos procedimentos cirúrgicos.....	82
3.6- Grupo I - Protocolo de avaliação da via NO-GMPc.....	86
3.7- Grupo II - Protocolo de avaliação do canal de KATP.....	87

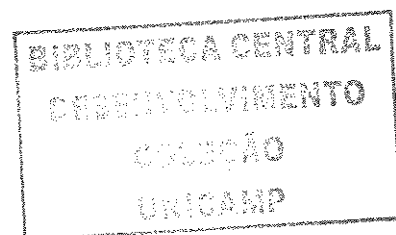
3.8- Drogas.....	87
3.9- Análise Estatística.....	88 ³
4- RESULTADOS.....	89
4.1- Grupo I - Protocolo de avaliação da via NO-GMPc.....	91
4.2- Grupo II - Protocolo de avaliação do canal de KATP.....	95
5- DISCUSSÃO.....	97
6- CONCLUSÃO.....	105
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
8- ANEXOS.....	133

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina tri-fosfato
AT1	Receptor de angiotensina 1
AT2	Receptor de angiotensina 2
AT3	Receptor de angiotensina 3
AT4	Receptor de angiotensina 4
Ca²⁺	Íon Cálcio
CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propano-sulfato
CCH	Corpo cavernoso humano
cGKI	Proteína quinase GI
cGKII	Proteína quinase GII
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CK	Cromacalina
DAG	Diacilglicerol
DE	Disfunção erétil
D-NAME	N-nitro-D-arginina metil éster
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
ET	Endotelina
ET1	Endotelina 1

ET2	Endotelina 2
ET3	Endotelina 3
ETA	Receptor de endotelina A
ETB	Receptor de endotelina B
EP1	Receptor da prostaglandina E
EP2	Receptor da prostaglandina E
EP3	Receptor da prostaglandina E
EP4	Receptor da prostaglandina E
G	Proteína G
GCs	Guanilato ciclase
cGKI	Proteína quinase dependente do GMPc I
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTN	Gliceriltrinitrato
GTP	Trifosfato de guanosina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IC	Intracavernosa
IP₃	Inositol trifosfato
ECA	Enzima conversora de angiotensina
K_{ATP}	Canais de potássio dependentes do trifosfato de adenosina
K_{ca}	Canais de potássio ativados por cálcio
K⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
L-NORG	N ^G -nitro-L-arginina

L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
MCL	Miosina de cadeia leve
MCL-P	Fosfatase da miosina de cadeia leve
MLCC	Musculatura lisa dos corpos cavernosos
M1	Receptor muscarínico 1
M2	Receptor muscarínico 2
M3	Receptor muscarínico 3
M4	Receptor muscarínico 4
Na⁺/Ca⁺⁺	Íon sódio/ Íon cálcio
Na⁺/H⁺	Íon sódio/ Íon hidrogênio
Na⁺/K⁺	Íon sódio/ Íon potássio
NANC	Não-adrenérgico e não-colinérgico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H – [1,2,4] oxadiazolo [4,3,-alquinoxalin –1-one]
PD3	Fosfodiesterase 3
PD5A	Fosfodiesterase 5 A
PD5A1	Fosfodiesterase 5 A1
PD5A2	Fosfodiesterase 5 A2
PD5A3	Fosfodiesterase 5 A3
PGE1	Prostaglandina E1



PGE2	Prostaglandina E2
PGD2	Prostaglandina D2
PGF2alfa	Prostaglandina F2alfa
PGI2	Prostaciclina
DP	Receptor da prostaglandina D2
EP	Receptor da prostaglandina E2
FP	Receptor da prostaglandina F2alfa
IP	Receptor da prostaciclina
TP	Receptor do tramboxano A2
PIC	Pressão intracavernosa
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PKC	Proteína quinase C
RNA	Ácido ribonucléico
TTX	Tetrodotoxina
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Inibição da tumescência provocada pelo estímulo do nervo pélvico pelo L-NAME com reversão pela L-arginina e não D-arginina.....	91
Tabela 2- Efeitos da cromacalina e do estímulo do nervo pélvico na pressão intracavernosa antes e depois da injeção intracavernosa de glibenclamida.....	95

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Representação esquemática das estruturas envolvidas na flacidez.....	41
Figura 2- Representação esquemática das estruturas envolvidas na ereção...	41
Figura 3- Ilustrações das alterações dos vasos e sinusóides cavernosos.....	42
Figura 4- Receptores adrenérgicos e mecanismo de contração.....	45
Figura 5- Mecanismo de ação da epinefrina na contração.....	46
Figura 6- Mecanismo de contração da musculatura lisa do corpo.....	48
Figura 7- Mecanismo de ação da angiotensina II na contração.....	51
Figura 8- Mecanismo de ação do polipeptídeo vasoativo intestinal.....	57
Figura 9- Mecanismo de ação da prostaglandina no relaxamento.....	60
Figura 10- Mecanismo de relaxamento da musculatura lisa cavernosa.....	63
Figura 11- Mecanismo de ação do GMP cíclico no relaxamento.....	69
Figura 12- Demonstração do pinçamento do nervo pélvico.....	84
Figura 13- Efeito da administração endovenosa de D-NAME, L-NAME.....	92
Figura 14- Efeito inibitório do aumento da pressão intracavernosa.....	93
Figura 15- Traçado representativo da pressão intracavernosa.....	94
Figura 16- Traçado representativo do aumento da pressão intracavernosa.....	96

RESUMO

O óxido nítrico e os canais iônicos de potássio e cálcio são fundamentais no fenômeno de ereção peniana tanto em animais como em seres humanos. O objetivo deste estudo foi investigar o papel fisiológico e os aspectos hemodinâmicos do óxido nítrico (NO) e dos canais de potássio dependentes do adenosina de trifosfato (K_{ATP}) no fenômeno de ereção peniana em cães. No estudo foram utilizados quinze cães adultos, machos, anestesiados, com peso médio de 9.2 ± 0.7 kg. A ereção peniana foi induzida através do estímulo do nervo pélvico e as variações da pressão intracavernosa (IC) foram registradas por meio de um transdutor de pressão (PRC 21/3, Ugo Basile, Italy). No grupo I, a pressão IC basal foi de 12.8 ± 5.0 mmHg. O estímulo do nervo pélvico aumentou significativamente a pressão IC a 86.2 ± 11.4 mmHg ($p < 0.05$), com latência de 8.8 ± 2.9 segundos(seg). O D-NAME, enantiômero inativo do L-NAME, não alterou a resposta evocada pelo estímulo nervoso (79.8 ± 12.5 mmHg, latência de 7.2 ± 1.9 seg). Entretanto, o tratamento dos animais com a injeção intravenosa do inibidor da síntese de óxido nítrico o L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster; 10 mg/kg) inibiu em 82 % o aumento da pressão IC induzida pelo estímulo nervoso (15.4 ± 5.0 mmHg, $n = 5$, $P < 0.05$). A L-Arginine, e não D-Arginine reverteu parcialmente (48 %, $P < 0.05$) o efeito inibitório induzido pelo L-NAME. Finalmente, a injeção intracavernosa de papaverina promoveu aumento da pressão IC para 116.0 ± 10.9 mmHg ($P < 0.01$) com latência de 6 ± 0.7 sec.

No grupo II, a administração intracavernosa do agonista do canal de K_{ATP} , cromacalina (3 e 10 μ g) aumentou, significativamente, a pressão intracavernosa (PIC= 103 ± 14.4 mmHg e 106 ± 12.1 mmHg, respectivamente, $n = 4$, $P < 0.05$). A administração intracavernosa do bloqueador seletivo do canal de K_{ATP} , glibenclamida (10 mg) inibiu o aumento da PIC induzida pela cromacalina (10 μ g). Entretanto, a glibenclamida não afetou o aumento da PIC evocado por estímulo elétrico do nervo pélvico. A análise dos resultados mostrou que o relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos e a ereção peniana em cães dependem da liberação de NO. Contudo, a evidência de que a glibenclamida não afetou o aumento da pressão intracavernosa induzida por estímulo elétrico do nervo pélvico sugere que os canais de K_{ATP} não exercem um papel importante no mecanismo de ereção peniana em cães.

ABSTRACT

Objective: To define the physiologic role and hemodynamic features of nitric oxide (NO) and the adenosine triphosphate (ATP)-dependent K^+ (K_{ATP}) channel in canine penile erection.

Material and Methods: Mongrel dogs were anesthetized, and penile erection was induced by electrical stimulation of the pelvic nerve. Changes in the intracavernous pressure (ICP) were measured with a transducer.

Results: The basal ICP was 12.8 ± 5.0 mmHg. Pelvic nerve stimulation (5 to 20 V, 5 to 15 Hz, for 1-minute interval) significantly increased the ICP to 86.2 ± 11.4 mmHg, ($n = 5$, $P < 0.05$). Treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl ester; 10 mg/kg intravenously) abolished this increase (15.4 ± 5.0 mmHg, $n = 5$, $P < 0.05$). Intracavernous injection of the K_{ATP} channel opener cromakalim (3 and 10 μ g) increased the ICP (103 ± 14.4 mmHg and 106 ± 12.1 mmHg, respectively, $n=4$). This response was abolished by the prior intracavernous injection of the selective K_{ATP} channel-specific blocker glibenclamide (10 mg). Glibenclamide did not affect the increase in ICP induced by electric stimulation of the pelvic nerve (88 ± 24.2 mmHg).

Conclusions: Our results indicate that relaxation of canine cavernous smooth muscle and penile tumescence are mediated by NO. The failure of glibenclamide to affect the increase in ICP induced by pelvic nerve stimulation suggest that ATP-dependente K^+ channels probably do not play a physiologic role in canine penile erection.

1- INTRODUÇÃO

A ereção peniana é um evento fisiológico complexo que compreende mecanismos psíquicos, neurais e vasculares, envolvendo a interação da estimulação neural do músculo liso do corpo cavernoso com a liberação neuro-humoral de fatores contráteis e relaxantes do endotélio (KRANE et al., 1989; LUE et al., 1983; SAENZ DE TEJADA et al., 1988). Os estudos dos mecanismos centrais e periféricos da ereção peniana levaram a grandes avanços no tratamento clínico da disfunção erétil (DE). Na última década o desenvolvimento de novas drogas de terapia oral, como a sildenafila, marcou o início de uma nova era no tratamento farmacológico não invasivo da DE. Entretanto, esses avanços terapêuticos só foram obtidos através do conhecimento dos principais sistemas neurogênicos e seus mediadores envolvidos no mecanismo fisiofarmacológico da ereção peniana. A investigação da hemodinâmica peniana em animais anestesiados incluindo o cão, coelho e o macaco, estabeleceu que três eventos interdependentes ocorrem durante a ereção: relaxamento da musculatura lisa adjacente aos sinusóides do corpo cavernoso, aumento do influxo arterial e oclusão passiva das veias emissárias que drenam o corpo cavernoso (DORR e BRODY, 1967; SJOSTRAND e KLINGE, 1979; LUE et al., 1983). O mais importante ainda é que estes achados comparados a estudos clínicos demonstraram que esta seqüência de eventos hemodinâmicos também ocorre em seres humanos (SHIRAI et al., 1978; MEULEMAN et al., 1992). Por isso, nos últimos 30 anos a pesquisa sobre disfunção erétil esteve enfocada na anatomia e nos mecanismos responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos obtendo-se assim os conhecimentos atuais sobre a fisiologia da ereção peniana.

No início da década de 90, resolvemos estudar os mecanismos envolvidos na fisiologia da ereção peniana associando-nos ao Departamento de Farmacologia. Após alguns anos, conseguimos publicar, pela primeira vez, um trabalho com resultados clínicos e laboratoriais na revista *British Journal of Urology* (Cará et al., 1995). A partir de então, surgiram muitos outros trabalhos publicados demonstrando uma perfeita harmonia entre a pesquisa clínica e laboratorial pela disciplina de Urologia representada pelo Professor Doutor Nelson Rodrigues Netto Jr. e Professor Doutor Adriano Fregonesi e o Departamento de Farmacologia representada pelos Professores Doutores Gilberto De Nucci e Edson Antunes. No entanto, a maioria destes trabalhos são frutos de pesquisas laboratoriais *in vitro*. Desta forma, decidimos ampliar os nossos recursos em pesquisa

iniciando os estudos *in vivo*. Assim, começamos a desenvolver o modelo experimental em cães visando estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos na ereção peniana.

Uma vez estabelecido o método em induzir ereções penianas através do estímulo elétrico do nervo pélvico resolvemos estudar os canais de potássio (K^+) que presumivelmente exercem um papel importante no relaxamento da musculatura lisa vascular e tecido erétil peniano (BOLOTINA et al., 1994; KUBO et al., 1994; ARCHER et al., 1994, 2002). Assim, baseando-se nas evidências apresentadas iniciamos nossa pesquisa investigando o canal de K_{ATP} na ereção peniana em cães o que resultou na presente tese de doutorado e no respectivo trabalho publicado que será detalhadamente descrito a seguir.

1.1- Fisiologia da ereção peniana

A seqüência de fenômenos determinantes da ereção peniana permaneceu obscura durante séculos. No século IX acreditava-se que a ereção peniana decorria de uma oclusão ativa do mecanismo de drenagem venosa do pênis (*KOBELT, 1851). Durante anos, prevaleceu à teoria de que o fenômeno decorreria simplesmente do aumento do fluxo arterial controlado por válvulas nos vasos penianos (DEYSACH, 1939; CONTI, 1952). Somente na década de 80 foi elucidada a seqüência correta de eventos hemodinâmicos responsáveis pela ereção peniana, utilizando modelos experimentais desenvolvidos em macacos e cães. Tais modelos baseavam-se na colocação de eletrodos ao redor do nervo cavernoso e a aplicação de corrente elétrica aos mesmos, permitindo a obtenção de ereções reprodutíveis. Simultaneamente, a inserção de agulhas diretamente no corpo cavernoso possibilitava o registro gráfico destas respostas tanto em termos de elevação da pressão intracavernosa como de duração da tumescência.

Além disso, tal modelo possibilitava a infusão de solução fisiológica intracavernosa, permitindo estimar o retorno venoso peniano tanto no estado flácido como no ereto. Estes trabalhos elucidaram a inter-relação entre as alterações de fluxo arterial e

* KOBELT. apud BONDIL, P; DOREMIEUX, A; KANAWATI, A – Mechansims of human erection: A historical overview. Int. J. Impotence Res, 2, Supplement 2, 61—62, 1990.

venoso, correlacionando-os com o comportamento da musculatura lisa intracavernosa durante a ereção peniana.

Assim, estudos funcionais aliados a análises histológicas e de microscopia eletrônica permitiram definir a seqüência de eventos hemodinâmicos responsáveis pela ereção que é aceita, atualmente, em animais e seres humanos (LUE et al., 1983, 1984).

1.2- Hemodinamica da ereção peniana

O processo de ereção e detumescência foram divididos em diferentes fases (ABOSEIF e LUE, 1988; ANDERSSON e WAGNER, 1995).

- Fase 0 é o estado de flacidez peniana. Durante este estado, as artérias cavernosas e a musculatura lisa cavernosa estão contraídas, sob a influência, principalmente, do sistema nervoso simpático. O fluxo sanguíneo pelas artérias cavernosas é mínimo e mantido por motivos nutricionais. O fluxo pelas vênulas subtunicais e veias emissárias é livre, sem nenhum obstáculo. Eletromiografia neste estado demonstra contratilidade da musculatura lisa (WAGNER et al., 1989) (Figura 1).
- Fase 1 é a fase latente ou de enchimento. Após estimulação sexual, o sistema nervoso parassimpático aumenta a sua atividade, aumentando o fluxo sanguíneo pelas artérias pudendas internas e cavernosas. A resistência no corpo cavernoso diminui devido ao relaxamento das artérias helicinas e musculatura lisa das trabéculas. O pênis aumenta em comprimento. A pressão intracavernosa não aumenta, assim como a pressão sanguínea sistêmica.
- Fase 2 é a fase de tumescência. O fluxo sanguíneo em homens jovens aumenta de 25 a 60 vezes comparado ao estado de flacidez. A pressão intracavernosa aumenta rapidamente. A complacência do corpo cavernoso aumenta significativamente em razão do relaxamento da musculatura lisa trabecular. O pênis aumenta de comprimento e diâmetro. No final desta fase, o fluxo sanguíneo arterial diminui.

- Fase 3 é a fase de ereção plena. O corpo cavernoso aumenta o seu diâmetro devido ao acúmulo de sangue e comprime as vênulas subtunicais contra a túnica albugínea, reduzindo o retorno venoso (Figura 2). As reduções do efluxo venoso pela compressão mecânica das vênulas subalbugíneas são conhecidas como mecanismo veno-oclusivo (SHIRAI et al., 1978) (Figura 3). A pressão intracavernosa fica 10 a 20 mmHg abaixo da pressão sanguínea sistólica.
- Fase 4 é a fase de ereção rígida ou esquelética. A pressão intracavernosa está bem acima da pressão sanguínea sistólica, consequência da contração da musculatura isquiocavernosa e bulbocavernosa. Não existe fluxo pelas artérias cavernosas durante esta fase.
- Fase 5 é a fase de transição. Aumenta a atividade do sistema nervoso simpático, aumentando, assim, a contratilidade da musculatura lisa das artérias e das trabéculas. O fluxo arterial é reduzido, no entanto o mecanismo veno-oclusivo ainda está ativo.
- Fase 6 é a fase inicial da detumescência. Existe um moderado declínio da pressão intracavernosa, as vênulas subtunicais aumentam o fluxo.
- Fase 7 é a fase de detumescência rápida. A pressão intracavernosa declina rapidamente, o mecanismo de veno-oclusão está desativado e o pênis retorna ao estado de flacidez.

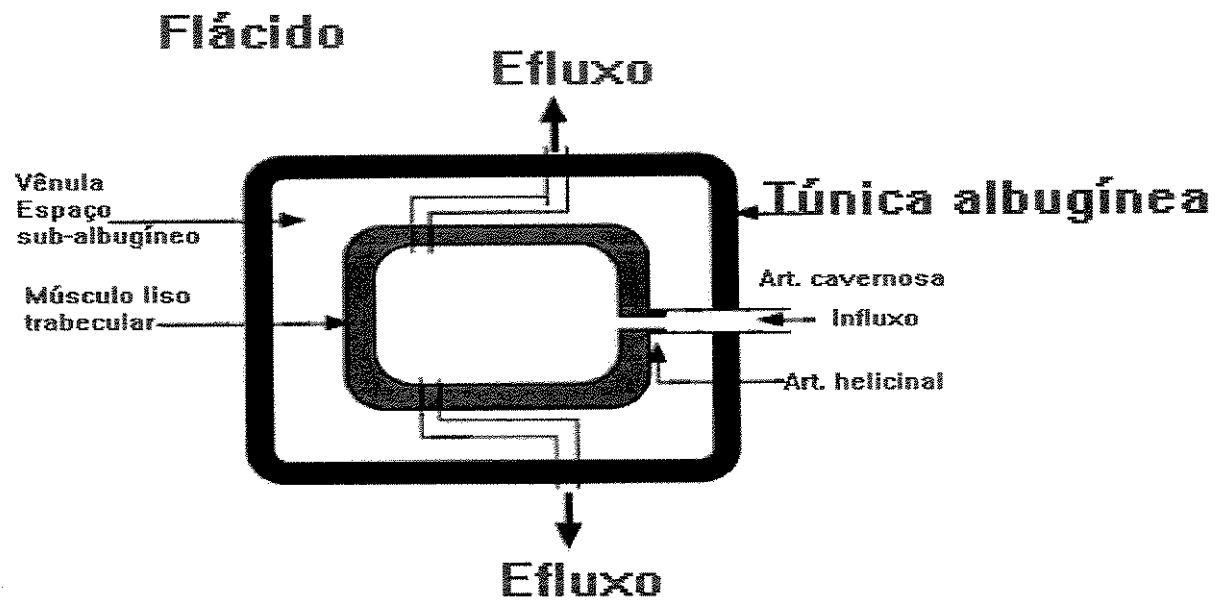


Figura 1- Representação esquemática das estruturas envolvidas na flacidez peniana (CARSON et al., 1999).

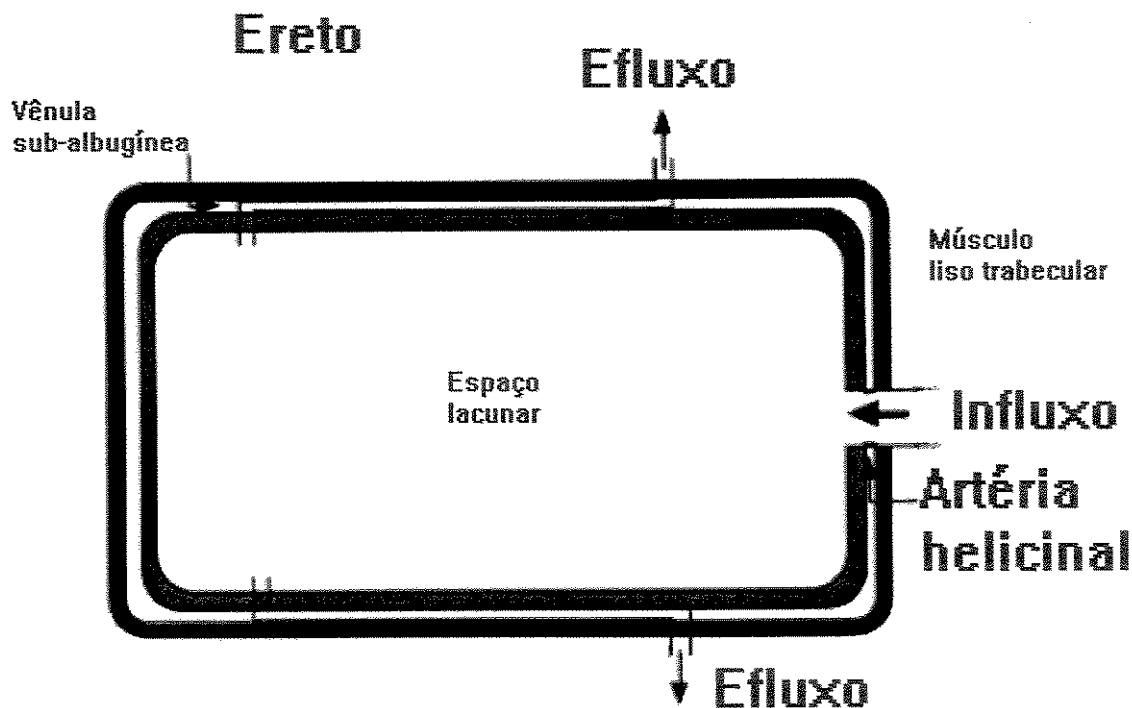


Figura 2- Representação esquemática das estruturas envolvidas na ereção peniana (CARSON et al., 1999)

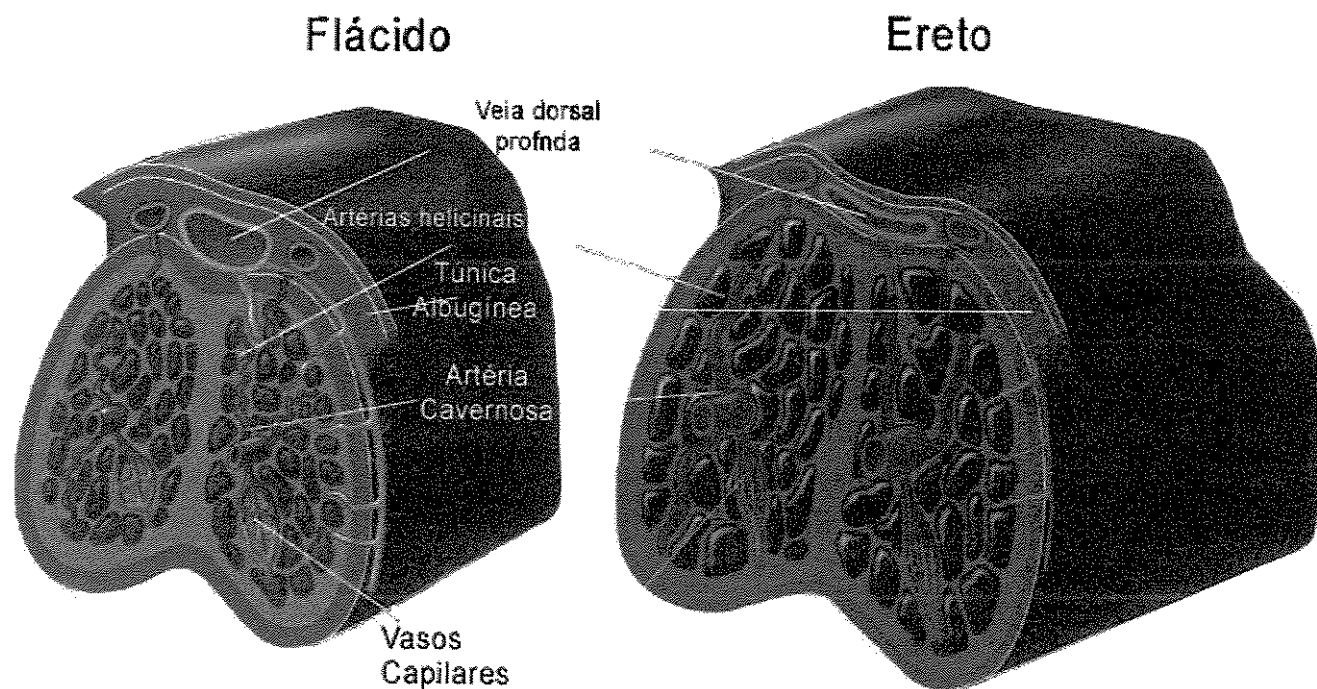


Figura 3- Ilustração das alterações dos vasos e sinusóides cavernosos no estado flácido e ereto do pênis. Notar a compressão mecânica das vênulas subalbugíneas constituindo o mecanismo veno-oclusivo (LUE T.F., 2000).

Após o conhecimento anatômico e hemodinâmico da ereção peniana, os esforços de pesquisa passaram a se concentrar na identificação dos neurotransmissores que, liberados pelas terminações nervosas do nervo cavernoso, desencadeiam uma série de eventos que controlam o tônus da musculatura lisa intracavernosa, constituindo o evento fundamental da ereção peniana.

1.3- Farmacologia da ereção peniana

A ereção peniana é um fenômeno neuro-vascular resultante do relaxamento da musculatura lisa dos vasos e do tecido dos corpos cavernosos (ANDERSSON, 2001a).

Este relaxamento é mediado por sistemas de transmissão com a liberação de vários neurotransmissores do sistema nervoso central e periférico.

O tecido cavernoso recebe inervações somáticas, simpáticas, parassimpática, não adrenérgica e não-colinérgica (NANC) (DAIL., 1993, ANDERSSON, 2001b). Os nervos NANC contêm não somente neuropeptídeos, mas também transmissores e enzimas moduladoras ou geradoras de transmissores, como é o caso da óxido nítrico sintases (NOS) e das hemo - oxigenases (SAENZ DE TEJADA, 2000).

Transmissores NANC também podem ser encontrados em nervos colinérgicos e adrenérgicos. Assim, é difícil caracterizar as populações de nervos baseadas em seus transmissores (LUNDBERG, 1996). Contudo, um importante grupo de nervos no corpo cavernoso contém além da acetilcolina (Ach), NOS, polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (HEDLUND et al.; 2000b).

Além disso, o endotélio dos vasos exerce uma função importante no mecanismo de relaxamento e contração da musculatura lisa através da liberação de poderosos vasodilatadores como: prostaciclina (MONCADA et al., 1976), fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980), e do metabolismo de substâncias vasoativas como: catecolaminas, angiotensina, bradicinina e prostaglandinas (VANE, 1969).

Assim, os nervos e o endotélio dos sinusóides e vasos penianos produzem e liberam transmissores e moduladores que interagem no controle do estado contrátil da musculatura lisa peniana.

Desta forma, o balanço entre os fatores que contraem e relaxam a musculatura lisa do corpo cavernoso regula o tônus tecidual e determina o estado funcional do pênis: detumescência e flacidez, tumescência e ereção. O sistema nervoso autônomo simpático é antieretivo e a transmissão via sacral parassimpático é pró-eretiva.

1.3.1- Transmissores/moduladores da contração da musculatura lisa do corpo cavernoso

- **Noradrenalina**

A noradrenalina, também conhecida como norepinefrina, é sintetizada a partir da tirosina através de uma sequência de etapas envolvendo enzimas e co-fatores. A noradrenalina é o neurotransmissor das fibras simpáticas pós-ganglionares (LEFKOWITZ et al., 1996).

O corpo cavernoso apresenta uma rica inervação adrenérgica e acredita-se que o estado de flacidez peniana seja mantido principalmente pela tonicidade simpática. A noradrenalina liberada estimula receptores alfa das artérias penianas (cavernosa e helicinas) e trabéculas, contraindo a musculatura (ANDERSSON e WAGNER, 1995).

Existem no corpo cavernoso receptores alfa e beta, com predomínio dos receptores alfa. Entretanto, para cada receptor beta existem dez receptores alfa (LEVIN e WEIN, 1980). Dos receptores alfa, foram identificados os receptores alfa 1 e alfa 2 em corpo cavernoso humano, contudo existe uma predominância funcional dos receptores alfa 1 neste tecido (GOEPEL et al., 1999).

Todos os subtipos de receptores alfa 1 foram demonstrados em corpo cavernoso humano. TRAISH et al. (1995a) demonstraram que existe predominância dos receptores alfa 1A e alfa 1D, no entanto, GOEPEL et al. (1999) demonstraram um predomínio de alfa 1A, alfa 1B e alfa 2A.

TRAISH et al. (1997) comprovaram expressão de RNAm para alfa 2A, alfa 2B e alfa 2C em todo o corpo cavernoso humano. Não se sabe, até o momento, se os receptores alfa 2 são importantes para a regulação do tônus da musculatura lisa do corpo cavernoso. Receptores alfa 2 pré-juncionais modulam a liberação de noradrenalina dos nervos simpáticos do corpo cavernoso (MOLDERINGS et al., 1989). Todavia, estimulação de receptores alfa 2 pré-juncionais de artérias penianas de resistência de cavalos inibem a liberação de transmissores não-adrenérgicos e não-colinérgicos (SIMONSEN et al., 1997) (Figura 4).

Alguns fatores, incluindo os andrógenos, regulam a responsividade dos receptores alfa na musculatura lisa cavernosa.

REILLY et al. (1997), comparando ratos normais com ratos castrados, verificaram que os ratos castrados apresentavam reatividade aumentada quando os receptores alfa 1 eram estimulados.

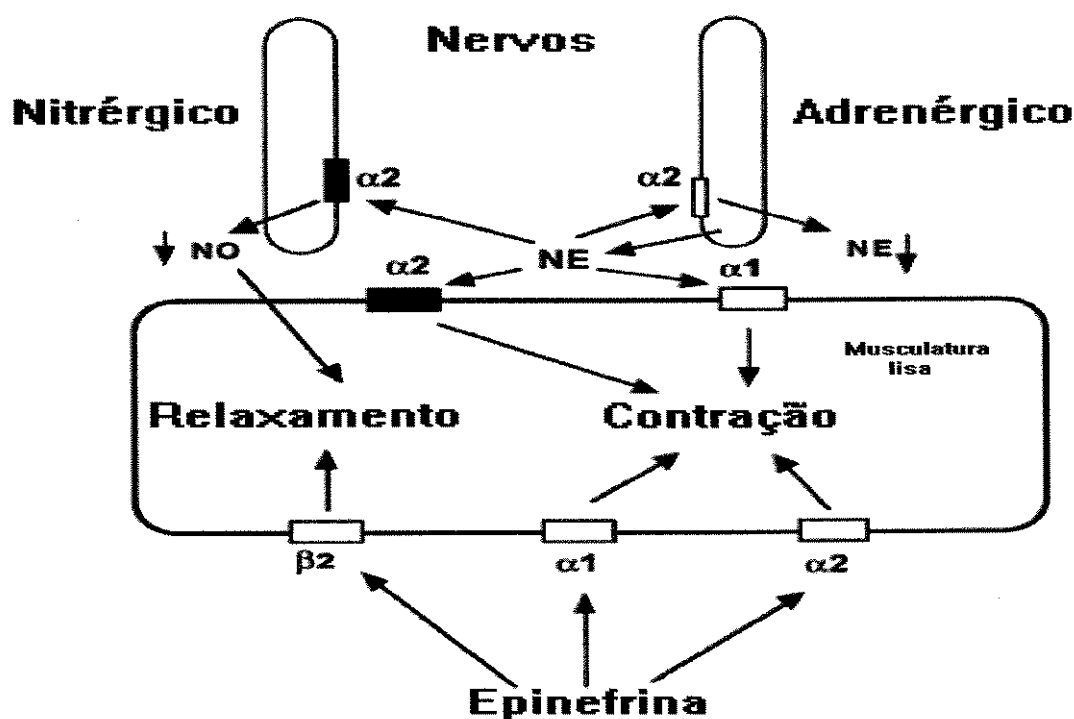


Figura 4- Receptores adrenérgicos e mecanismo de contração e relaxamento da musculatura lisa do corpo carvernoso (JARDIN, et al., 2000)

O mecanismo de transdução intracelular, quando os receptores alfa são estimulados, faz-se através do metabolismo do fosfatidil inositol pela enzima fosfolipase C, produzindo o inositol trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG). O inositol trifosfato, por sua vez, agindo no receptor para IP_3 na membrana do retículo sarcoplasmático, libera o cálcio para o citoplasma, aumentando a concentração deste íon.

O DAG estimula a proteína quinase C que, por sua vez, aumenta o influxo de cálcio pelos canais de cálcio (Ca^{2+}) e diminui a saída de potássio pelos canais de potássio (SAENZ DE TEJADA, 2000) (Figura 5).

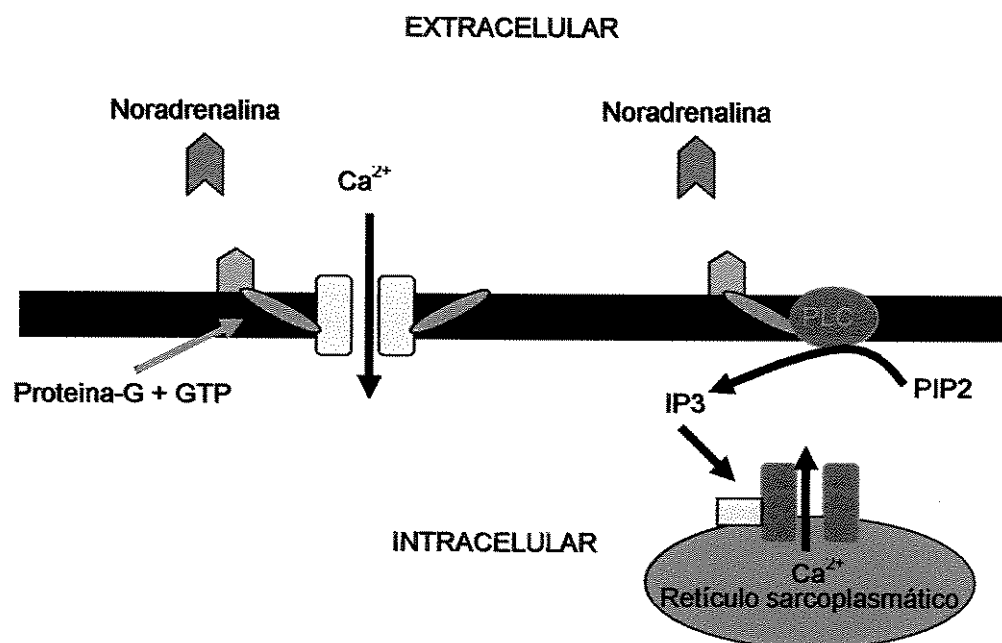


Figura 5- Mecanismo de ação da epinefrina na contração da musculatura lisa (JARDIN, et al., 2000).

- **Endotelinas**

As endotelinas são uma família de três peptídeos que foram descobertos em 1988 (YANAGISAWA et al., 1988), a saber: endotelina 1 (ET1), endotelina 2 (ET2) e endotelina 3 (ET3). Elas foram demonstradas em corpo cavernoso humano e acredita-se na contribuição destes peptídeos na manutenção do tônus da musculatura lisa dos corpos cavernosos (ANDERSSON e WAGNER, 1995).

ET1 é um potente vasoconstritor sintetizado pelo endotélio lacunar e, possivelmente, pela musculatura lisa trabecular (HOLMQUIST, et al., 1990b; SAENZ DE TEJADA, 1991).

A endotelina 1 é um constritor mais potente que as endotelinas 2 e 3 (SAENZ DE TEJADA, 1991).

Dois tipos de receptores, ET_A e ET_B, são responsáveis pela ação das endotelinas na musculatura lisa. O receptor ET_A é o principal mediador das endotelinas, contraindo a musculatura lisa, e o receptor ET_B está presente principalmente no endotélio, mediando uma resposta vasodilatadora endotélio-dependente (ARI et al., 1996).

Também foi demonstrado que a endotelina 1 potencializa os efeitos vasoconstritores da noradrenalina (GONDRE e CHRIST, 1998).

O mecanismo de transdução intracelular para ambos os receptores faz - se através da ativação da fosfolipase C mediada por uma proteína G, levando à hidrólise do fosfatidilinositol e formação de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), com liberação de cálcio do interior do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma e também através da ativação da proteína quinase C (PKC) (HOLMQUIST et al., 1990b; HOLMQUIST et al., 1992a) (Figura 6).

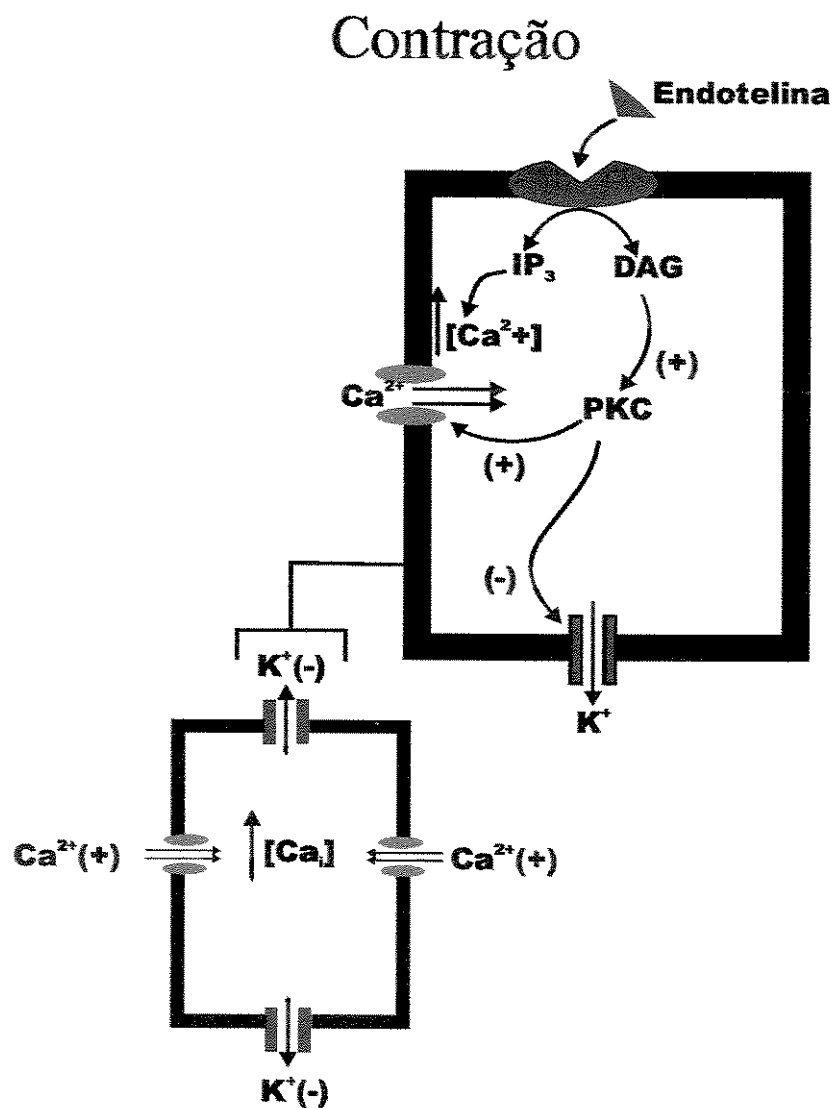


Figura 6- Mecanismo de contração da musculatura lisa do corpo cavernoso induzido por endotelina (JARDIN, et al., 2000).

- **Angiotensina**

O sistema renina angiotensina é de extrema importância na regulação da pressão arterial a longo e curto prazo. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação arterial renal pelas células justaglomerulares granulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes, à medida que entram nos glomérulos (CALDWELL et al., 1976). Fatores que reduzem a pressão arterial, como as reduções no volume sanguíneo (dieta hipossódica, diuréticos, perda sanguínea, insuficiência cardíaca congestiva, etc.) ou reduções na resistência periférica total (por exemplo, uso de vasodilatadores), ativam a liberação de renina (JACKSON e GARRISON, 1996).

A renina atua sobre o angiotensinogênio para catalisar a formação do decapeptídeo angiotensina I (ERDOS et al., 1990). Este decapeptídeo é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma cinase II, produzindo o octapeptídeo angiotensina II (IKEMOTO et al., 1990; JACKSON e GARRISON, 1996).

Os efeitos da angiotensina II são exercidos através de receptores específicos na superfície celular. Existem dois subtipos de receptores da angiotensina, AT1 e AT2, que já foram clonados e caracterizados farmacologicamente (MURPHY et al., 1991), mas existem outros dois receptores não totalmente caracterizados, do ponto de vista farmacológico: AT3 e AT4 (CHAKI e INAGAMI, 1992; SWANSON et al., 1992).

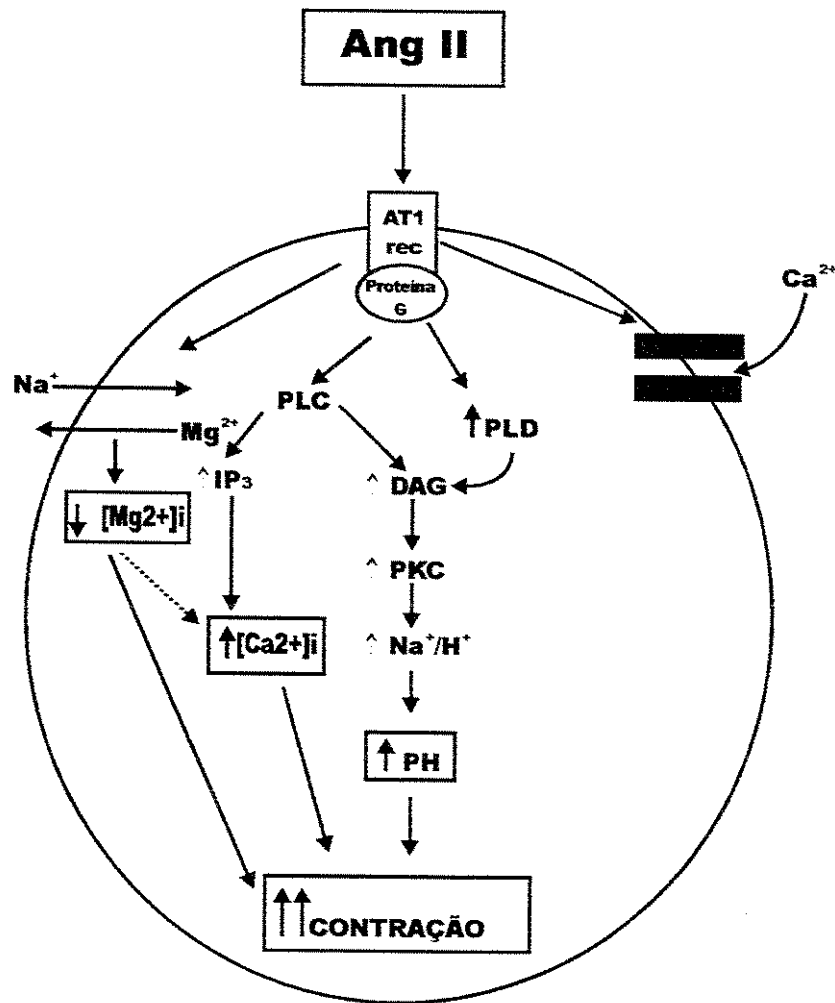
Até o momento, todos os efeitos farmacológicos da angiotensina II parecem ser mediados pelo receptor AT1, não tendo sido definido o papel funcional do AT2.

Os receptores AT1, quando ativados pela angiotensina II, levam à ativação da fosfolipase C, mediada por uma proteína G. A fosfolipase C, por sua vez, hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para gerar o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se a receptores nos canais que liberam Ca^{2+} nos seus depósitos intracelulares (retículo sarcoplasmático), liberando o íon no sarcoplasma. O diacilglicerol ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, também ativa o sistema de troca Na^+/H^+ . Todos estes eventos resultam no aumento do cálcio iônico intracelular estimulando a interação actina-miosina e a contração da musculatura lisa (BERRY et al., 2001) (Figura 7).

O corpo cavernoso humano produz e secreta quantidade relevante de angiotensina II. A Injeção intracavernosa de angiotensina II promoveu a contração da musculatura lisa e inibiu as ereções em cães anestesiados. Contudo, a administração de losartan (antagonista do receptor AT1), resulta no relaxamento da musculatura lisa e ereção peniana (KIFOR et al., 1997).

BECKER et al. (2001a) demonstraram que os níveis plasmáticos de angiotensina II em corpo cavernoso de humanos aumentaram de $21,8 \pm 4,6$ pg/ml no estado de flacidez para $27,9 \pm 10$ pg/ml no estado de detumescência. No plasma periférico, os níveis de angiotensina II foram de $17,2 \pm 6,2$ pg/ml para $19,5 \pm 6,5$ pg/ml nos estágios penianos respectivos.

Assim, os níveis de angiotensina II no sangue cavernoso foram 30% maiores que no sangue periférico retirados da veia cubital, sugerindo um papel importante da angiotensina na contração da musculatura lisa do corpo cavernoso (MLCC), durante o período de detumescência peniana (BECKER et al. 2001b).



ANG II: Angiotensina II - AT₁REC: Receptor de Angiotensina - PLD: Fosfolipase D

PLC: Fosfolipase C - DAG: Diacilglicerol - PKC: Proteína Quinase C

IP₃: Inositol Trifosfato (TOUZ e SCHIFFRIN, 2000).

Figura 7- Mecanismo de ação da angiotensina II na contração da musculatura lisa.

• RhoA/Rho-kinase

Mais recentemente, há evidências de que a contração vascular induzida pela noradrenalina e ET-1, na circulação cavernosa, é parcialmente mediada pela via RhoA/Rho-quinase, como em outros leitos vasculares (UEHATA et al., 1997; MILLS et al., 2001).

A via de sinalização da RhoA/Rho-quinase tem um papel importante na contração da musculatura lisa.

A RhoA é uma proteína G de baixo peso molecular que cicla entre o GTP-ativo e o GDP-inativo (SOMLYO e SOMLYO, 1998, 2000).

A Rho-quinase é uma quinase que promove a fosforilação da miosina através da inibição da fosfatase da miosina de cadeia leve da musculatura lisa (MCL-P). A RhoA ativa a Rho-quinase que inibe a MCL-P, favorecendo a permanência da miosina de cadeia leve (MCL) na forma fosforilada que, por sua vez, aumenta a sensibilidade da musculatura lisa ao cálcio e, conseqüente, contração muscular (SAH et al., 2000; AMANO et al., 2000).

Desta forma, há uma menor de-fosforilação dos filamentos de miosina, preservando o tônus muscular (KIMURA et al., 1996; AMANO et al., 2000).

A modulação da atividade da MCL-P é um mecanismo de controle da fosforilação da MCL, independente de Ca^{2+} , constituindo uma via adicional em promover a contração da célula muscular lisa.

Estudos mais recentes demonstraram que a via da Rho-quinase atua como mediador do tônus contrátil da musculatura lisa induzida por vários agonistas como a fenilefrina, serotonina, ET-1 e histamina em vários leitos vasculares, incluindo a circulação cavernosa (CHITALEY et al., 2001; WEBER e WEBB et al., 2001).

Estes achados foram demonstrados através de experimentos em ratos tratados com ET-1 ou agonistas alfa-adrenérgico, em que os autores observaram um bloqueio no aumento da pressão IC induzida por estímulo elétrico do nervo pélvico.

Contudo, este bloqueio era ineficaz quando os animais recebiam previamente um inibidor seletivo da Rho-quinase (Y-27632), demonstrando que a contração vascular induzida pela norepinefrina e ET-1 depende da ativação da Rho-quinase na circulação cavernosa (MILLS et al., 2001).

Estes achados reforçam a importância da Rho-quinase na contração da musculatura lisa do tecido cavernoso e sugere que a inibição desta via pode ser o suficiente para induzir uma ereção peniana.

CHITALEY et al. (2001), demonstrou que a injeção IC de Y-27632 em ratos, *in vivo*, promove o aumento na pressão intracavernosa do tipo dose-dependente. Um outro achado importante é que este aumento permanece, mesmo quando os animais são tratados com inibidores da síntese de óxido nítrico ou da guanilato ciclase. Além disso, o tratamento dos animais com Y-27632 potencializa a resposta erétil induzida por estímulo elétrico do nervo pélvico (CHITALEY et al., 2001).

Desta forma, conclui-se que a Rho-quinase é importante na manutenção da contração da MLCC e o bloqueio desta via é suficiente para induzir uma resposta erétil, independente de óxido nítrico.

Recentemente acredita-se que a contração fásica da musculatura lisa peniana seja controlada pelo aumento na concentração intracelular de Ca^{+2} e que a contração tônica seja governada pela via de maior sensibilização ao Ca^{+2} (CELLEK et al., 2002).

Atualmente, muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos para analisar o potencial terapêutico do uso de inibidores de Rho-quinase no tratamento dos pacientes com disfunção erétil.

A via da RhoA/Rho-quinase controla o tônus da musculatura lisa em vários tecidos, incluindo o corpo cavernoso. A inibição da Rho-quinase induz ao relaxamento dos vasos sanguíneos e da musculatura lisa respiratória (UEHATA et al., 1997; HIRSHMAN e EMALA, 1999).

Assim, o tratamento *in vivo* com Y-27632 promove uma alteração na função respiratória, pressão sanguínea e na musculatura lisa gastrintestinal (ISHIZAKI, 2000). Entretanto, a injeção IC de Y-27632 não afeta a pressão arterial média nas doses suficientes para induzir a ereção peniana em ratos (CHITALEY et al., 2001).

Contudo, será necessário o desenvolvimento de inibidores de Rho-quinase específicos do tecido erétil para reduzir os eventos adversos sistêmicos induzidos por estes medicamentos e aumentar a sua eficácia no tratamento dos pacientes com disfunção erétil.

1.3.2- Transmissores/moduladores do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso

- **AcetilColina (ACh)**

A acetilcolina é o produto da acetilação da colina com a acetil coenzima A catalisado pela enzima acetiltransferase.

A localização imunocitoquímica desta enzima é de muito valor na identificação de axônios colinérgicos (BROWN e TAYLOR, 1996).

A degradação da acetilcolina faz-se através da ação da acetilcolinesterase (TAYLOR, 1996). O corpo cavernoso humano e de vários animais é rico em nervos contendo acetilcolinesterase (ANDERSSON e WAGNER, 1995).

Existem basicamente dois tipos de receptores para a acetilcolina: os nicotínicos e os muscarínicos.

Os receptores nicotínicos estão ligados a canais iônicos e sua ativação causa um aumento rápido da permeabilidade de sódio e cálcio. Os receptores muscarínicos pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G (BROWN e TAYLOR, 1996). Cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) foram detectados através de clonagem, sendo que quatro subtipos foram identificados em corpo cavernoso humano. O receptor na musculatura lisa seria o M2 e no endotélio o M3 (TRAISH et al., 1995b).

COSTA et al. (1993) calcularam que o número de sítios que se ligavam a acetilcolina na musculatura lisa do corpo cavernoso era de 45.000, 15 vezes menor que o número de receptores alfa-adrenérgicos. Nestas células, o carbacol (agonista muscarínico com pouca susceptibilidade a acetilcolinesterase) produz contração. Isso significa que o

relaxamento induzido pela acetilcolina na musculatura lisa se faz indiretamente, ou inibindo a liberação de um fator de constrição (noradrenalina, por exemplo) e / ou através da liberação de um fator de relaxamento (óxido nítrico, por exemplo).

TRIGO ROCHA et al. (1993a), estudando a neurofarmacologia da ereção em cães anestesiados, observaram que injeção IC de atropina reduzia a pressão intracavernosa. Entretanto, a injeção de acetilcolina no interior dos corpos cavernosos aumenta a pressão intracavernosa, quando comparada àquela após estimulação elétrica dos nervos pélvicos. Estes dois achados demonstraram um efeito relaxante da acetilcolina. Quando ela era administrada após o uso de (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfato) CHAPS, um detergente que destrói o endotélio vascular e lacunar, não se observava aumento da pressão intracavernosa, comprovando assim, que a ação da acetilcolina é dependente da integridade do endotélio.

O fato de que ocorre ereção após estimulação do nervo pélvico, mesmo após a destruição do endotélio por CHAPS, implica que a liberação de neurotransmissores responsáveis pela ereção é apenas parcialmente endotélio-dependente e que os terminais nervosos e a musculatura também podem liberar neurotransmissores.

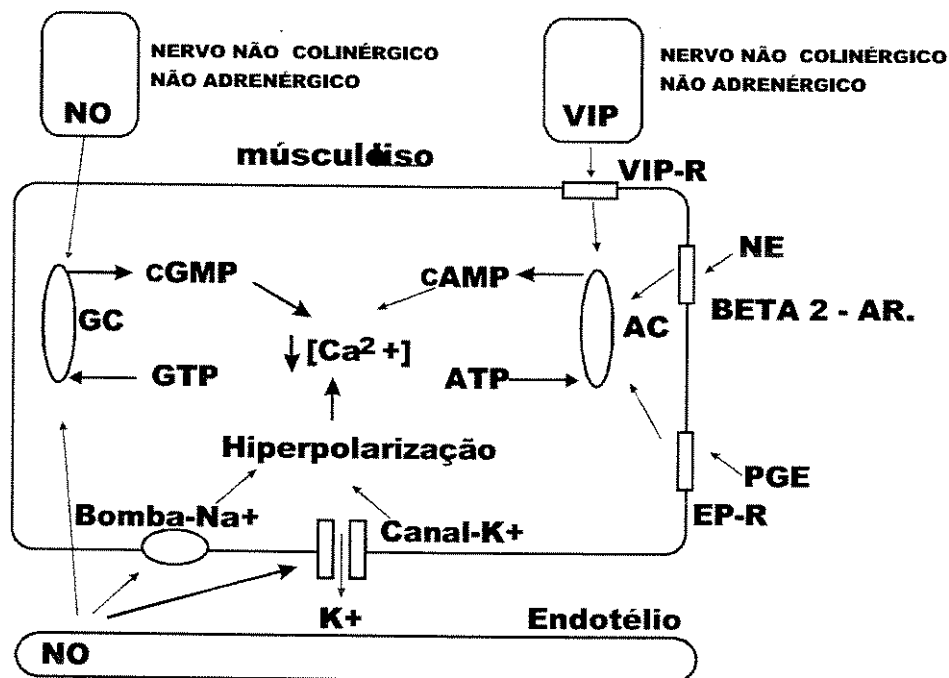
Contudo, a resposta erétil apenas parcial após injeção intracavernosa (IC) de acetilcolina bem como o bloqueio parcial da ereção pela atropina sugeria um papel importante para outro neurotransmissor e/ou outro tipo de fibra nervosa (CARATI et al., 1987; STIEF et al., 1989). Outra possibilidade é que a atividade parassimpática não necessariamente se resume à ação da acetilcolina. Outros transmissores podem ser liberados de nervos colinérgicos (LUNDBERG, 1996). Assim, a atividade parassimpática pode causar tumescência ou ereção, inibindo a liberação de noradrenalina através da estimulação de receptores muscarínicos em terminais nervosos adrenérgicos (KLINGE e SJOSTRAND, 1977) ou pela liberação de óxido nítrico e peptídeos vasodilatadores de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos e do endotélio (ANDERSSON e WAGNER, 1995).

- Peptídeo vasoativo intestinal (VIP)

Uma vez definido que a acetilcolina, isoladamente, não preenchia os requisitos de mediador químico da ereção, outros possíveis neurotransmissores foram propostos. O pênis humano apresenta nervos contendo VIP, de acordo com estudos imunohistoquímicos (CROWE et al., 1983). A maioria destes nervos também apresentam imunorreatividade para NOS. Parece que estes nervos que apresentam NOS e VIP são colinérgicos, visto que também contêm VACHT (*vesicular acetylcholine transporter*), que é um marcador específico para neurônios colinérgicos (HEDLUND et al., 1999).

O VIP tem dois tipos de receptores (1 e 2) que estão ligados a uma proteína G na membrana plasmática acoplada a adenilato ciclase (MCDONALD et al., 1998).

Portanto, o mecanismo de ação do VIP faz-se através da estimulação de adenilato ciclase, produzindo a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente do AMPc (PKA) (HEDLUND et al., 1995 (Figura 8).



GC: Guanilato ciclase GTP: Guanina trifosfato GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

AMPc: Adenosina monofosfato cíclica ATP: Adenosina trifosfato AC: Adenilato ciclase

VIP: Peptídeo vasoativo intestinal VIP-R: Receptor de VIP NE: Norepinefrina

PGE: Prostaglandina E GPR: Receptor de prostaglandina E

Figura 8- Mecanismo de ação do polipeptídeo vasoativo intestinal no relaxamento da musculatura lisa (JARDIN et al., 2000).

O VIP, quando administrado a segmentos de corpo cavernoso humano, produz relaxamento. Quando administrado no interior do corpo cavernoso de homens potentes, não produz ereção (ANDERSSON, 2001b). KIELY et al., (1989) injetaram VIP, papaverina e uma associação destas drogas com a fentolamina no interior do corpo cavernoso de 12 homens impotentes e observaram que o VIP, isoladamente, não produziu ereção. Mas, quando associado com a papaverina, produziu rigidez peniana semelhante àquela da associação de papaverina e fentolamina.

É inegável que o VIP tem uma ação relaxante na musculatura lisa peniana *in vitro*, no entanto, a capacidade do VIP de promover ereções apenas parciais bem como a habilidade dos anticorpos anti-VIP de bloquear a resposta erétil induzida por estímulo elétrico, em apenas uma parte dos animais, tornou seu papel como neurotransmissor questionável e ainda não esclarecido (ANDERSSON, 2000).

- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Posteriormente, em virtude da presença do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) nas terminações nervosas das artérias e da MLCC peniano foi aventado um possível papel de neurotransmissor para esta substância. O CGRP é um peptídeo com 37 aminoácidos e é conhecido como um potente vasodilatador em uma variedade de vasos sanguíneos, nos quais acredita-se produzir um relaxamento da musculatura lisa endotélio-dependente (CROSSMAN et al., 1987; ALMEGARD e ANDERSSON, 1993).

STIEF et al. (1990, 1991) demonstraram a presença do peptídeo gene-relacionado da calcitonina em nervos de corpo cavernoso humano e, quando injetado por via IC, aumenta o fluxo das artérias penianas e provoca um relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos. Contudo, a capacidade desta de produzir ereções apenas parciais em animais e seres humanos tornaram remota a possibilidade do CGRP ter um papel de neurotransmissor da ereção peniana.

- Adrenomedulina

Adrenomedulina é um peptídeo vasodilatador isolado de células de feocromocitoma humano. Consiste de 52 aminoácidos e tem similaridades estruturais com o PGRC. Atribui-se que a adrenomedulina tenha um papel regulador da pressão arterial sistêmica (KITAMURA et al., 1993).

CHAMPION et al. (1997) relataram que adrenomedulina injetada no interior de corpos cavernosos de gatos aumentou a pressão intracavernosa e o comprimento peniano. Mesmo assim, não sabemos ainda o papel deste peptídeo na fisiologia da ereção.

- Prostanóides

A injeção IC de prostaglandina E1 (PGE_1) induz a ereção peniana em animais e seres humanos e tem sido descrita como possível modulador da ereção peniana. O corpo cavernoso humano tem a habilidade de sintetizar vários prostanóides (MINHAS et al., 2000).

Os metabólitos da ciclooxygenase a prostaglandina D2 (PGD_2) Prostaglandina E2 (PGE_2), Prostaglandina F2alfa ($\text{PGF}_{2\text{ALFA}}$), Prostaciclina (PGI_2), e tromboxano A₂ agem através de cinco grupos de receptores que mediam seus efeitos, a saber, receptor DP, EP, FP, IP e TP, respectivamente (MORELAND et al., 1999). Estes receptores estão acoplados à proteína G com diferentes sistemas de transdução (COLEMAN et al., 1994; PIERCE et al., 1995; NARUMIYA et al., 1999).

Com relação aos receptores de prostaglandina E, existem quatro subtipos (EP1, EP2, EP3 e EP4) baseados em informações fisiológicas e de clonagem molecular (COLEMAN et al., 1994; TOH et al., 1995).

Os prostanóides $\text{PGF}_{2\text{alfa}}$, tromboxano A₂ e PGI_2 contraem a musculatura lisa do corpo cavernoso, assim como as prostaglandinas PGE_1 e PGE_2 relaxam a musculatura lisa, estimulando receptores EP2 e EP4 (PORST, 1996).

A prostaglandina E1, ligando-se aos seus receptores EP2 e EP4, estimula adenilato ciclase, que catalisa a formação do AMPc. Este estimula a proteína quinase A (PKA) e, em menor escala, a proteína quinase G (PKG). A PKA, por sua vez, estimula os canais de potássio ativados por cálcio, resultando em hiperpolarização da membrana plasmática. Com isso, ocorre uma diminuição do fluxo de cálcio através dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependente, resultando em relaxamento da musculatura lisa (LEE et al., 1999a). A PKG, especificamente a cGKI, fosforila a fosfolamban, uma proteína que normalmente inibe a bomba de Ca^{2+} dentro da membrana do retículo sarcoplasmático.

A bomba de Ca^{2+} é então ativada e, conseqüentemente, mobiliza o cálcio do sarcoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático.

O nível de cálcio citoplasmático diminui, trazendo relaxamento da musculatura lisa.

As proteínas quinases também ativam as bombas de cálcio na membrana plasmática, aumentando o efluxo de cálcio para fora da célula (SOMLYO e SOMLYO, 1994; KARAKI et al., 1997) (Figura 9).

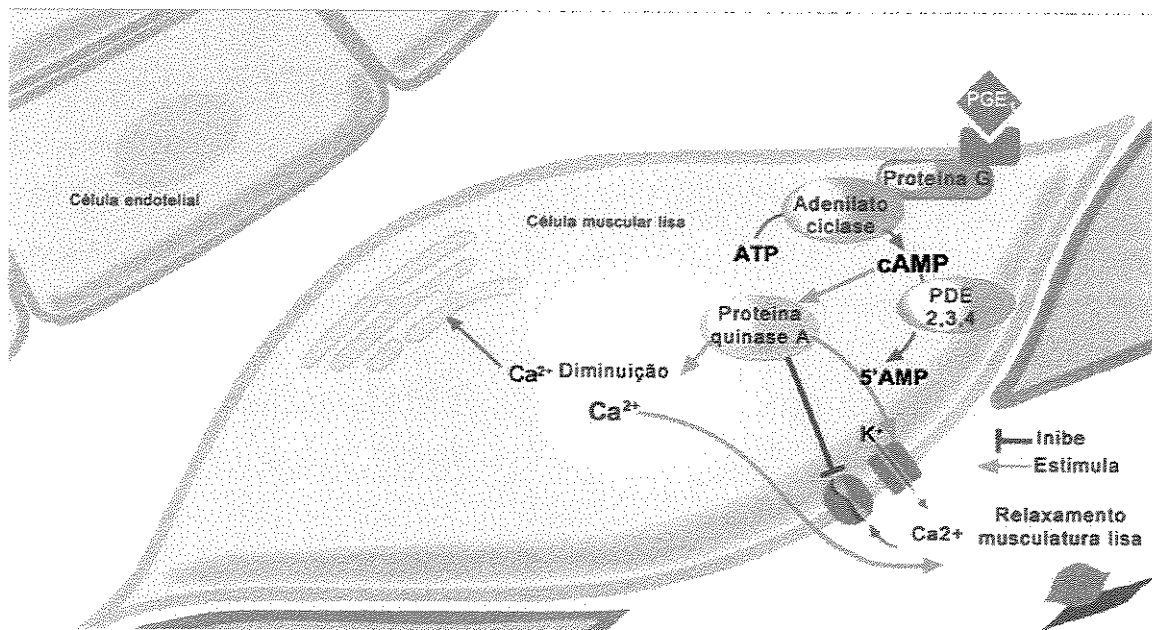


Figura 9- Mecanismo de ação da prostaglandina no relaxamento da musculatura lisa. (LUE, T.F, 2000).

Segundo MOLDERINGS et al., (1992), a noradrenalina liberada no interior dos corpos cavernosos de humanos é modulada por receptores pré- sinápticos para prostaglandina E₁ e E₂. Em estudos com corpo cavernoso de coelhos *in vitro*, ITALIANO et al., (1994) verificaram que a PGE₁ possui efeitos antiadrenérgicos através da inibição da liberação de noradrenalina.

Portanto, a PGE₁ exerce seus efeitos de relaxamento da musculatura lisa não somente através do efeito direto via AMPc, mas também inibe o sistema simpático.

Embora a injeção IC de PGE₁ induza a ereções satisfatórias, os seus bloqueadores de síntese não inibem a ereção eletro-induzida, atribuindo-se um papel secundário dos prostanoídes como neurotransmissores.

- Óxido Nítrico (NO)

O papel fisiológico do NO na ereção peniana foi descoberto através de experimentos em tecidos cavernosos isolados de animais e seres humanos.

A observação de que o bloqueio de receptores muscarínicos não inibe (KLINGE e SJOSTRAND, 1977; ANDERSSON et al., 1983a,b; DAIL et al., 1987; HOLMQUIST et al., 1992b) ou inibe pouco (SAENZ DE TEJADA et al., 1988) os relaxamentos induzidos por estimulação elétrica foi determinante na pesquisa de novos neurotransmissores na ereção peniana. O fato do bloqueio de receptores muscarínicos não afetar os relaxamentos induzidos por estimulação elétrica em corpo cavernoso aliado à observação de que a ACh endógena não é fator majoritário na geração de NO em tecido erétil (HOLMQUIST et al., 1992b), levou à conclusão de que o NO proveniente das terminações NANC é o principal mediador neuronal da ereção peniana (SJOSTRAND e KLINGE, 1979; ANDERSSON e WAGNER, 1995).

Além disso, a observação de que a atropina não apresenta efeito nas ereções provocadas por estímulo visual ou por vibração local (WAGNER, 1981) favoreceu a hipótese da existência de um mediador NANC para o processo de ereção peniana. Estes achados, somados à semelhança entre o tecido cavernoso, composto por endotélio revestido por músculo liso e a estrutura dos vasos sanguíneos, foram determinantes na conclusão de que o óxido nítrico é o principal neurotransmissor responsável pelo relaxamento da musculatura lisa intracavernosa e ereção peniana.

Em 1980, FURCHGOTT e ZAWADSKI evidenciaram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era dependente da presença de endotélio vascular íntegro e que as células endoteliais produzem uma substância responsável pela resposta inibitória através da ativação de receptores M₂. Esta substância foi denominada como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) e,

posteriormente, identificado como NO (PALMER et al., 1987; IGNARRO et al., 1987). Subseqüentemente, o EDRF foi comprovado em outras preparações vasculares como veias e artérias, também verificando-se que este fator era liberado em resposta a várias substâncias, como por exemplo nucleotídeos de adenina, trombina, substância p e bradicinina. Outros estímulos, tais como hipóxia, aumento de fluxo e estimulação elétrica, também causam relaxamento vascular endotélio-dependente *in vitro*. Outros agentes, no entanto, tais como nitrovasodilatadores, fator natriurético atrial, agonistas beta-adrenérgicos e prostaciclina induzem relaxamento vascular por um mecanismo endotélio-independente (MONCADA et al., 1991).

Assim, vários estudos foram realizados para caracterizar o fator de relaxamento endotélio-dependente.

FURCHGOTT em 1988 sugeriu que o NO poderia ser o EDRF (MONCADA et al., 1991). Estes achados também foram compartilhados por IGNARRO et al. (1988).

Estudos subseqüentes revelaram que o EDRF era química e farmacologicamente indistinguível do NO em tecido vascular (IGNARRO et al., 1987, PALMER et al., 1987, MONCADA et al., 1988) e em plaquetas (RADOMSKI et al., 1987, MONCADA et al., 1988)

Assim, admite-se que o EDRF seja o NO ou então uma substância estritamente relacionada ao NO (SAENZ DE TEJADA, 2000).

O óxido nítrico é um radical livre (a molécula tem um elétron em excesso) altamente reativo e quimicamente instável (SAENZ DE TEJADA, 2000). É sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da ação enzimática do óxido nítrico sintase, produzindo quantidades equimolares de NO e citrulina (BUSH et al., 1992, IGNARRO e MURAD, 1995).

A primeira demonstração de que a ereção peniana era mediada pelo óxido nítrico liberado de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos foi publicada em 1990 (IGNARRO et al., 1990). Estes pesquisadores estimularam eletricamente segmentos de corpo

cavernoso de coelhos na presença de guanetidina (bloqueador adrenérgico) e atropina (bloqueador de receptores muscarínicos).

O relaxamento do corpo cavernoso de coelho induzido por estímulo elétrico aumentou os níveis de nitritos e GMP_c . Inferiu-se que este aumento devia-se à síntese de óxido nítrico que estimulava guanilato ciclase (Figura 10).

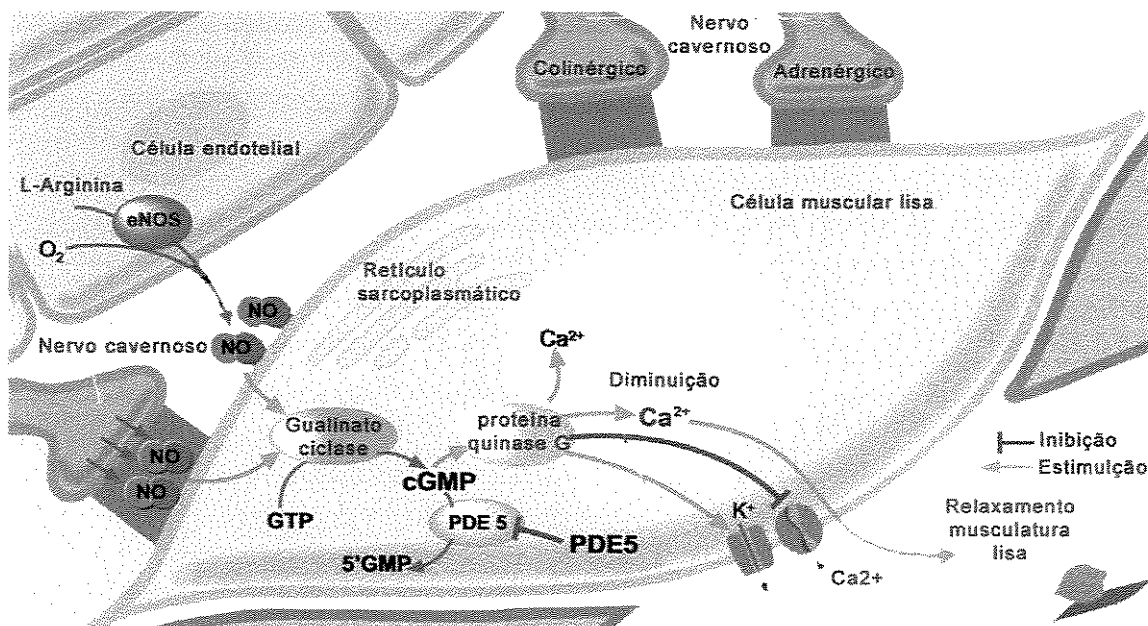


Figura 10- Mecanismo de relaxamento da musculatura lisa cavernosa induzida pela liberação de NO dos nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos e endotélio (LUE, T. F., 2000).

Nesse mesmo trabalho, observou-se que havia um bloqueio do relaxamento da musculatura do corpo cavernoso na presença de inibidores do óxido-nítrico-sintase, N^G -nitro-L-arginina (L-NOARG) ou N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e que este bloqueio era revertido por um excesso de L-arginina (substrato do NO), provando que a atividade da NOS era necessária em todo este processo de relaxamento da musculatura lisa. Observou-se também que havia inibição do relaxamento da musculatura na presença de oxi-hemoglobina (consumidor de NO) ou azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase). Demonstrou-se ainda a independência da via da ciclooxigenase e seus produtos, devido ao bloqueio desta enzima pela indometacina.

PICKARD et al., (1991), usando corpo cavernoso humano obtido de pacientes submetidos a cirurgias penianas, observaram que o relaxamento da musculatura lisa tratada com guanetidina, evocado por estímulo elétrico, era resistente à infusão de atropina e sensível à tetrodotoxina (bloqueador de canais de sódio), indicando que a origem deste relaxamento provinha do estímulo de um nervo não-adrenérgico e não-colinérgico. Demonstrou também que este relaxamento era atenuado, dose-dependente, por inibidores da óxido nítrico sintase, L-NOARG, mas não pela D-nitro arginina. O efeito inibitório da L-NOARG foi antagonizado pela L-arginina, mas não pela D-arginina. A infusão de azul de metileno causou uma inibição/concentração dependente do relaxamento da musculatura lisa induzido por estímulo elétrico, concluindo que o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano é mediado pelo óxido nítrico ou por uma substância relacionada com o NO (PICKARD et al., 1991).

Atualmente, sabe-se que o NO é o único mediador, dependente do endotélio, responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano. Ao passo que, o relaxamento das artérias penianas depende do NO e da ativação do mecanismo que não envolve a síntese de NO ou a atividade da ciclooxygenase. Este processo é mediado por canais de potássio ativados por cálcio e é atribuído ao fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, ANGULO et al., 2003).

- Isoformas de Óxido Nítrico Sintase (NOS)

Óxido nítrico sintase é a enzima que caracteriza a produção de óxido nítrico a partir da L-Arginina. São conhecidas duas categorias de NOS: enzimas constitutivas, reguladas por íons cálcio e calmodulina e, enzimas induzidas, ligadas a calmodulina, porém independentes de cálcio. A NOS induzida (iNOS ou NOS II) é solúvel e sua expressão é induzida por citocinas e endotoxinas (RAJASEKARAN et al., 1998). Existem dois tipos de NOS constitutiva: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).

A nNOS, também chamada de NOS I, é solúvel e, portanto, está no citoplasma, e principalmente nos nervos periféricos, centrais e em ilhotas pancreáticas (ELIASSON et al., 1997). A eNOS, também chamada NOS III, é particulada, ou seja, está presente na

membrana plasmática da célula, principalmente em células endoteliais e células epiteliais renais (FORSTERMANN et al., 1989; BREDT e SNYDER, 1990; MITCHELL et al., 1991; POLLOCK et al., 1991).

Tanto o endotélio quanto as terminações nervosas no corpo cavernoso podem produzir NO (BURNETT et al., 1993). Desta forma, a eNOS e a nNOS estão envolvidas no mecanismo da ereção.

O papel da nNOS em mediar a ereção peniana esta bem estabelecido, visto que, camundongos geneticamente tratados sem nNOS apresentam ereções, são férteis e respondem com aumento da pressão intracavernosa à eletroestimulação de nervos cavernosos (BURNETT et al., 1996).

Isto porque, estes animais apresentam uma produção intacta de NO neurogênico, através de uma variante de nNOS no pênis (GONZALES-CADAVID et al., 2000).

A eNOS também é essencial para a ereção peniana, não somente em ratos que não apresentam a nNOS, mas também em ratos normais. Isto porque, o NO derivado do endotélio, sintetizado pela eNOS, representa uma fonte importante no relaxamento da MLCC e está presente no endotélio sinusoidal e no endotélio dos vasos sanguíneos dos corpos cavernosos.

Os principais argumentos que fortalecem a hipótese do envolvimento do NO derivado do endotélio na função erétil são: Primeiro, a ACh liberada do nervo colinérgico pós-ganglionar evoca a liberação de NO do endotélio. De fato, a administração de ACh exógena produz um relaxamento endotélio dependente no corpo cavernoso e artérias penianas (AZADZOI et al., 1992). Entretanto, a atropina e a neostigmina não inibe a ereção peniana induzida por estímulo do nervo cavernoso (BURNETT et al., 1992). Desta forma, o relaxamento neurogênico do copo cavernoso não requer um endotélio funcionante (KIM et al., 1991; OKAMURA et al., 1999). Segundo, pode haver uma ativação da eNOS pelo *shear stress* (RESS et al., 1989).

Ou seja, durante a ereção a expansão do lumen vascular e sinusoidal leva a ativação da proteína quinase Akt (PKB) e subsequente fosforilação e ativação do eNOS facilitando a liberação de NO pelo endotélio (HURT et al., 2002).

Finalmente, substâncias no plasma como a bradicinina e o oxigênio ativam a produção de NO pelo endotélio através da entrada de sangue oxigenado no corpo cavernoso (SAENS DE TEJADA, 2004). Assim, atualmente acredita-se que, o NO derivado da nNOS do nervo nitrérgico é responsável pela iniciação e maior parte do relaxamento da MLCC, ao passo que, o NO derivado do eNOS contribui para a manutenção da ereção (SAENS DE TEJADA, 2004).

Na análise de frações subcelulares de células endoteliais em cultura, verificou-se que 95% da atividade enzimática da NOS estava diretamente correlacionada à fração particulada da enzima (fração ligada à membrana), contra apenas 5% de atividade na fração citosólica (FORSTERMANN et al., 1991a). Para a sua atividade, a eNOS requer cálcio/calmodulina, NADPH e 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) (FORSTERMANN et al., 1991b).

Um outro achado importante é que a atividade da nNOS, no pênis, parece ser controlada por andrógenos. A castração de ratos adultos e o tratamento com o antiandrógeno, flutamida, reduzem a atividade da NOS constitutiva peniana e a resposta erétil ao estímulo do nervo cavernoso (CHAMNESS et al., 1995; LUGG et al., 1996; PENSON et al., 1996).

A idade também parece diminuir a atividade da NOS. Ratos jovens apresentam uma expressão maior de RNAm e de NOS quando comparados com ratos idosos (GARBAN et al., 1995; CARRIER et al., 1997; DAHYIA et al., 1997).

- Sinalização intracelular mediada pelo NO

O NO ativa a guanilato ciclase (GCs) por ligar-se diretamente com o grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) pela GCs (RAPOPORT e MURAD, 1983; LUCAS et al., 2000). São propostos vários mecanismos

para explicar a atividade relaxante resultante de um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (WALDMAN e MURAD, 1987; LUCAS et al., 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3); (2) aumento do sequestro de Ca^{2+} citosólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca^{2+} ; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana e (7) abertura de canais de K^+ .

- Guanilato ciclase

Guanilato ciclase compreende uma família de enzimas que catalisam a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMP_c). Existem dois tipos de isoformas, a enzima ligada à membrana plasmática (particulada) e a solúvel.

Elas são reguladas por diversos agonistas extracelulares que incluem hormônios peptídicos, toxinas bacterianas e radicais livres (NO, por exemplo), assim como moléculas intracelulares, tais como o cálcio e nucleotídeos da adenosina (LUCAS et al, 2000). Guanilato ciclase solúvel está em quase todas as células de mamíferos e media diversas funções fisiológicas, tais como inibição da agregação plaquetária, transdução do sinal neuronal, imunomodulação e relaxamento da musculatura lisa (COLLIER e VALLANCE, 1989). KIM et al. (1998) demonstraram a produção de GMP_c por guanilato ciclase particulada no corpo cavernoso de ratos e de coelhos estimulada por alguns tipos de peptídeos natriuréticos. Porém, guanilato ciclase solúvel é provavelmente o receptor mais importante para o NO.

- Guanosina monofosfato cíclico (GMP_c)

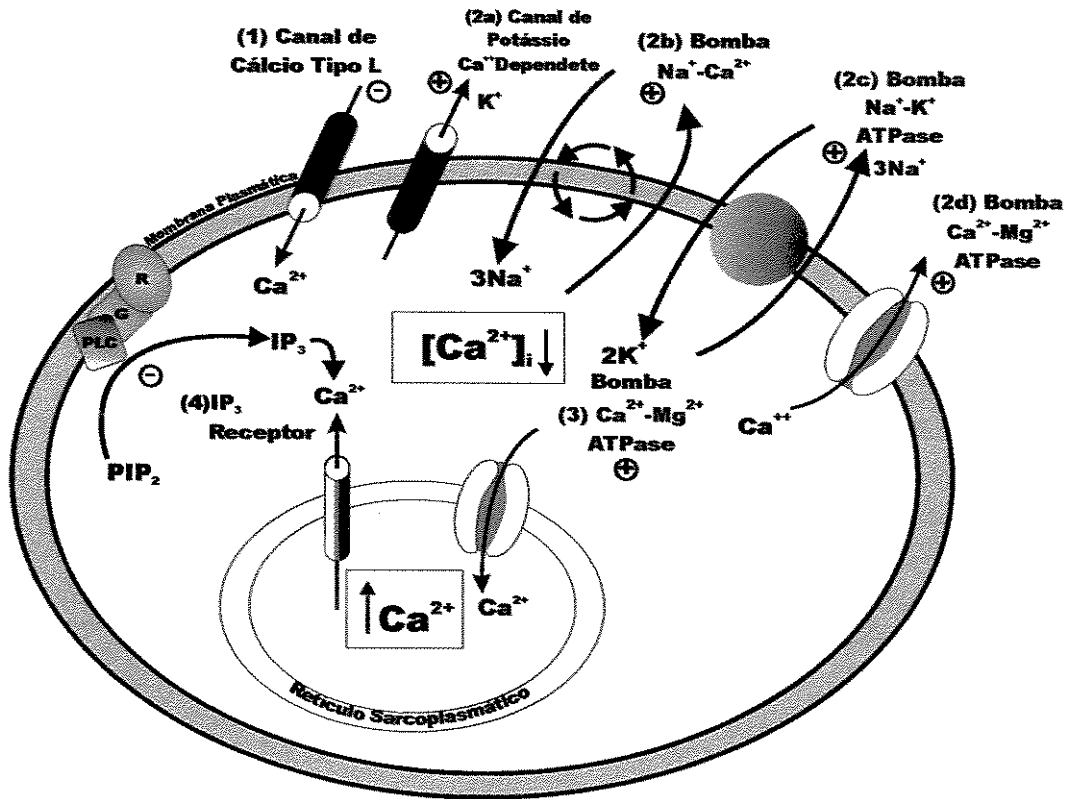
As respostas celulares de vários componentes endógenos e exógenos tais como autacóides, hormônios, neurotransmissores e algumas toxinas, são realizadas por guanosina monofosfato cíclico. O GMP_c é o produto da catalisação de guanilato ciclase sobre o GTP (LUCAS et al., 2000). O acúmulo de GMPc no interior da célula muscular lisa desencadeia uma série de eventos que resultam no relaxamento da musculatura. Três eventos principais devem ser considerados: a ação sobre os canais iônicos, a ação sobre as proteínas quinases e a

ação das fosfodiesterases na degradação do GMP_c (LUCAS et al., 2000). Dois tipos diferentes de proteínas quinases dependentes de GMP_c (cGK I e II) foram identificadas em mamíferos.

A inativação da cGK I em ratos aboliu o relaxamento pela via NO/GMP_c tanto da musculatura lisa vascular quanto da musculatura lisa intestinal, e também inibiu a agregação plaquetária, causando hipertensão e distúrbios da hemostasia (PFEIFER et al., 1998). A musculatura lisa peniana em ratos com deficiência de cGK I, não relaxa à liberação de NO neuronal, endotelial e/ou quando administrado exogenamente (HEDLUND et al., 2000a). Da mesma forma que, os camundongos geneticamente tratados sem cGK I não apresentam relaxamento da musculatura lisa cavernosa quando tratados com NO/GMP_c (HEDLUND et al., 2000a). Assim, conclui-se que a cGK I é o maior mediador do relaxamento da musculatura lisa pela via NO/GMP_c. Sua ausência não pode ser compensada pela cascata de eventos desencadeada pela adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) (ANDERSSON, 2001a). A cGK II está ausente do sistema cardiovascular e é abundante no cérebro e intestino (UHLER, 1993).

Atualmente, sugere-se que a cGK I age como um modulador do cálcio intracelular. Embora a cGK I seja considerada o principal mediador dos efeitos do GMP_c, outras moléculas devem ser levadas em consideração, entre elas, a proteína quinase A (PKA) (LUCAS et al., 2000). O GMP_c media o relaxamento da musculatura lisa diminuindo a concentração de cálcio no interior da célula por meio de quatro mecanismos principais: reduzindo o influxo de Ca^{2+} , aumentando o efluxo de Ca^{2+} , promovendo o sequestro de Ca^{2+} para o interior do retículo sarcoplasmático e diminuindo a mobilização de Ca^{2+} (LUCAS et al., 2000). O GMP_c reduz o cálcio intracelular através da inibição do influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio tipo L e também, indiretamente, pela hiperpolarização da superfície da musculatura lisa através dos canais de potássio (K^+). O GMP_c aumenta o efluxo de cálcio por meio da ativação da bomba de cálcio ATPase dependente e da bomba de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A hiperpolarização da membrana plasmática através da ativação da bomba Na^+/K^+ ATPase e de canais de K^+ , aumentam, ainda mais, o efluxo de cálcio para fora da célula pela bomba de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ocorre também o sequestro de cálcio pelo retículo sarcoplasmático por meio da ativação da bomba de cálcio ATPase presente na

membrana do retículo sarcoplasmático. Ainda assim, há uma diminuição na mobilização de cálcio através da inibição do receptor de inositol trifosfato (IP₃) na membrana do retículo sarcoplasmático (LUCAS et al., 2000) (Figura 11).



R : Receptor

G: Proteínas

PLC: Fosfolipase

IP₃: Inositol trifosfato

PIP₂: Fosfatidil inositol difosfato

Figura 11- Mecanismo de ação do GMP cíclico no relaxamento da musculatura lisa (LUCAS et al., 2000).

- Fosfodiesterases

As fosfodiesterases catalisam a hidrólise dos segundos mensageiros AMPc e GMPc que estão envolvidos no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso. A superfamília das fosfodiesterases pode ser subdividida em pelo menos 11 famílias. Mais de 40 isoformas foram identificadas até agora (ANDERSSON, 2001a).

No corpo cavernoso humano, pelo menos 13 isoenzimas foram identificadas. Fosfodiesterase 3 (PD3) e fosfodiesterase 5A (PD5A) parecem ser as mais importantes do ponto de vista funcional (BOOLELL et al., 1996; BALLARD et al., 1998; BIVALACQUA et al., 1999; KUTHE et al., 2000; 2001). LIN et al. (2000) demonstraram a presença de três isoformas da fosfodiesterase 5 em corpo cavernoso humano. Duas dessas isoformas já haviam sido isoladas de outros tecidos que não o pênis, a PDE5A1 e a PDE5A2. A terceira isoforma, chamada PDE5A3, fica confinada a tecidos com musculatura lisa ou músculo cardíaco.

1.4- Regulação do tônus dos corpos cavernosos

A modulação do tônus do músculo liso dos corpos cavernosos é um processo complexo que requer a integração de eventos intracelulares e sinais extracelulares. Entretanto, há várias evidências de que as junções transmembrânicas, canais de K^+ e canais de Ca^{2+} estão entre os maiores moduladores do tônus do músculo liso do tecido cavernoso (CHRIST et al., 1991,1993).

Adicionalmente, já é demonstrado que os neurotransmissores que participam nos processos de ereção e detumescência modulam o tônus deste tecido, em grande parte, através de seus efeitos sobre canais transmembrânicos, canais de K^+ e canais de Ca^{2+} demonstrados nas células do músculo liso do corpo cavernoso (CHRIST et al., 1991,1993)

- Canais iônicos

Enquanto as vias envolvidas na fosforilação e desfosforilação da miosina que são fundamentais para o tônus da musculatura lisa ainda não estão devidamente elucidadas, sabe-se que os níveis intracelulares de Ca^{2+} bem como canais iônicos exercem papel essencial no controle do tônus do tecido muscular liso cavernoso. Várias classes de canais iônicos já foram identificadas no músculo liso dos corpos cavernosos, incluindo os canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), assim como, os canais de Ca^{2+} tipo L e Na^+/K^+ ATPase.

- Canais de Ca^{2+}

A remoção do Ca^{2+} do meio extracelular abole a atividade contrátil espontânea e reduz as contrações evocadas pela estimulação de receptores alfa-adrenérgicos e são dependentes de Ca^{2+} dos meios intra e extracelular (FOVAEUS et al., 1987; CHRIST et al., 1989, 1991).

Bloqueadores de canais de Ca^{2+} tipo-L, como a nifedipina e o diltiazem, suprimem completamente as contrações induzidas por altas concentrações de K^+ e reduzem as contrações evocadas pela noradrenalina (FOVAEUAS et al., 1987).

- Canais de potássio (K^+)

Presume-se que as drogas que atuam nos canais de K^+ possam afetar o relaxamento e a contração da musculatura lisa do corpo cavernoso. Vários tipos de canais de K^+ foram identificados no tecido peniano.

Pelo menos quatro diferentes tipos de canais de K^+ foram descritos na musculatura lisa dos corpos cavernosos humanos (CHRIST, 2000). Estes são: 1) canais de K^+ ativados por cálcio (maxi-K ou K_{Ca}) 2) canais de K^+ dependentes do trifosfato de adenosina (K_{ATP}) 3) canal de K^+ de baixa condutância (K_{DR}) 4) canal de K^+ sensíveis à voltagem de corrente tipo "A" (K_{V}). Dentre estes, os canais de K^+ do tipo K_{ATP} e K_{Ca} são descritos como os mais relevantes na fisiologia da musculatura lisa peniana em seres humanos (BAUKROWITZ e FAKLER, 2000). A distribuição do K^+ através da membrana celular da musculatura lisa cavernosa permite que a abertura dos canais de K^+ promovam o efluxo de K^+ da célula muscular lisa, reduzindo o gradiente eletroquímico. Assim, o movimento de carga positiva para fora da célula resulta na hiperpolarização e efeito inibidor ao fluxo transmembrânico de Ca^{2+} pelos canais de cálcio voltagem-dependente e, subsequente, relaxamento da musculatura lisa (ROBERTSON et al., 1993; COHEN et al., 1999). Agonistas de canais de K^+ como o pinacidil, nicorandil e cromacalina (CK) relaxam vários tecidos musculares lisos por abertura de canais de K^+ e hiperpolarização das células. (COOK et al., 1988; HAMILTON et al., 1986; QUAIST e COOK, 1989; MOON et al., 1999) O pinacidil, um derivado da cianoguanidina, abole a atividade contrátil espontânea

do corpo cavernoso humano isolado e relaxa preparações contraídas por noradrenalina e contrações induzidas por estímulo elétrico dos nervos. O pinacidil também deprime as contrações induzidas por baixas concentrações de K^+ e aumenta o efluxo de Rb^+ (HOLMQUIST et al., 1990a).

Em corpo cavernoso de coelho, a CK, um derivado do benzopireno (mistura de duas formas enantioméricas designadas BRL 38226 e BRL 38227) é três a quatro vezes mais potente como agente relaxante do que o pinacidil (HOLMQUIST et al., 1990a). O nicorandil, derivado das nicotinamidas, é um agonista de canal de K^+ que ativa a GCs e induz ao relaxamento da musculatura lisa da artéria e corpo cavernoso humano (HSIEH et al., 2001).

A hiperpolarização da musculatura lisa peniana também é um fator importante no relaxamento endotélio-dependente das artérias penianas, mesmo na presença de bloqueadores da síntese de NO e de prostaglandina (ANGULO et al., 2003). Este relaxamento é inibido pelo bloqueio dos canais de K_{Ca} (ANGULO et al., 2003).

Assim, presume-se que o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) promova a abertura do canal de K_{Ca} resultando na hiperpolarização e vasodilatação arterial peniana (ANGULO et al., 2003).

Atualmente, a natureza do EDHF é desconhecida, entretanto, diversas identidades foram propostas tais como: metabólitos do ácido araquidônico, citocromo P450 oxigenase, íon potássio derivado do endotélio, peróxido de hidrogênio e o peptídeo natriurético do tipo-C (ANGULO et al., 2003).

- Os canais de K_{Ca}

Os canais de K^+ ativados por cálcio foram bem caracterizados na musculatura lisa dos corpos cavernosos em ratos e seres humanos (WANG et al., 2000). Os canais de K_{Ca} são moduladores da intensidade de contração da musculatura lisa cavernosa. A atividade deste canal aumenta com a ativação celular da via do AMPc pela PGE_1 ou a via GMPc pelo 8-Br-cAMP (LEE et al., 1999a; WANG et al., 2000). Desta forma, conclui-se que as duas principais vias fisiológicas de mensagens intracelulares, moduladoras do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos, dependem da ativação do canal de K_{Ca} .

Assim a hiperpolarização celular, secundária ao efluxo de K^+ , promove uma inibição ao fluxo de cálcio transmembrânico pelo canal de cálcio voltagem-dependente do tipo-L, levando ao relaxamento da musculatura lisa (ROBERTSON et al., 1993; TANIGUCHI et al., 1993; BOLOTINA et al., 1994; ARCHER et al., 1994; CHRIST et al., 1997).

Mais recentemente, demonstrou-se que a transferência do canal de K_{Ca} entre os corpos cavernosos em ratos adultos leva à facilitação da função erétil (CHRIST et al., 1998).

- Os canais de K^+ dependentes de ATP (K_{ATP})

Estudos imunocitoquímicos demonstraram a presença de canais de K_{ATP} em cultura de células musculares do corpo cavernoso humano (CHRIST et al., 1999). Achados experimentais evidenciaram que os canais de K_{ATP} podem modular o tônus da musculatura lisa cavernosa em seres humanos (LEE et al., 1999b).

Além disso, a ativação deste canal resulta na hiperpolarização da célula muscular lisa arterial durante anóxia e isquemia, quando há queda no nível do ATP celular (ARCHER, 2002). Contudo, o mais relevante é a evidência de que o NO ativa os canais de K_{ATP} em células musculares lisas vasculares através do mecanismo dependente de GMPc (BOLOTINA et al., 1994; KUBO et al., 1994).

Recentemente, muitos estudos demonstraram que moduladores e ativadores de canais de K^+ , mais especificamente dos canais de K_{ATP} , promovem um relaxamento dose-dependente no tecido muscular liso dos corpos cavernosos de seres humanos (ANDERSSON e WAGNER, 1995). O nicorandil (agonista do canal de K^+ e doador de NO) relaxa o tecido cavernoso de coelhos através de um mecanismo que envolve a ativação de canais de K_{ATP} e estimulação de guanilato ciclase (HSIE et al., 2001).

Mais recentemente, demonstrou-se que o pinacidil (ativador do canal K_{ATP}) relaxa o tecido erétil de seres humanos (HOLMQUIST et al., 1990a). Por isso, o uso do pinacidil, isolado ou em combinação com PGE_1 , tem sido proposto no diagnóstico e tratamento dos pacientes com disfunção erétil (MOON et al., 1999).

Baseando-se nas evidências apresentadas e na suposta participação do canal de K no relaxamento da musculatura lisa peniana procuramos estudar os canais de K_{ATP} dependente em animais in vivo com o propósito de definir o papel fisiológico destes canais na ereção peniana em cães.

2- OBJETIVOS

- 1) Padronizar um modelo experimental *in vivo* para estudar os mecanismos fisiológicos da ereção peniana em cães através do estímulo elétrico do nervo pélvico.
- 2) Confirmar a participação da via do NO-GMPc na ereção peniana induzida por estímulo elétrico do nervo pélvico em cães tratados com L-NAME (inibidor da NO sintase) e L-Arginina (precursor biológico do NO).
- 3) Identificar a presença funcional dos canais de K_{ATP} dependentes em corpo cavernoso de cães.
- 4) Estabelecer a participação dos canais de K_{ATP} dependentes nas ereções penianas, induzidas por estímulo elétrico do nervo pélvico em cães.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Escolha do modelo experimental

A escolha de cães para a realização deste estudo teve por objetivos:

- a) facilitar os procedimentos cirúrgicos em razão da maior dimensão do nervo pélvico e dos corpos cavernosos quando comparados a outros animais como o coelho e o rato.
- b) controle hemodinâmico do animal e do procedimento, por meio da monitorização da pressão arterial média e da pressão intracavernosa,
- c) reproduzir a ereção peniana fisiológica através da estimulação do nervo pélvico responsável por este fenômeno.

3.2- Grupos experimentais

Para a pesquisa, utilizamos 15 cães machos, adultos, sem raça definida, com peso variando entre 7 e 13 kg (peso médio de $9,6 \pm 0,66$ kg). Os animais permaneceram em quarentena no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas e foram transferidos e mantidos no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas. Em seguida, os animais foram transferidos ao Departamento de Farmacologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e submetidos à realização do experimento.

Os animais foram estudados em três grupos:

- Grupo piloto - constituído de seis cães para a padronização da técnica.
- Grupo I - constituído por cinco cães submetidos ao protocolo de avaliação da via NO-GMPc na ereção peniana evocada por estímulo elétrico do nervo pélvico.
- Grupo II - constituído por quatro cães submetidos ao protocolo de avaliação do canal KATP na ereção peniana evocada por estímulo elétrico do nervo pélvico.

3.3- Grupo piloto

Foram operados seis animais, permitindo a padronização de cada etapa operatória e do material necessário a ser utilizado. A padronização obtida foi empregada nos cães do grupo I e II

3.4- Preparo dos animais

No preparo pré-operatório, os animais ficaram em jejum por 12 horas (FANTONIE E CORTOPASSI, 2002).

3.5- Padronização dos procedimentos cirúrgicos

- a) Pesagem e identificação do animal, seguida de indução anestésica através da injeção intravenosa de pentobarbital sódico (Sagatal[®], 30 mg/kg de peso). A anestesia foi mantida com infusão intravenosa de pentobarbital sódico (Sagatal[®]) na dose de 30 mg/kg de peso.
- b) Após instalação da anestesia, os animais eram imobilizados em decúbito dorsal horizontal com abdução dos quatro membros, proporcionando exposição ideal do abdome.
- c) Realizada a intubação endotraqueal e ventilação mecânica, com fração inspiratória de oxigênio igual a 0,3 e com frequência respiratória de 20 inspirações por minuto.
- d) Posteriormente, realizava-se o cateterismo vesical com sonda de nelaton número 8 para drenagem contínua da urina.
- e) Tricotomia do abdome e anti-sepsia cutâneos, utilizando-se solução alcoólica de polivinil pirrolidona-iodo a 10 %, seguidas de colocação de campos estéreis.
- f) Dissecção dos vasos femorais

Através de uma incisão inguinal a artéria femoral esquerda era dissecada e cateterizada com uma cânula de diâmetro 6 Fr (sondas de polietileno). A cânula arterial era conectada a um transdutor de pressão (PRC 21/3, Ugo Basile, Itália) e a pressão arterial era continuamente registrada em um polígrafo de dois canais (Gemini 7082, Ugo Basile, Itália).

Através da mesma incisão, a veia femoral era dissecada e cateterizada com uma cânula de diâmetro 6 Fr e utilizada para infusão de drogas e solução fisiológica (solução salina 0,9%) para hidratação dos animais na velocidade de 10 ml/kg/hora.

g) Dissecção do pênis

Após dissecção da pele, os corpos cavernosos são expostos e o corpo cavernoso direito é puncionado a 1 cm da sínfise púbica com auxílio de um escalpe vascular número 21. Em seguida, o escalpe é preenchido com solução salina heparinizada e conectado a um transdutor de pressão arterial (PRC 21/3, Ugo Basile, Itália) acoplado a um polígrafo de dois canais (Gemini 7082, Ugo Basile, Itália) para medida da pressão intracavernosa (PIC, mmHg) durante todo o experimento.

Nos experimentos em que foi necessária a infusão de drogas intracavernosas, realizou-se uma segunda punção com escalpe vascular número 21 no mesmo corpo cavernoso a 1 cm de acima da primeira punção.

A fim de evitar alterações de pressão em resposta à infusão de volume, todas as soluções injetadas eram diluídas para um volume de 0,5 ml seguidas da infusão de 0,5 ml de solução de soro fisiológico heparinizado para certificar-se de que toda droga era injetada no corpo cavernoso bem como para evitar obstrução do mesmo.

h) Laparotomia mediana infra-umbilical por planos, com retração da parede abdominal utilizando-se um afastador de "gosset" pediátrico.

i) Dissecção do nervo pélvico

O nervo pélvico era dissecado na porção póstero-superior da próstata bilateralmente.

Posteriormente, depois de isolado o nervo pélvico direito era levemente pinçado por um eletrodo de platina (construído no laboratório de farmacologia) e conectado a um estimulador elétrico (S48, Grass Instruments, EUA) (Figura 12).

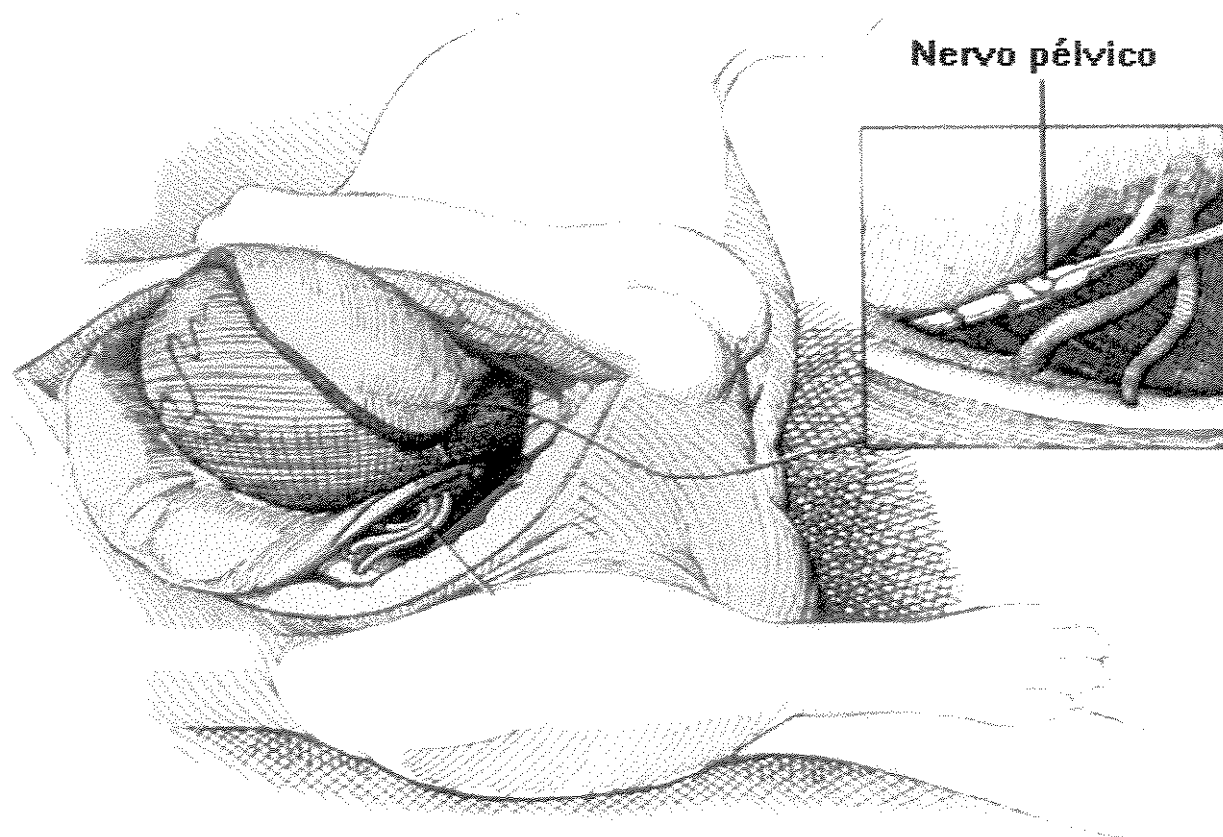


Figura 12- Demonstração do pinçamento do nervo pélvico

J) Padronização do estímulo elétrico do nervo pélvico

Inicialmente, realizávamos estímulos elétricos com intensidade e frequência mínimas durante 1 minuto que eram aumentados progressivamente até identificarmos o melhor estímulo que induzia ao aumento máximo da pressão intracavernosa.

Os parâmetros utilizados na neuroestimulação elétrica foram sempre constantes: 3 - 20 volts de intensidade, 3 - 15 Hz de frequência durante 1 minuto.

- k) Avaliação da resposta erétil ao estímulo elétrico do nervo pélvico e drogas de uso sistêmico (parenteral) e/ou via intracavernosa.

O aumento da pressão intracavernosa é o parâmetro objetivo na avaliação da resposta erétil.

As respostas excitatórias induzidas por estímulo elétrico do nervo e das drogas estimulantes foram avaliadas através da latência (tempo entre o estímulo e o início do aumento da pressão intracavernosa) e do aumento da pressão intracavernosa induzido pelo estímulo elétrico do nervo pélvico após a injeção endovenosa e/ou intracavernosa de drogas estimulantes.

As respostas inibitórias provocadas pelo estímulo elétrico ou pelas drogas bloqueadoras foram avaliadas através da inibição do aumento da pressão intracavernosa induzido pelo estímulo elétrico do nervo pélvico, após a injeção endovenosa e/ou intracavernosa de drogas bloqueadoras.

- l) Critérios utilizados para determinar o fim da ação de cada medicamento foram:

O retorno da pressão intracavernosa a níveis basais e resposta ao estímulo elétrico do nervo pélvico semelhante às respostas obtidas no início do experimento.

M) Padronização experimental

Depois de determinarmos a pressão intracavernosa basal e o estímulo elétrico do nervo pélvico que induz a melhor resposta erétil do corpo cavernoso (aumento da pressão intracavernosa em níveis submáximo), iniciávamos o experimento somente após três estímulos nervosos consecutivos com intervalos de 5 minutos a fim de se comprovar respostas eréteis reprodutíveis.

Após as injeções endovenosas de drogas realizamos estímulos elétricos do nervo pélvico com 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, consecutivamente.

Nos experimentos em que as drogas (0.5 ml de solução) foram administradas por via intracavernosa, após cada injeção, lavávamos o escalpe vascular com 0.5 ml de solução heparinizada e esperávamos durante 5 minutos o efeito da droga sobre a pressão intracavernosa. O estímulo do nervo pélvico era realizado 5 minutos após a injeção intracavernosa de drogas.

A pressão arterial média foi monitorada continuamente durante todo o experimento e obtida através da média entre a pressão arterial sistólica e diastólica.

N) Ao final de cada experimento, os animais eram sacrificados através da injeção endovenosa de pentobarbital associada à infusão em bolo de altas concentrações de cloreto de potássio a 19,1%, até a ocorrência de parada cardiorrespiratória.

3.6- Grupo I - protocolo de avaliação da via NO-GMPc na ereção peniana evocada por estímulo elétrico do nervo pélvico

Depois de determinarmos a pressão intracavernosa basal e a melhor resposta erétil ao estímulo elétrico do nervo pélvico, administramos por via endovenosa D-NAME (N^o-nitro-D-arginina metil éster, 10 mg/kg), enantiômero inativo do L-NAME, e realizamos estímulos nervosos após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. A seguir, administramos por via endovenosa o L-NAME (N^o-nitro-L-arginina metil éster; 10 mg/kg), inibidor da síntese de NO, e repetimos os estímulos nervosos nas mesmas condições experimentais que as anteriores. A especificidade do efeito promovido por este composto no corpo cavernoso foi testada por meio da administração prévia do D-NAME. Em seguida, administrou-se a D-Arginina (300 mg/kg), o enantiômero inativo da L-Arginina e a L-Arginina (300 mg/kg), precursor biológico do NO, e repetimos os estímulos nervosos nos tempos pré-estabelecidos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a administração de cada composto.

Finalmente, com o intuito de se determinar a integridade da preparação ao final do experimento, administrou-se cloridrato de papaverina (700 µg/kg, IC) através do escalpe vascular de medida da pressão intracavernosa.

A pressão arterial média foi monitorada continuamente durante todo o experimento e obtida através da média entre a pressão arterial sistólica e diastólica.

3.7- Grupo II - protocolo de avaliação do canal K_{ATP} na ereção peniana evocada por estímulo elétrico do nervo pélvico

Depois de determinarmos a pressão intracavernosa basal e a melhor resposta erétil ao estímulo elétrico do nervo pélvico, administramos por via intracavernosa 3 μ g de cromacalina (agonista do canal de K_{ATP} dependente). Após o retorno da pressão intracavernosa a seus níveis basais, realizamos a injeção intracavernosa de 10 μ g de cromacalina. No momento em que a pressão intracavernosa retornou ao basal, realizamos a injeção intracavernosa de 10 mg de glibenclamida (bloqueador do canal de K_{ATP} dependente) e repetimos aos 5 minutos a injeção intracavernosa de 10 μ g de cromacalina. Posteriormente, realizamos dois estímulos do nervo pélvico com intervalo de 5 minutos entre eles. Finalmente, realizamos a injeção intracavernosa de cloridrato de papaverina (700 μ g/kg, IC).

A pressão arterial média foi monitorada continuamente durante todo o experimento e obtida através da média entre a pressão arterial sistólica e diastólica.

3.8- Drogas

As drogas utilizadas neste estudo foram: L-arginina, N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N^o-nitro-D-arginina metil éster (D-NAME), enantiômero inativo do L-NAME, L-Arginina, D-Arginina, o enantiômero inativo da L-Arginina, cromacalina (agonista do canal de K_{ATP} dependente), glibenclamida (bloqueador do canal de K_{ATP} dependente), obtidas de Sigma (Saint Louis, MO, EUA), cloridrato de papaverina obtido da Gayer (Porto Alegre, RS, Brasil).

As drogas foram preparadas imediatamente antes de serem administradas.

3.9- Análise estatística

O aumento da pressão intracavernosa foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média e foi analisado estatisticamente, pelo teste t de Student pareado. A probabilidade < 0.05 foi considerada significativa.

4- RESULTADOS

4.1- Grupo I - Protocolo de avaliação da via NO-GMPc

A pressão intracavernosa (PIC) média basal dos animais foi de 12.8 ± 5.0 mmHg. O estímulo do nervo pélvico (5-20V, 5-15Hz) aumentou a PIC para 86 ± 11.4 mmHg ($p < 0.05$) com latência de 8.8 ± 2.9 segundos (Tabela 1).

A administração endovenosa do enantiômero inativo D-NAME (10 mg/kg) não modificou significativamente a pressão intracavernosa basal e a pressão induzida por estímulo do nervo pélvico. Não houve mudança da pressão arterial média (Tabela 1). Entretanto, a administração endovenosa de L-NAME inibiu em 82% o aumento da PIC evocada por neuroestímulo aos 30 minutos (Figuras 13 e 14). Contudo, observou-se um aumento discreto da pressão arterial média. A administração endovenosa de L-Arginina, e não da D-Arginina, reverteu parcialmente o aumento da pressão intracavernosa evocado por estímulo elétrico, inibido previamente pelo L-NAME ($p < 0.05$) (Tabela 1). A administração intracavernosa de cloridrato de papaverina promoveu marcado aumento da PIC (133 ± 6.9 mmHg, $p < 0.01$) com latência de 12.2 ± 2.9 segundos. Estes resultados encontram-se sumarizados na Tabela 1 e Figuras 13 e 15.

Tabela 1- Inibição da tumescência provocada pelo estímulo do nervo pélvico (5-20 V, 5-15 Hz, 1 min, 1 ms) pelo L-NAME com reversão pela L-arginina e não D-arginine.

	Controle	D-NAME (10 mg/kg)	L-NAME (10 mg/kg)	D-Arg (300 mg/kg)	L-Arg (300 mg/kg)
PIC basal (mmHg)	12.8 ± 5.0	12.8 ± 5.0	12.0 ± 4.9	7.7 ± 1.4	11.2 ± 4.0
Δ PIC/EM (mmHg)	$86.2 \pm 11.4^*$	$79.8 \pm 12.5^*$	$15.4 \pm 5.0^{**}$	$10.0 \pm 1.1^{**}$	$51.0 \pm 11.1^{*,\#}$
Latência (sec)	8.8 ± 2.9	7.2 ± 1.9	ND	ND	14.2 ± 5.4
PAM (mmHg)	90 ± 7.5	92 ± 6.3	104 ± 8.1	96 ± 9.2	98 ± 5.1

PIC = pressão intracavernosa; EN = estimulação do nervo; ND = não determinado;

PAM = pressão arterial média

Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=5)

* $P < 0.05$ versus basal, ** $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$ versus L-NAME

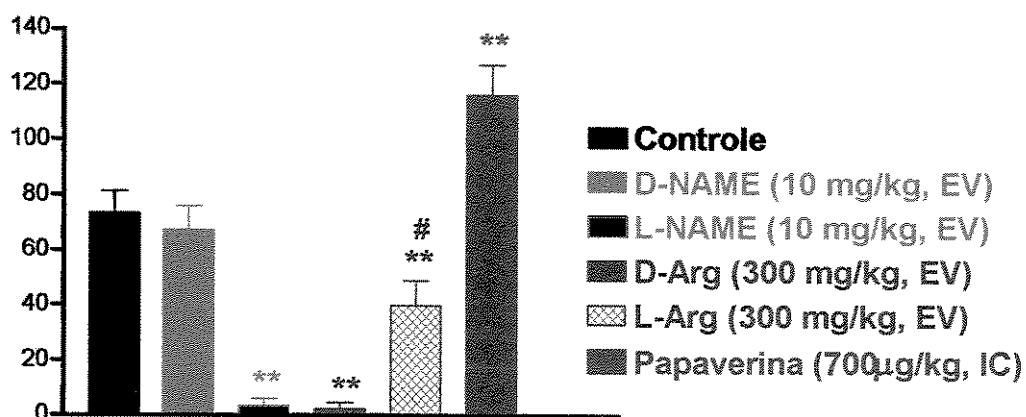
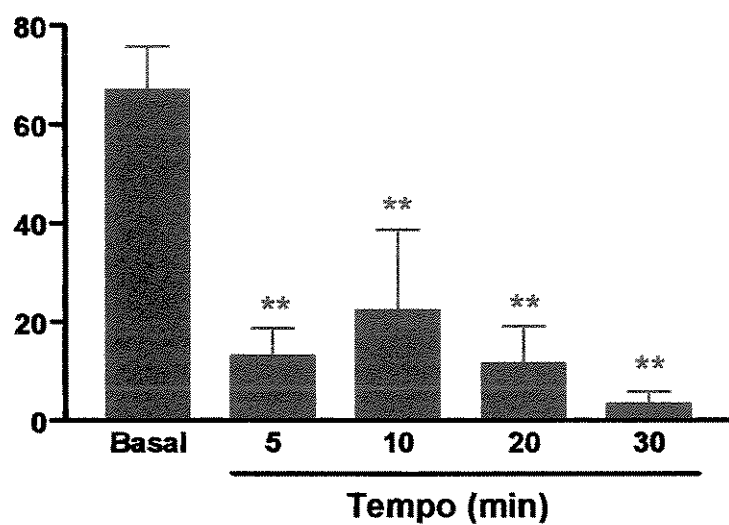


Figura 13- Efeito da administração endovenosa de D-NAME (10 mg/kg), L-NAME (10 mg/kg), D-Arg (300 mg/kg), L-Arg (300 mg/kg) na pressão intracavernosa induzida por estímulo do nervo pélvico. Os valores representam o aumento da pressão intracavernosa (PIC) e são expressos como média ± E.P.M de 5 experimentos.

** $p < 0.01$ versus Controle

$p < 0.05$ versus L-NAME



**** p<0.01 versus Basal**

Figura 14- Efeito inibitório do aumento da pressão IC, induzida por estímulo do nervo cavernoso, após a administração endovenosa de L-NAME (10 mg/kg) em intervalos de tempo de 5 em 5 minutos até 30 minutos.

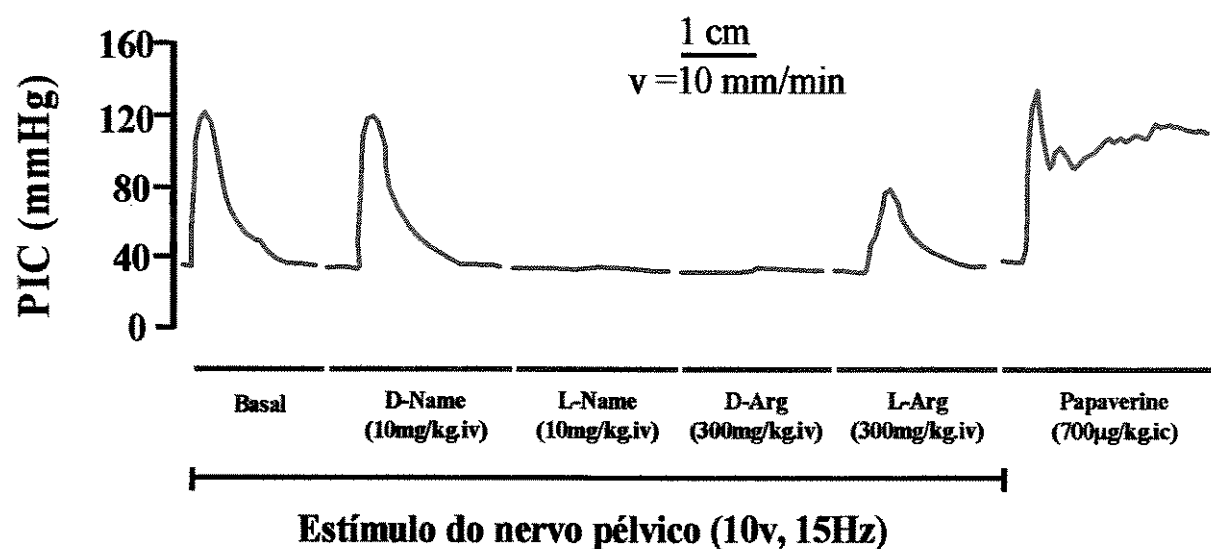


Figura 15- Traçado representativo da pressão intracavernosa evocada por estímulo do nervo pélvico antes e após a administração endovenosa N^o-nitro-D-arginina metil éster; D-NAME (10 mg/kg), N^o-nitro-L-arginina metil éster; L-NAME (10 mg/kg), D-Arginina (300 mg/kg), D-Arginina (300 mg/Kg), L-Arginina (300 mg/kg) e intracavernosa de cloridrato de papaverina (700 µg/kg, IC).

4.2- Grupo II - Protocolo de avaliação do canal de K_{ATP}

O estímulo do nervo pélvico (5 V, 5 - 10 Hz) aumentou significativamente a PIC para 105 ± 8.7 mmHg comparada com a pressão intracavernosa basal (12.8 ± 5 mmHg, $p < 0.05$), Tabela 2.

A administração intracavernosa de cromacalina 3 μ g e 10 μ g aumentou significativamente a pressão intracavernosa para 103 ± 14.4 mmHg e 106 ± 12.1 mmHg, respectivamente (Tabela 2). A administração intracavernosa de glibenclamida inibiu significativamente o aumento da PIC induzida por cromacalina (10 μ g). Contudo, a glibenclamida não alterou o aumento da PIC evocado por estímulo elétrico do nervo pélvico (Tabela 2). A administração intracavernosa de cloridrato de papaverina promoveu aumento da PIC (116 ± 6.2 mmHg, $p < 0.01$) com latência de 12.2 ± 2.9 segundos. Estes resultados encontram-se sumarizados na Tabela 2 e Figura 16.

Tabela 2- Efeitos da cromacalina e do estímulo do nervo pélvico (5-10 Hz, 5 V, 1 minuto) na pressão intracavernosa antes e depois da injeção intracavernosa de glibenclamida

	Controle	EN	Ck 3 μ g	Ck 10 μ g	Ck + Gli 10 mg	EN + Gli 10 mg	Papaverina
PIC (mmHg)	12.8 $\pm$ 5.0	105 $\pm$ 8.7 ^a	103 $\pm$ 14.4 ^a	106 $\pm$ 12.1 ^a	12.6 $\pm$ 3.0 ^b	88 $\pm$ 24.2 ^a	100 $\pm$ 14.0 ^a
Latência (s)	ND	10 $\pm$ 1.0	65 $\pm$ 8.5	48 $\pm$ 5.0	ND	22 $\pm$ 6.0	12 $\pm$ 7.0
PAM (mmHg)	102 $\pm$ 4.5	114 $\pm$ 6.3	114 $\pm$ 8.1	115 $\pm$ 9.2	112 $\pm$ 5.1	112 $\pm$ 7.5	112 $\pm$ 5.1

PIC = pressão intracavernosa; EN = estímulo do nervo pélvico; ND = não determinado;

PAM = pressão arterial média; CK = cromacalina; Gli = glibenclamida

Os Valores são expressos como média + E.P.M. (n = 4)

a $p < 0,05$ versus controle, b $p < 0,05$ versus Ck 10 μ g

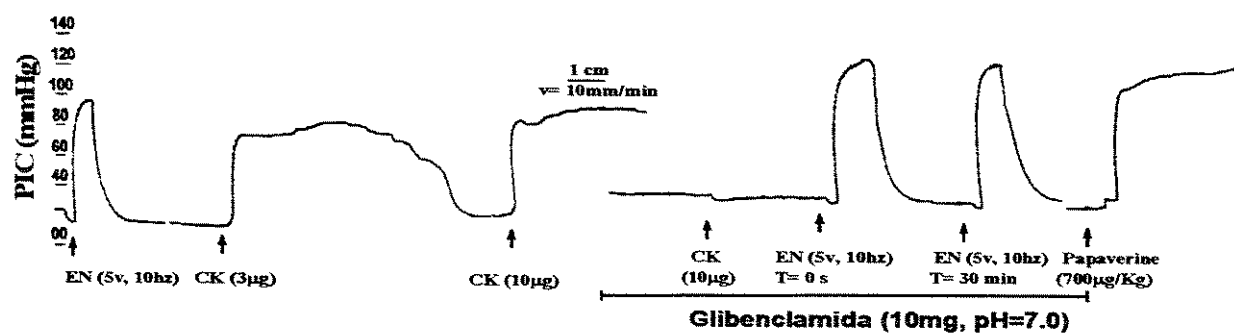


Figura 16- Traçado representativo do aumento da pressão intracavernosa após o estímulo do nervo pélvico (EN) e a injeção intracavernosa de cromacalina (CK) antes e após a administração intracavernosa de glibenclamida em cães.

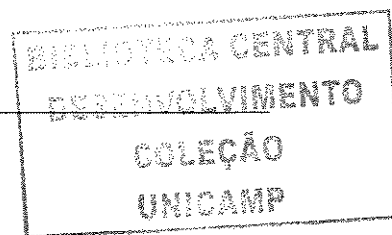
5- DISCUSSÃO

A fisiologia e a farmacologia da ereção peniana foram amplamente investigadas ao longo dos anos. Muitos estudos foram realizados para estudar o mecanismo e os mediadores envolvidos na ereção peniana em animais e seres humanos. Os animais mais utilizados nestes estudos foram: os coelhos, os macacos, cães e mais recentemente, os ratos (HOLMQUIST et al., 1991; TRIGO-ROCHA et al., 1993, 1994). Na maioria destes trabalhos a técnica e o método utilizado para induzir a ereção peniana e medir a pressão intracavernosa foram semelhantes. Entretanto, o modelo experimental empregando-se os cães é provavelmente o melhor método para se avaliar os parâmetros hemodinâmicos, como pressão sanguínea, frequência cardíaca, fluxo sanguíneo regional e resistência vascular, além, dos parâmetros envolvidos na ereção peniana (CARTER et al., 1998).

Nós utilizamos os cães presumindo-se que haveria uma maior facilidade em identificar as estruturas vasculares e principalmente o plexo e o nervo pélvico, devido ao maior tamanho dos animais e, portanto, das estruturas anatômicas. Durante os primeiros experimentos verificamos que a dissecação das estruturas nervosas deveria ser realizada através do uso de pinças de vidro, visto que, os instrumentos metálicos facilmente poderiam danificá-los. Um outro detalhe importante foi à necessidade do uso de um eletrodo de platina para pinçar o nervo que foi confeccionado no Departamento de Farmacologia da UNICAMP.

Além disso, observamos que o estímulo elétrico do nervo pélvico induz a um aumento da pressão intracavernosa que depende diretamente da frequência e da voltagem empregada do neuro-estímulo. Entretanto, verificamos que quando realizamos um estímulo nervoso com voltagem elevada, ou seja, acima de 20 volts induzimos a uma lesão no nervo interrompendo o aumento da pressão intracavernosa e consequente perda do experimento.

Assim, percebemos que a utilização de tal modelo *in vivo*, apresentou como vantagem a possibilidade de se obter ereções reprodutíveis através da estimulação do nervo pélvico sem a necessidade do uso de bloqueadores da estimulação de outras fibras simpáticas como ocorre nas preparações *in vitro*. Além disso, possibilita-nos monitorar continuamente a pressão arterial sistêmica, a pressão intracavernosa e a duração da ereção.



Comparando-se os animais estudados com os protocolos atualmente em desenvolvimento em ratos, concluímos que há uma superioridade na identificação e isolamento das estruturas anatômicas quando utilizamos os cães. Sem considerar, a natureza infinitamente mais delicada e frágil dos tecidos e das condições cardiovasculares, hemodinâmicas e respiratórias dos animais menores.

Uma outra vantagem importante nos estudos em cães é que aparentemente o experimento é mais homogêneo com maior uniformidade na obtenção dos parâmetros hemodinâmicos e no aumento da PIC entre os animais.

Isto porque, observamos que alguns cães eram analisados durante horas e, mesmo assim, seus parâmetros hemodinâmicos eram mantidos com poucas variações durante todo o estudo.

Infelizmente, os experimentos utilizando-se os cães estão se tornando cada vez mais raros no Brasil e no exterior, visto que, há uma resistência na utilização destes pelas entidades protetoras dos animais, além dos custos serem superiores.

O tamanho da amostra dos animais utilizados em cada técnica foi estabelecido com base nos princípios estatísticos que consideram: (a) as condições materiais reais para a realização do estudo; (b) o tamanho das amostras usualmente utilizado em estudos e área afins; e (c) o rigor científico no planejamento, na condução e na escolha dos testes empregados (VIEIRA, 1999).

A estimulação elétrica do nervo pélvico promove um aumento da pressão intracavernosa devido a uma estimulação global de suas fibras e liberação de seus respectivos mediadores químicos. Atuando diretamente sobre o músculo liso intracavernoso ou através do endotélio, estes mediadores induzem ao relaxamento desta musculatura lisa, comprimindo vênulas e veias e promovendo o aumento da pressão intracavernosa com conseqüente ereção peniana. A avaliação foi realizada baseando-se no aumento da pressão intracavernosa bem como da duração e da tumescência.

Foi possível também o contínuo monitoramento da pressão arterial sistêmica uma vez que um mediador químico fisiológico deve ter repercussões sistêmicas mínimas.

Nossos resultados confirmaram as evidências da participação da via L-Arginina-NO-GMPc na ereção peniana em cães (TRIGO-ROCHA et al., 1993b). O estímulo elétrico do nervo pélvico nos animais estudados promoveu a liberação de NO das fibras nitrérgicas, levando ao relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos e a ereção peniana, medida através do aumento da pressão intracavernosa.

Entretanto, este aumento foi significativamente reduzido pelo tratamento com L-NAME (inibidor não seletivo da síntese de NO, antagonista competitivo da L-arginina ao nível do sítio de combinação da enzima óxido nítrico sintase). Este achado demonstra que o estímulo elétrico do nervo pélvico induz à liberação de NO que, por sua vez, relaxa a musculatura lisa do corpo cavernoso com conseqüente ereção peniana. Estes efeitos foram, de fato, decorrentes da liberação de NO, pois os mesmos não foram observados com o enantiômero inativo D-NAME, comprovando ser uma inibição estereoespecífica (MOORE et al., 1989; REES et al., 1989).

A infusão subsequente de L-arginina (mas não do enantiômero inativo D-arginina) reverteu o efeito inibitório do L-NAME, reforçando o envolvimento do NO na resposta evocada pelo estímulo elétrico.

O bloqueio de determinada resposta fisiológica por um antagonista competitivo específico e a reversão do mesmo, ainda que parcial, pela adição de substrato específico e não outros reforçam a hipótese de que esta substância seja o mediador químico envolvido em tal fenômeno.

Assim, a inibição da resposta erétil à neuroestimulação na presença de um antagonista competitivo da síntese de óxido nítrico, o L-NAME e a adição de L-arginina revertendo parcialmente o bloqueio, conforme demonstram a Tabela 1 e a Figura 15, comprovam e confirmam os achados de que o óxido nítrico é o principal mediador do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos, responsável pela ereção peniana em cães.

O NO, presente na célula muscular lisa, ativa a guanilato ciclase solúvel intracelular, promovendo elevação nos níveis de GMPc a partir do trifosfato de guanosina (RAPOPORT e MURAD, 1983; LUCAS et al, 2000).

O aumento do GMPc ativa uma proteína cinase-dependente de GMPc que, por sua vez, relaxa a musculatura lisa através da fosforilação da cadeia de miosina (CHRIST et al., 1996).

O relaxamento muscular mediado pelo No-GMPc pode envolver vários mecanismos, incluindo a hiperpolarização celular produzida pela ativação de canais de K^+ , levando ao efluxo de K^+ e redução do influxo de Ca^{++} através dos canais de Ca^{++} voltagem-dependentes da membrana celular e do retículo sarcoplasmático (ROBERTSON et al., 1993; TANIGUCHI et al., 1993; BOLOTINA et al., 1994; ARCHER et al., 1994; CHRIST et al., 1997). Assim, presume-se que os canais de potássio exerçam um papel fundamental na regulação do tônus da MLCC através da hiperpolarização celular (CHRIST et al., 1996, 1997).

Os canais de K^+ encontrados no tecido peniano que exercem um papel relevante no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso (MLCC) são classificados em dois subtipos, o canal de potássio ATP-dependente (K_{ATP}) e o canal de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) (CHRIST et al., 1999; MELMAN e CHRIST, 2001; ARCHER, 2002).

O canal de K_{ATP} também é descrito como um possível modulador do tônus da MLCC (CHRIST et al., 1998; ARCHER, 2002).

Entretanto, o papel deste canal iônico no mecanismo fisiológico da ereção peniana não está bem esclarecido.

Recentemente, muitos estudos demonstraram que moduladores e ativadores de canais de K^+ , mais especificamente dos canais de K_{ATP} , promovem um relaxamento dose-dependente em tecido muscular liso dos corpos cavernosos de seres humanos (HOLMQUIST et al., 1990a ; KUBO et al., 1994; HSIE et al., 2001; SPEKTOR et al., 2002). Assim, há evidências experimentais de que o canal de K_{ATP} pode modular a função erétil.

Apesar destas evidências, nossos resultados demonstraram que a injeção intracavernosa de CK induz ao aumento significativo e de forma dose-dependente da PIC em cães anestesiados. Estes achados confirmam a presença de canais funcionais de K_{ATP} e demonstram o efeito relaxante do agonista de canal de K_{ATP} na musculatura lisa cavernosa de cães (Tabela 2 e Figura 16).

Entretanto, o achado mais surpreendente foi demonstrado com a injeção intracavernosa de glibenclamida.

O aumento da PIC causado pela injeção intracavernosa de cromacalina foi bloqueado pela glibenclamida, contudo não houve bloqueio do aumento da PIC induzido pelo estímulo elétrico do nervo pélvico.

Assim, demonstramos que o bloqueio dos canais de K_{ATP} pela glibenclamida não inibe o aumento da PIC (ereção peniana) induzida por estímulo elétrico em cães (CARA et al., 2004).

Desta forma, concluímos que os canais de K_{ATP} não exercem um papel fisiológico importante na ereção peniana mediada por óxido nítrico em cães.

6- CONCLUSÃO

O presente trabalho, sistematizado entre os parâmetros descritos, permite concluir que:

- 1) O modelo experimental em cães *in vivo* empregado com estímulo elétrico do nervo pélvico promove aumento da pressão intracavernosa, simulando uma ereção peniana fisiológica. O método utilizado é um modelo experimental eficaz no estudo dos principais eventos fisiofarmacológicos que participam da ereção peniana em cães.
- 2) Nossos resultados demonstraram que o óxido nítrico é o principal neurotransmissor da ereção peniana em cães.
- 3) Os canais de K_{ATP} dependentes estão presentes no tecido cavernoso em cães
- 4) Os canais K_{ATP} dependentes não desempenham um papel importante na ereção peniana, induzida por estímulo elétrico do nervo pélvico em cães.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSEIF, S.R.; LUE, T.F. - **Hemodynamics of penile erection.** Urol Clin North Am, 15:1-7, 1988.
- ALMEGARD, B.; ANDERSSON, S.E. - **Vascular effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and cholecystokinin (CCK) in the monkey eye.** J Ocul Pharmacol, 9:77-84, 1993.
- AMANO, M.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI, K.; - **Regulation, functions of Rho-associated kinase.** A review Exp Cell Res, 261: 44-51, 2000.
- ANDERSSON, K.E.; HEDLUND, H.; MATTIASSON, A.; SJOGREN, C.; SUNDLER, F. - **Relaxation of isolated human corpus spongiosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation.** World J Urol, 1: 203-208, 1983a.
- ANDERSSON, K.E.; MATTIASSON, A.; SJOGREN, C. - **Electrically induced relaxation of the noradrenaline contracted isolated urethra from rabbit and man.** J Urol, 129: 210-4, 1983b.
- ANDERSSON, K.E.; WAGNER, G. - **Physiology of penile erection.** Physiol Rev, 75:191-236., 1995.
- ANDERSSON, K.E. - **Neurotransmitters: central and peripheral mechanisms.** Int J Impot Res, 12: S26-S33, 2000.
- ANDERSSON, K.E. - **Pharmacology of penile erection.** Pharmacol Rev, 53: 417-50., 2001a.
- ANDERSSON, K.E. - **Pharmacology of erectile function and dysfunction.** Urol Clin North Am., 28: 233-47, 2001b.
- ANGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; VIDELA, S. - **Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries.** Br J Pharmacol, 139: 854 – 62, 2003.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. -**Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charbydotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependente protein Kinase.** Proc Natl Acad Sci., USA, 91: 7583-7587, 1994.

- ARCHER, S. L. - **Potassium channels and erectile dysfunction.** Vascular Pharmacology, 38: 61-71, 2002.
- ARI, G.; VARDI, Y.; HOFFMAN, A.; FINBERG, J.P. - **Possible role for endothelins in penile erection.** Eur J Pharmacol, 307: 69-74., 1996.
- AZADZOI K, M.; KIM, N.; BROWN, M. L.; GOLDSTEIN, I.; COHEN, R. A.; SAENZ DE TEJADA I – **Modulation of penile corpus cavernosum smooth muscle tone by endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products.** J Urol, 147: 220, 1992.
- BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. - **Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes.** J Urol, 159: 2164-71, 1998.
- BAUKROWITZ, T.; FAKLER, B. - **K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids.** Eur J Biochem, 267: 5842- 5848, 2000.
- BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; SCHELLER, F.; KNAPP, W.H.; HARTMANN, U. et al. - **Plasma levels of angiotensin II during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectile dysfunction.** Urology, 58: 805-10, 2001a.
- BECKER, A. J.; UCKERT, S.; STIEF, C. G.; TRUSS, M. C.; MACHTENS, S.; SCHELLER, F. et al. - **Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence.** Urology, 57: 193-8, 2001b.
- BERRY, C.; TOUYZ, R.; DOMINICZAK, A.F.; WEBB, R.C.; JOHNS, D.G. – **Angiotensin receptors: Signaling vascular pathophysiology, and interactions with ceramide.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281: H2337-65, 2001.
- BIVALACQUA, T. J.; CHAMPION, H. C.; RAJASEKARAN, M.; SIKKA, S. C.; KADOWITZ, P. J. et al. - **Potentiation of erectile response and cAMP accumulation by combination of prostaglandin E1 and rolipram, a selective inhibitor of the type 4 phosphodiesterase (PDE4).** J Urol, 162:1848-55, 1999.

- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. - **Nitric oxide directly activates potassium channels in vascular smooth muscle.** *Nature*, 368: 850-3, 1994.
- BOOLELL, M.; ALLEN, M. J.; BALLARD, S. A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G. J.; NAYLOR, A. M. et al. - **Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction.** *Int J Impot Res*, 8: 47-52, 1996.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. - **Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.** *Proc Natl Acad Sci, USA*, 87: 682-5, 1990.
- BROWN, J.; TAYLOR, P. - Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 9th Ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.141-60.
- BURNETT, A. L.; LOWENSTEIN, C. J.; BREDT D. S.; CHANG, T. S.; SNYDER, S. H. – **Nitric oxide: A physiologic mediator of penile erection.** *Science*, 257: 401-403, 1992.
- BURNETT, A. L.; TILLMAN, S. L.; CHANG, T. S.; EPSTEIN, J. I.; LOWENSTEIN, C. J.; BREDT, D. S. et al. - **Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis.** *J Urol*, 150: 73-6, 1993.
- BURNETT, A. L.; NELSON, R. J.; CALVIN, D. C.; LIU, J. X.; DEMAS, G. E.; KLEIN, S. L. et al. - **Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase.** *Mol Med*, 2: 288-96, 1996.
- BUSH, P. A.; GONZALEZ, N. E.; IGNARRO, L. J. - **Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum.** *Biochem Biophys Res Commun*, 186:308-14, 1992.
- CALDWELL, P. R.; SEEGAL, B. C.; HSU, K. C.; DAS, M.; SOFFER, R. L. - **Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization.** *Science*, 191:1050 - 1, 1976.

- CARÁ, A. M.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; ANTUNES, E.; NAHOUM, C. R. D.; DE NUCCI, G - **The role of histamine in human penile erection**. British Journal of Urology, 75: 220-224, 1995.
- CARÁ, A. M.; FREGONESI, A.; ANTUNES, E.; DENUCCI, G.; NETTO, JR. N. R - **Role of adenosine triphosphate-dependent potassium channels in canine penile erection**. Urol, 64: 603-607, 2004.
- CARATI, C. J.; CREED, K. E.; KEOGH, E. J. - **Autonomic control of penile erection in the dog**. J Physiol, 384: 525-38, 1987.
- CARRIER, S.; NAGARAJU, P.; MORGAN, D. M.; BABA, K.; NUNES, L.; LUE, T. F. - **Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis**. J Urol, 157: 1088-92, 1997.
- CARSON, C.C.; KIRBY, R.S.; GOLDSTEIN, I. - **Textbook of Erectile Dysfunction**. In : NITAHARA K. S. AND LUE, T. F., ed. - **Microscopic anatomy of the penis**. 1.ed. Oxford, Isis Medical Media Ltd, 1999. p.31-41.
- CARTER, A. J.; BALLARD, S. A.; NAYLOR, A. M. - **Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile function in the anesthetized dog**. J Urol, 160: 242-246, 1998.
- CELLEK, S; REES, R W; KALSI J - **A Rho-kinase inhibitor soluble guanylate cyclase activator and nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor: Novel approaches to erectile dysfunction**. Expert Opin Investing Drugs, 11: 1563-73, 2002.
- CHAKI, S.; INAGAMI, T. - **Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells**. Biochem Biophys Res Commun, 182: 388-94, 1992.
- CHAMNESS, S. L.; RICKER, D. D.; CRONE, J. K.; DEMBECK, C. L.; MAGUIRE, M. P.; BURNETT, A. L. et al. - **The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat**. Fertil Steril, 63: 1101-7, 1995.
- CHAMPION, H. C.; WANG, R.; SANTIAGO, J. A.; MURPHY, W. A.; COY, D. H.; KADOWITZ, P. J. et al. - **Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the feline erection model**. J Androl., 18: 513-21, 1997.

CHITALEY, K., WINGARD, C.J., WEBB, R.C., BRANAM, H., STOPPER, V.S., LEWIS, R.W. et al. - **Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-Independent pathway.** Nat Med, 7: 119-22, 2001.

CHRIST, G.J.; STONE, B.S.; MELMAN, A.- **Kinetic studies of contraction in human erectile tissue (HET) and rabbit aortic rings in vitro: modulation by papaverine and the dihydropyridine analog nifedipine.** Int J Impot.Res 1: 1-10, 1989.

CHRIST, G. J.; STONE, B.; MELMAN, A. - **Age-dependent alterations in the efficacy of phenylephrine-induced contractions in vascular smooth muscle isolated from the corpus cavernosum of impotent men.** Can J Physiol Pharmacol, 69: 909-13, 1991.

CHRIST, G. J.; BRINK, P. R.; MELMAN, A.; SPRAY, D. C. - **The role of gap junction and ion channels in the modulation of electrical and chemical signals in human corpus cavernosum smooth muscle.** Int J Impotence Res, 5: 77, 1993.

CHRIST, G. J.; BRINK, P. R.; RAMNAN, S. V. - **Neuronal innervation, signal transduction and erection.** J Urol, 155: 620A, 1996.

CHRIST, G. J.; RICHARDS, S; WINKLER, A. - **Integrative erectile biology: the role of signal transduction and cell-to-cell communication in coordinating corporal smooth muscle tone and penile erection.** Int J Impot Res, 9: 69-84, 1997.

CHRIST, G.J.; REHMAN, J.; DAY, N.; SALKOFF, L.; VALCIC, M.; MELMAN, A.; GELIEBTER, J. - **Intracorporal injection of hSlo cDNA in rats produces physiologically relevant alterations in penile function.** Am J Physiol, 275, H600-H608, 1998.

CHRIST, G. J.; WANG H Z.; VENKATESWARLU K.; ZHAO , W.; DAY, N.S. - **Ion channels an gap junction: their role in erectile physiology , dysfunction, and future therapy.** Mol Urol, 3: 61-73, 1999.

CHRIST, G. J. - **Gap junction and ion channels: relevance to erectile dysfunction.** Int J Impot Res, 12 (suppl 4): S15-S25, 2000.

- COHEN, R. A.; WEISBROD, R. M.; GERICKE, M.; YAGHOUBI, M.; BIERL, C.; BOLOTINA, V.M. - **Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: Refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{++} ATPase, inhibition of store-operated Ca^{++} influx.** Circ Res, 84: 210-9, 1999.
- COLEMAN, R.A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. - **International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.** Pharmacol Rev, 46: 205-29, 1994.
- COLLIER, J.; VALLANCE, P. - **Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems.** Trends Pharmacol Sci, 10: 427-31, 1989.
- CONTI, G. - **L'érection du pénis humain et ses bases morphologico-vasculaires,** Acta Anat, 14, p. 217, 1952.
- COOK, N. S.; QUAST, U.; HOF, R. P.; BAUMLIN, Y.; PALLY, C. - **Similarities in the mechanism of action of two new basodilator drugs.** J Cardiovasc Pharmacol, 11: 90-99, 1988.
- COSTA, P.; SOULIE-VASSAL, M.L.; SARRAZIN, B.; REBILLARD, X.; NAVRATIL, H.; BALI, J.P. - **Adrenergic receptors on smooth muscle cells isolated from human penile corpus cavernosum.** J Urol, 150: 859-63, 1993.
- CROSSMAN, D.; MCEWAN, J.; MACDERMOT, J.; MACINTYRE, I.; DOLLERY, C.T. - **Human calcitonin gene-related peptide activates adenylate cyclase and releases prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells.** Br J Pharmacol, 92: 695-701, 1987.
- CROWE, R.; LINCOLN, J.; BLACKLAY, P. F.; PRYOR, J. P.; LUMLEY, J.S.; BURNSTOCK, G. - **Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive nerves in diabetic penis. A comparison between streptozotocin-treated rats and man.** Diabetes, 32: 1075-7, 1983.
- DAIL, W. G.; MCGUFFEE, L.; MINORSKY, N.; LITTLE, S. - **Responses of smooth muscle strips from penile erectile tissue to drugs and transmural field stimulation.** J Auton Pharmacol, 7: 287-293, 1987.

DAIL, W.G., **Autonomic innervation of male reproductive genitalia**, In, *The Autonomic Nervous System*, Nervous Control of the Urogenital System (Maggi CA ed) 6: 69-101, 1993, London: Harwood Academic Publishers, UK.

DAHIYA, R.; LIN, A.; BAKIRCIOGLU, M. E.; HUANG, S. T.; LUE, T. F. - **mRNA and protein expression of nitric oxide synthase and adrenoceptor alpha 1 in young and old rat penile tissues**. *Br J Urol*, 80: 300-6, 1997.

DEYSACH, L. J. - **Comparative morphology of erectile tissue of penis with especial emphasis on probable mechanism of erection**. *Am J Anat*, 64, p.111, 1939.

DORR L D & BRODY M J – **Hemodynamic mechanisms of erection in the canine penis**. *Am J Physiol*, 213: 1526-1531, 1967

ELIASSON, M. J.; BLACKSHAW, S.; SCHELL, M. J.; SNYDER, S. H. - **Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain**. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 94:3396-401, 1997.

ERDOS, E.G. - **Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years**. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*, 16: 363-70, 1990.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.- **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002.

FORSTERMANN, U.; ISHII, K.; GORSKY, L.D.; MURAD, F. - **The cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells synthesizes an EDRF-like substance that relaxes rabbit aorta**. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 340: 771-4, 1989.

FORSTERMANN U; SCHMIDT H H; POLLOCK J S; SHENG H; MITCHELL J A; WARNER T D; NAKANE M; MURAD F.- **Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types**. *Biochem Pharmacol*. 24; 42 (10):1849-57,1991a.

FORSTERMANN, U.; POLLOCK, J. S.; SCHMIDT, H. H.; HELLER, M.; MURAD, F. - **Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells**. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 1788-92, 1991b.

- FOVAEUS, M.; ANDERSSON D-E; HEDLUND, H- **Effects of some calcium channel blockers on isolated human penile erectile tissue.** J Urol, 138: 1267-1272, 1987
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. - **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** Nature, 288: 373-6, 1980.
- FURCHGOTT, R.F. – Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium derived relaxing factors is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P.M. (ed.) – **Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium.** Raven Press, New York, 1988. p.401-14.
- GARBAN, H.; VERNET, D.; FREEDMAN, A.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. - **Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats.** Am. J. Physiol., 268: 467-75, 1995.
- GOEPEL, M.; KREGE, S.; PRICE, D.T.; MICHELOTTI, G.A.; SCHWINN, D.A.; MICHEL, M.C. - **Characterization of alpha-adrenoceptor subtypes in the corpus cavernosum of patients undergoing sex change surgery.** J. Urol., 162: 1793-9, 1999.
- GONDRE, M.; CHRIST, G.J. - **Endothelin-1-induced alterations in phenylephrine-induced contractile responses are largely additive in physiologically diverse rabbit vasculature.** J Pharmacol Exp Ther, 286: 635-42, 1998.
- GONZALEZ-CADAVID, N.F.; BURNETT, A.L.; MAGGE, T.R.; ZELLER, C.B.; VERNET, D.; SMITH, N.; GITTER, J.; RAJFER, J. – **Expression of penile neuronal nitric oxide synthase variants in the rat and mouse penile nerves.** Biol Reprod, 63: 704-14, 2000.
- HAMILTON, T.C., S.W. WEIR, AND A. H. WESTON. – **Comparison of the effects of cromakalim and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein.** Br. J. Pharmacol. 88: 103-111, 1986.
- HEDLUND, P.; ALM, P.; EKSTROM, P.; FAHRENKRUG, J.; HANNIBAL, J.; HEDLUND, H.; LARSSON, B.; ANDERSSON, K.E. - **Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum.** Br J Pharmacol, 116: 2258-66., 1995.

- HEDLUND, P.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. – **NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum.** Br J Pharmacol, 127: 349-60, 1999.
- HEDLUND, P.; ASZODI, A.; PFEIFER, A.; ALM, P.; HOFMANN, F.; AHMAD, M.; FASSLER, R.; ANDERSSON, K.E. - **Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice.** Proc Natl Acad Sci USA, 97: 2349-54, 2000a.
- HEDLUND, P.; NY, L.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. - **Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase.** J Urol, 164: 868-75, 2000b.
- HIRSHMAN, C.A., EMALA, C.W. - **Actin reorganization in airway smooth muscle cells involves Gq, G12 activation of Rho.** Am J Physiol, 277: L653-61, 1999.
- HOLMQUIST F, ANDERSSON KE, HEDLUND H - **Effects of pinacidil on isolated human corpus cavernosum penis.** Acta Physiol Scand 138: 463-469, 1990a.
- HOLMQUIST, F.;ANDERSSON, K.E.; HEDLUND, H. - **Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man.** Acta Physiol Scand, 139:113-22, 1990b.
- HOLMQUIST, F.; STIEF, C. G.; JONAS, U. E ANDERSSON, K-E. - **Effects of the nitric oxide synthase inhibitor N nitro^G-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit.** Acta Physio Scand, 143: 299, 1991
- HOLMQUIST, F.;PERSSON, K.;GARCIA-PASCUAL, A.; ANDERSSON, K.E. - **Phospholipase C activation by endothelin-1 and noradrenaline in isolated penile erectile tissue from rabbit.** J Urol, 147:1632-5, 1992a.
- HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H. & ANDERSSON, K.E. - **Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man.** J Physio, 449: 295-311, 1992b.
- HSIE GC, KOLASA T, SULLIVAN JP, BRIONI JD - **Dual mechanism of action of nicorandil on rabbit corpus cavernosal smooth muscle tone.** Int J Impot Res 13: 240-246, 2001.

- HURT, K.J.; MUSICKI, B.; PALESE, M. A.; CRONE, J.K.; BECKER, R. E.; MORIARTY, J.L.; SNYDER S.H.; BURNETT, A.L. - **Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase mediates penile erection.** Proc Natl Acad Sci USA, 99: 4061-6, 2002
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS R.E. ; CHAUDHURI, G. - **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and veins ins nitric oxide.** Proc Natl Acad Sci, USA, 84: 9265-9269, 1987.
- IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G. - **Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation.** J Pharmacol Exp Ther, 244:181-9, 1988.
- IGNARRO, L.J.; BUSH, P.A.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; FUKUTO, J.M.; RAJFER, J. - **Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle.** Biochem Biophys Res Commun, 170:843-50, 1990.
- IGNARRO, L.J. E MURAD, F. (eds). Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Advances in Pharmacology**, Volume 34, pp. 1-516, Academic Press, 1995.
- IKEMOTO, F.; SONG, G.B.; TOMINAGA, M.; KANAYAMA, Y.; YAMAMOTO, K. - **Angiotensin-converting enzyme in the rat kidney. Activity, distribution, and response to angiotensin-converting enzyme inhibitors.** Nephron, 55:3-9, 1990.
- ISHIZAKI, T. - **Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases.** Mol Pharmacol., 57:976-83, 2000.
- ITALIANO, G.; CALABRO, A.; PAGANO, F. - **A simplified in vitro preparation of the corpus cavernosum as a tool for investigating erectile pharmacology in the rat.** Pharmacol Res, 30: 325-34., 1994.

- JACKSON, E.K. ; GARRISON, J.C. - **Renin and Angiotensin**. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.733-58.
- JARDIM, A.; WAGNER, G.; GIULIANO, F.; PADMA-NATHAN, H.; ROSEN, R. – **Erectile dysfunction**. Health Publication Ltda, Plymouth-United Kingdon, 2000.
- KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. - **Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle**. Pharmacol Rev, 49:157-230, 1997.
- KIELY, E.A.; BLOOM, S.R.; WILLIAMS, G. - **Penile response to intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide alone and in combination with other vasoactive agents**. Br J Urol, 64:191-4., 1989.
- KIFOR, I.; WILLIAMS, G.H.; VICKERS, M.A.; SULLIVAN, M.P.; JODBERT, P.; DLUHY, R.G. - **Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum**. J Urol, 157:1920-5, 1997.
- KIM, N.; AZADZOI K. M.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. – **A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle**. J Clin Invest, 88 : 112 - 18, 1991.
- KIM, N.; VARDI, Y.; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. - **Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection**. J Clin Invest, 91:437-42, 1993.
- KIM S Z; KIM S H; PARK J K; KOH G Y AND CHO K W – **Presence and biological activity o C-type natriuretic peptide-dependente guanylate cyclase coupled receptor in the penile corpus cavernosum**. J Urol, 159: 1741-1746, 1998.
- KIMURA, K. , ITO M, AMANO M, CHIHARA K, FUKATA Y, NAKAFUKU M, YAMAMORI B, FENG J, NAKANO T, OKAWA K, IWAMATSU A, KAIBUCHI K. - **Regulation of myosin phosphatase by Rho, Rho-associated kinase (Rho-kinase)**. Science, 273:245-8, 1996.

- KITAMURA, K.; KANGAWA, K.; KAWAMOTO, M.; ICHIKI, Y.; NAKAMURA, S.; MATSUO, H.; ETO, T. - **Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.** *Biochem Biophys Res Commun*, 192: 553-60, 1993.
- KLINGE, E.; SJOSTRAND, N.O. - **Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission; a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle.** *Acta Physiol Scand*, 100: 368-76., 1977.
- KRANE R J; GOLDSTEIN I; SAENZ DE TEJADA I – **Impotence.** *N Engl J Med*, 321: 1648-1659, 1989.
- KUBO M; NAKAYA Y; MATSUUOKA S; SAITO K; KURODA Y - **Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate thje gating of ATP-sensitive K channels in cultured vascular smooth muscle cells.** *Circ Res*, 74: 471-476, 1994.
- KUTHE, A.; MAGERT, H.; UCKERT, S.; FORSSMANN, W.G.; STIEF, C.G.; JONAS, U. - **Gene expression of the phosphodiesterases 3A and 5A in human corpus cavernosum penis.** *Eur Urol*, 38: 108 -14, 2000.
- KUTHE, A.; WIEDENROTH, A.; MAGERT, H.J.; UCKERT, S.; FORSSMANN, W.G.; STIEF, C.G.; JONAS, U. - **Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle.** *J Urol*, 165: 280-3, 2001.
- LEE, S.W.; WANG, H.Z.; ZHAO, W.; NEY, P.; BRINK, P.R.; CHRIST, G.J. - **Prostaglandin E1 activates the large-conductance K_{CA} channel in human corporal smooth muscle cells.** *Int J Impot Res*, 11:189-99, 1999a.
- LEE, S.W.; WANG, H.Z.; CHRIST, G.J. – **Characterization of ATP-sensitive potassium channels in human corporal smooth muscle cells.** *Int J Impot Res*, 11: 179-188, 1999b.
- LEFKOWITZ, R.; HOFFMAN, B.; TAYLOR, P. - The Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.105-39.
- LEVIN, R.M. ; WEIN, A.J. - **Adrenergic alpha receptors outnumber beta receptors in human penile corpus cavernosum.** *Invest Urol*, 18: 225 - 6, 1980.

- LIN, C.S.; LAU, A.; TU, R.; LUE, T.F. - **Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum.** Biochem Biophys Res Commun, 268: 628-35, 2000.
- LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. - **Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.** Pharmacol Rev, 52: 375-414, 2000.
- LUE, T.F.; TAKAMURA, T.; SCHMIDT, R.; PALUBINSKAS, A. J.; TANAGHO, E.A. - **Hemodynamics of erection in Monkey.** J Urology, 130:1237-41, 1983
- LUE, T.F.; TAKAMURA, T.; UMRAIYA, M.; SCHMIDT, R.A.; TANAGHO, E.A. - **Hemodynamics of canine corpora cavernosa during erection.** Urology, 24: 347-52, 1984.
- LUE, T.F. - **Erectile dysfunction.** N Engl J Med, 342 (24):1802-13, 2000.
- LUGG, J.; NG, C.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. - **Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity.** Am J Physiol, 271: E354-61, 1996.
- LUNDBERG, J.M. - **Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide.** Pharmacol Rev, 48: 113-78, 1996.
- MCDONALD, T.P.; DINNIS, D.M.; MORRISON, C.F.; HARMAR, A.J. - **Desensitization of the human vasoactive intestinal peptide receptor (hVIP2/PACAP R): evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalization.** Ann NY Acad Sci, 865:64-72, 1998.
- MCLEAN, P.G.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. - **Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function.** Cardiovasc Res, 48: 194-210, 2000.
- MELMAN A, CHRIST GJ - **Integrative erectile biology. The effects of age and disease on gap junctions and ion channels and their potential value to the treatment of erectile dysfunction.** Urol Clin North Am, 28: 1-10, 2001.

- MEULEMAN E J; BEMELMANS B L; VAN ASTEN W N; DOESBURG W H; DOESBURG W H; SKOTNICKI S H & DEBRUYNE F M – **Assessment of penile blood flow by duplex ultrasonography in 44 men with normal erectile potency in different phases of erection.** J Urol, 147: 51-56, 1992.
- MILLS, T.M., CHITALEY, K., WINGARD, C.J., LEWIS, R.W., WEBB, R.C. - **Effect of Rho-kinase inhibition on vasoconstriction in the penile circulation.** J Appl Physiol, 91: 1269-73, 2001.
- MINHAS, S.; CARTLEDGE, J.; EARDLEY, I. - **The role of prostaglandins in penile erection.** Prostagl Leukot Essent Fatty Acids, 62: 137-46, 2000.
- MITCHELL, J.A.; FORSTERMANN, U.; WARNER, T.D.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. - **Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation.** Biochem Biophys Res Commun, 176: 1417-23, 1991.
- MOLDERINGS, G.J.; GOTHERT, M.; VAN AHLEN, H.; PORST, H. - **Noradrenaline release in human corpus cavernosum and its modulation via presynaptic alpha 2-adrenoceptors.** Fundam Clin Pharmacol, 3: 497-504, 1989.
- MOLDERINGS, G.; MALINOWSKA, B.; SCHLICKER, E. - **Inhibition of noradrenaline release in the rat vena cava via prostanoid receptors of the EP3-subtype.** Br J Pharmacol, 107: 352-5, 1992.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. - **An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.** Nature, 263: 663-5, 1976.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M. - **Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function.** Biochem Pharmacol, 37: 2495-501, 1988.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. - **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** Pharmacol Rev, 43: 109-42, 1991.

- MONCADA IRIBARREN, I.S.D.T.; SAEZ DE TEJADA, I. - Anatomy and Physiology of Erection. In: MULCAHY, J. – **Diagnosis and Management of Male Sexual Dysfunction**. Nova York, Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc., 1997. p.12-34.
- MOON DG, BYUN HS, KIM, JJ A- **K_{ATP} channel opener as potential treatment modality for erectile dysfunction**. B J U inter 83: 837-841, 1999.
- MOORE, PK; AL-SWAYEH OA; CHONG NWS; EVANS R; MIRZAZADEH S; GIBSON A - **L-N^G-nitroarginine (L-NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery**. Br J Pharmacol, 98: 905P, 1989.
- MORELAND, R.B., NEHRA A, GOLDSTEIN I, TRAISH A - **The role of prostaglandin E as determined by expression of functional prostaglandin E receptors in human corpus cavernosum**. J Urol, 161: 218, 1999.
- MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R.W.; GRIENDLING, K.K.; RUNGE, M.S.; BERNSTEIN, K.E. - **Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor**. Nature, 351: 233-6, 1991.
- NARUMIYA, S.;SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. - **Prostanoid receptors: structures, properties, and functions**. Physiol Rev, 79: 1193-226, 1999.
- OKAMURA, T.; AYAJIKI, K.; FUJIOKA, H.; TODA, M.; FUJIMIYA, M.; TODA, N. - **Effects of endothelial impairment by saponin on the responses to vasodilators and nitrenergic nerve stimulationin isolated canine corpus cavernosum**. Br J Pharmacol, 127: 802-808, 1999.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. – **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor**. Nature, 327: 524-6, 1987.
- PENSON, D.F.;NG, C.; CAI, L.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. - **Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat**. Biol Reprod, 55: 567-74, 1996.

- PFEIFER, A.; KLATT, P.; MASSBERG, S.; NY, L.; SAUSBIER, M.; HIRNEISS, C.; WANG, G.X.; KORTH, M.; ASZODOI, A.; ANDERSSON, K.E.; KROMBACH, F.; MAYERHOFER, A.; RUTH, P.; FASSLER, R.; HOFMANN, F. - **Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice.** *Embo J*, 17: 3045-51, 1998.
- PICKARD, R.S.; POWELL, P.H.; ZAR, M.A. - **The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle.** *Br J Pharmacol*, 104: 755-9, 1991.
- PIERCE, K.L.; GIL, D.W.; WOODWARD, D.F.; REGAN, J.W. - **Cloning of human prostanoid receptors.** *Trends Pharmacol Sci*, 16: 253-6, 1995.
- POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; SCHMIDT, H.H.; NAKANE, M.; MURAD, F. - **Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10480-4, 1991.
- PORST, H. - **The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience.** *J Urol*, 155: 802-15, 1996.
- QUAST, U., AND N. S. COOK. - **In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide.** *J Pharmacol Exp Ther* 43: 474-481, 1989.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. - **Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets.** *Br J Pharmacol*, 92: 181-7, 1987.
- RAJASEKARAN, M.; MONDAL, D.; AGRAWAL, K.; CHEN, I.L.; HELLSTROM, W.; SIKKA, S. - **Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells.** *J Urol*, 160: 2210-5, 1998.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD F. - **Agonist-induce endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP.** *Circ Res*, 52: 352-357, 1983.

- REILLY, C.M.; STOPPER, V.S.; MILLS, T.M. - **J Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum.** *Androl*, 18: 26-31, 1997.
- RESS, D. D.; PALMER R. M.; MONCADA, S. - **Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 3375-8, 1989.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. - **cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells.** *Am J Physiol*, 265: C299-303, 1993.
- SAENZ DE TEJADA, I.; BLANCO, R.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; DE LAS MORENA, A.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. - **Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosumI. Responses of isolated tissue.** *Am J Physiol*, 254: H459-467, 1988.
- SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. - **Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence.** *N Engl J Med*, 320:1025-30, 1989.
- SAENZ DE TEJADA, I. - **Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum.** *Am J Physiol*, 261: H1078-85, 1991.
- SAENZ DE TEJADA, I.G.C., N; HEATON, J; HEDLUND, H; NEHRA, A; PICKARD, R S; SIMONSEN, U; STEERS, W - **Anatomy, physiology and pathophysiology of erectile function.** In: JARDIN, A.W., G; KHOURY, S; GIULIANO, F; PADMA-NATHAN, H; ROSEN, R. – **Erectile dysfunction.** Plymouth, Plymbridge Distributors Ltd., 1999. p.65-102.
- SAENZ DE TEJADA, I. - **Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contratility.** *Int. J. Impot. Res.*, 12:34-38, 2000.
- SAENS DE TEJADA, I.; ANGULO, J.; CELLEK, S.; GONZALES-CADAVID, N.; HEATON, J.; PICKARD, R.; SIMONSEN, U.- **Physiology of erectil function,** *The Journal of Sexual Medicine*, 1: 254-265, 2004
- SAH, V. P., SEASHOLTZ, T.M., SAGI, S.A., BRONW, J.H. - **The role of rho in g protein-coupled receptor signal transduction.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 40: 459-89, 2000.

- SHIRAI, M.; ISHII N.; MITSUKAWA, S.; MATSUDA, S.; NAKAMURA, M - **Hemodynamic mechanism of erection in the human penis.** Arch Androl, 1: 345- 349, 1978.
- SJOSTRAND N.O.; KLINGE E. - **Principal mechanisms controlling penile retraction and protusion in rabbits.** Acta Physiol Scand., 106(2): 199-214, 1979.
- SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; HERNANDEZ, M.; SAENZ DE TEJADA, I.; GARCIA-SACRISTAN, A. - **Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrergic neurotransmission in horse penile resistance arteries.** J. Urol., 157:2356-60., 1997.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. - **Signal transduction and regulation in smooth muscle.** Nature, 372: 231-6., 1994.
- SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V - **From pharmacomechanical coupling to G-proteins, myosin phosphatase: A review.** Acta Physiol Scand., 164: 437-48, 1998.
- SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V - **Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase protein phosphatase to smooth muscle, non-muscle myosin II: A review.** J Physio., 522: 177-85, 2000.
- SPEKTOR M, RODRIGUEZ R, ROSENBAUM R S, WANG H, MELMAN A, CHRIST, GJ - **Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone; Further evidence of the physiological relevance of the Maxi-K channel subtype to the regulation of human corporeal smooth muscle tone in vitro.** J Urol 167: 2628-2635, 2002.
- STIEF, C.G.; BENARD, F.; BOSCH, R.J.; ABOSEIF, S.R.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. - **Acetylcholine as a possible neurotransmitter in penile erection.** J. Urol., 141: 1444-8, 1989.
- STIEF, C.G.; BENARD, F.; BOSCH, R.J.; ABOSEIF, S.R.; LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. - **A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis.** J. Urol., 143: 392-7, 1990.
- STIEF, C.G.; WETTERAUER, U.; SCHAEBSDAU, F.H.; JONAS, U. - **Calcitonin-gene-related peptide: a possible role in human penile erection and its therapeutic application in impotent patients.** J. Urol., 146: 1010-4, 1991.

SWANSON, G.N.; HANESWORTH, J.M.; SARDINIA, M.F.; COLEMAN, J.K.; WRIGHT, J.W.; HALL, K.L.; MILLER-WING, A.V.; STOBBS, J.W.; COOK, V.I.; HARDING, E.C.; ET AL. - **Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor.** Regul. Pept., 40:409-19, 1992.

TAYLOR, P. - Anticholinesterase Agents. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.161-75.

TANIGUCHI J, FURUKAWA KI, SHIGEKAWA M - **Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells.** Pfluegers Arch 463: 167-72, 1993.

TOH, H.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. - **Molecular evolution of receptors for eicosanoids.** FEBS Lett, 361:17-21, 1995.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. - **Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells.** Pharmacol Rev, 52: 639-72, 2000.

TRAISH, A.M.; NETSUWAN, N.; DALEY, J.; PADMAN-NATHAN, H.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. - **A heterogeneous population of alpha 1 adrenergic receptors mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine.** J. Urol., 153: 222-7, 1995a.

TRAISH, A.M.; PALMER, M.S.; GOLDSTEIN, I.; MORELAND, R.B. - **Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells.** Receptor, 5: 159-76, 1995b.

TRAISH, A.M.; MORELAND, R.B.; HUANG, Y.H.; GOLDSTEIN, I. - **Expression of functional alpha2-adrenergic receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured trabecular smooth muscle cells.** Recept. Signal. Transduct., 7: 55-67, 1997.

TRAISH, A., KIM, N.N., MORELAND, R.B., GOLDSTEIN, I. - **Role of alpha adrenergic receptors in erectile function.** Impot Res 12S1: S48-63, 2000.

- TRIGO-ROCHA, F.; HSU, G.L.; DONATUCCI, C.F.; LUE, T.F. - **The role of cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, endothelium and nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in canine penile erection.** J Urol, 149: 872-7, 1993a.
- TRIGO-ROCHA F, ARONSON W J, HOHENFELLNER M, IGNARRO L J, RAJFER J AND LUE TF - **Nitric Oxide and cGMP; mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs.** Am. J. Physiol. 264: H419-H422, 1993b.
- TRIGO-ROCHA, F.; HSU, G.L.; DONATUCCI, C.F.; MARTINEZ-PINEIRO, L.; LUE, T.F. e TANAGHO, E.A. - **Intracellular mechanism of penile erection in monkeys.** Neurourol Urodyn, 13: 71, 1994.
- UEHATA, M. , ISHIZAKI T, SATOH H, ONO T, KAWAHARA T, MORISHITA T, TAMAKAWA H, YAMAGAMI K, INUI J, MAEKAWA M, NARUMIYA S.. - **Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho associated protein kinase in hypertension.** Nature, 389: 990-4,1997.
- UHLER, M.D. - **Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain.** J. Biol. Chem., 268:13586-91, 1993.
- VANE, J.R. - **The release and fate of vaso-active hormones in the circulation.** Br J Pharmacol, 35:209-42, 1969.
- VIEIRA, S.- **Estatística experimental.** 2. ed. São Paulo: Atlas, 1999.
- WAGNER G.(1981) - **Erection. Physiology and Endocrinology.** In: Impotence, Physiological, Psychological, Surgical Diagnosis and Treatment, edited by G. Wagner and R. Green. New York, Plenum , chapt. 3, 24-36.
- WAGNER, G.; GERSTENBERG, T.; LEVIN, R.J. - **Electrical activity of corpus cavernosum during flaccidity and erection of the human penis: a new diagnostic method?** J. Urol., 142:723-5, 1989.
- WALDMAN, S.A., e MURAD, F. - **Cyclic GMP synthesis and function.** Pharmacol. Rev., 39: 163-196, 1987.

WANG H.Z., LEE SW,CHRIST G,J, - **Comparative studies of the maxi-K channel in freshly isolated myocytes of human an rat corpora. .** Int. J. Impo. Res. , 12: 9-18, 2000.

WEBER, D.S., WEBB, R.C. - **Enhanced relaxation to the Rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats.** Pharmacology, 63: 129-33, 2001.

YANAGISAWA, M.; INOUE, A.; ISHIKAWA, T.; KASUYA, Y.; KIMURA, S.; KUMAGAYE, S.; NAKAJIMA, K.; WATANABE, T.X.; SAKAKIBARA, S.; GOTO, K.; ET AL. - **Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6964-7, 1988.

BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

Normas, procedimentos e orientações para publicação de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 2004.

8- ANEXOS

ROLE OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE-DEPENDENT POTASSIUM CHANNELS IN CANINE PENILE ERECTION

ALISTER DE MIRANDA CARÁ, ADRIANO FREGONESI, EDSON ANTUNES, GILBERTO DE NUCCI,
AND NELSON RODRIGUES NETTO, JR

ABSTRACT

Objectives. To define the physiologic role and hemodynamic features of nitric oxide (NO) and the adenosine triphosphate (ATP)-dependent K^+ (K_{ATP}) channel in canine penile erection.

Methods. Mongrel dogs were anesthetized, and penile erection was induced by electrical stimulation of the pelvic nerve. Changes in the intracavernous pressure (ICP) were measured with a transducer.

Results. The basal ICP was 12.8 ± 5.0 mm Hg. Pelvic nerve stimulation (5 to 20 V, 5 to 15 Hz, for 1-minute intervals) significantly increased the ICP to 86.2 ± 11.4 mm Hg ($n = 5$, $P < 0.05$). Treatment with the NO synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester (10 mg/kg intravenously) abolished this increase (15.4 ± 5.0 mm Hg, $n = 5$). Intracavernous injection of the K_{ATP} channel opener cromakalim (3 and 10 μ g) increased the ICP (103 ± 14.4 mm Hg and 106 ± 12.1 mm Hg, respectively; $n = 4$). This response was abolished by the prior intracavernous injection of the selective K_{ATP} channel-specific blocker glibenclamide (10 mg). Glibenclamide did not affect the increase in ICP induced by electric stimulation of the pelvic nerve (88 ± 24.2 mm Hg).

Conclusions. Our results indicate that relaxation of canine cavernous smooth muscle and penile tumescence are mediated by NO. The failure of glibenclamide to affect the increase in ICP induced by pelvic nerve stimulation suggests that ATP-dependent K^+ channels probably do not play a physiologic role in canine penile erection. UROLOGY 64: 603–607, 2004. © 2004 Elsevier Inc.

A decrease in penile vascular resistance caused by corporal smooth muscle relaxation is the most important step in penile erection.^{1,2} The tone of the corpora cavernosa is a major determinant in the control of the flaccid and erect penile states. The modulation of corporal smooth muscle tone is a complex process requiring the integration of a variety of intracellular events and extracellular signals.³ Evidence that gap junctions, potassium channels, and calcium channels are major modulators of smooth muscle tone in corporal smooth muscle^{4–6} and many other vascular tissues^{9–12} is considerable. During sexual stimulation, nitric oxide (NO) is released from nonadrenergic-noncholinergic nerve endings and local endothelial cells in

the erectile tissue.¹³ Regardless of the source, NO activates smooth muscle cell soluble guanylate cyclase to increase the levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP).^{14,15} The increase in cGMP activates cGMP-dependent protein kinase, causing subsequent relaxation of the smooth muscle through phosphorylation events mediated by cGMP-dependent protein kinase.¹⁵ NO-cGMP-mediated relaxation involves various mechanisms, including hyperpolarization produced by activation of membrane K^+ channels, leading to a K^+ efflux, and a reduction in the Ca^{2+} influx through voltage-operated plasma membrane Ca^{2+} channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channels.^{16–20}

K^+ channels play a fundamental role in the physiologic and pathophysiologic regulation of smooth muscle tone in various tissues.^{21,22} At least four K^+ channel subtypes are present in corporal smooth muscle: (a) the Ca^{2+} -sensitive K^+ channel (K_{Ca} or maxi- K); (b) the metabolically regulated (or adenosine triphosphate [ATP]-dependent) K^+ channel (K_{ATP}); (c) the delayed rectifier; and (d) the fast

From the Discipline of Urology and Department of Pharmacology, State University of Campinas Faculty of Medical Sciences, Campinas, São Paulo, Brazil

Reprint requests: Alister M. Cará, M.D., Discipline of Urology, State University of Campinas Faculty of Medical Sciences, Avenue Anchieta 671, São José dos Campos, São Paulo 12242-280, Brazil

Submitted: February 5, 2004, accepted (with revisions): April 23, 2004

transient A current.^{22,23} Of these, the K_{ATP} and Ca^{2+} -sensitive K^+ channel subtypes are thought to be the most physiologically relevant in human corporal smooth muscle.^{22,23} Studies in vitro have shown that the large conductance, voltage-dependent Ca^{2+} -sensitive K^+ channel has an important role in modulating human corporal smooth muscle tone and has potential relevance in erectile physiology, dysfunction, and, perhaps, therapy.²⁴ Experimental evidence has shown that K_{ATP} channels can modulate erectile function.²³ The activation of these channels results in hyperpolarization of arterial smooth muscle cells during anoxia and ischemia, when intracellular ATP levels fall.²³ However, more relevant to erectile function is the observation that NO activates K_{ATP} channels in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent mechanism.²⁵ The K_{ATP} channel activator pinacidil is effective in relaxing isolated human erectile tissue.²⁶ Nicorandil, a K^+ channel opener and NO donor, relaxes rabbit cavernosal tissue by a mechanism that involves activation of K_{ATP} channels and stimulation of soluble guanylate cyclase.²⁷ More recently, use of the K^+ channel opener pinacidil alone or in combination with prostaglandin E_1 has been proposed for the diagnosis and treatment of erectile dysfunction.²⁸ On the basis of these studies, we investigated the potential physiologic role of NO and K_{ATP} channels in the canine penile erection in vivo.

MATERIAL AND METHODS

PROTOCOL A: NO-CGMP PATHWAY AND INTRACAVERNOUS PRESSURE

Male mongrel dogs (9.2 ± 0.7 kg, $n = 5$) were anesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal, 30 mg/kg intravenously), intubated, and artificially ventilated with room air. Supplemental doses of anesthetic were administered as required. The left femoral artery was cannulated for the measurement of mean arterial blood pressure. The catheter was connected to a pressure transducer (PRC 21/3, Ugo Basile, Italy) and polygraph (Gemini 7082, Ugo Basile, Italy). An angiocatheter was inserted into the left femoral vein for saline infusion (10 mg/kg/hr) and drug administration or supplemental doses of anesthetic, as required. The penis was carefully denuded of skin down to the base, and the right corpus cavernosum was exposed. Two 21-gauge scalp-vein needles, filled with heparinized saline (15 to 20 U/mL), were inserted into the corpus cavernosum for drug administration and measurement of the intracavernosal pressure (ICP) using a pressure transducer (PRC 21/3). The bladder was cannulated and completely emptied to prevent urine accumulation. The abdomen was opened through a midline abdominal incision. The right pelvic nerve, located superior and lateral to the prostate, was located and carefully picked up with a platinum hoop (manufactured in our laboratory) that was connected to a nerve stimulator (model S48, Grass Instruments).

The pelvic nerve was stimulated with 1.0 ms of electrical square pulses at 5 and 20 V and frequencies of 5 and 15 Hz for 1-minute intervals. Nerve stimulation increased the intracavernous pressure through dilation of the corpus cavernosum. This was used as an index of penile erection.

After determining the most appropriate stimulus parameters, the pelvic nerve was stimulated in three blocks with a 10-minute recovery between each session to restore the basal erectile response. After the return to basal conditions, N^{ω} -nitro-D-arginine methyl ester (10 mg/kg), an inactive enantiomer of N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), L-NAME (10 mg/kg, a structural analogue of L-arginine that inhibits NO synthase), D-arginine (300 mg/kg, inactive precursor of L-arginine), and L-arginine (300 mg/kg, NO precursor) were injected intravenously, and the nerve stimulation was repeated 5, 10, 15, 20, and 30 minutes after each drug administration. At the end of the experiment, papaverine (700 μ g/kg) was injected intracavernously to evaluate the integrity of the cavernous tissue.

PROTOCOL B: K_{ATP} CHANNELS AND ICP

Male mongrel dogs (10 ± 1.4 kg, $n = 4$) were anesthetized with sodium pentobarbital (Sagatal, 30 mg/kg intravenously), intubated, and artificially ventilated with room air. The experiments were done essentially as described above using the same conditions and protocol for pelvic nerve stimulation. After the basal ICP had stabilized, the pelvic nerve was stimulated with square-wave pulses (5 to 10 Hz, 5 V, 1-ms pulses for 1-minute intervals) to generate a predrug ICP response. Fifteen minutes later, cromakalim (3 and 10 μ g) was injected intracavernously followed by recording of the ICP responses for 30 minutes. After the intracavernous injection of glibenclamide (10 mg, pH 7.0), cromakalim (10 μ g) was administered, and the cavernous nerve stimulation was repeated. To end the experiment, papaverine (700 μ g/kg) was injected intracavernously to evaluate the integrity of the cavernous tissue.

STATISTICAL ANALYSIS

The results are expressed as the mean $\pm$ SEM for n experiments. Analysis of variance and Student's unpaired t test were used to compare the data for the different treatments. A value of $P < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

PROTOCOL A

Pelvic nerve stimulation increased the ICP after a brief latency period. This increase was maintained during stimulation and decreased rapidly when stimulation was stopped. The intravenous injection of L-NAME (10 mg/kg) inhibited the increase in ICP after pelvic nerve stimulation by 82%. The subsequent injection of L-arginine (300 mg/kg intravenously) partially reversed the inhibition by L-NAME and restored the increase in ICP induced by pelvic nerve stimulation (Table I). Neither the inactive enantiomer D-NAME (10 mg/kg) nor D-arginine (300 mg/kg intravenously) affected the ICP responses. A typical tracing of the pressor response to pelvic nerve stimulation before and after treatment with L-NAME is shown in Figure 1.

PROTOCOL B

Pelvic nerve stimulation (5 V, 5 to 10 Hz) significantly increased the ICP to 105 ± 8.7 mm Hg (latency 10 ± 1 second) compared with the basal

TABLE I. Inhibition of pelvic nerve-stimulated* tumescence by L-NAME with reversal by L-arginine but not D-arginine†

Variable	Control	D-NAME (10 mg/kg)	L-NAME (10 mg/kg)	D-Arginine (300 mg/kg)	L-Arginine (300 mg/kg)
ICP basal (mm Hg)	12.8 ± 5.0	12.8 ± 5.0	12.0 ± 4.9	7.7 ± 1.4	11.2 ± 4.0
Δ ICP/NS (mm Hg)	86.2 ± 11.4 [‡]	79.8 ± 12.5 [‡]	15.4 ± 5.0 [§]	10.0 ± 1.1 [§]	51.0 ± 11.1 ^{‡§}
Latency (s)	8.8 ± 2.9	7.2 ± 1.9	ND	ND	14.2 ± 5.4
MABP (mm Hg)	90 ± 7.5	92 ± 6.3	104 ± 8.1	96 ± 9.2	98 ± 5.1

Key: L-NAME = N^ω-nitro-L-arginine methyl ester; ICP = intracavernous pressure; NS = nerve stimulation; ND = not determined; MABP = mean arterial blood pressure. Data presented as mean ± SEM (n = 5).

* 5–20 V, 5–15 Hz, 1 minute in duration, 1-ms pulses.

† Latency until beginning of response and effect of drugs on MABP also shown.

[‡] P < 0.05 vs. basal.

[§] P < 0.05 vs. control.

^{||} P < 0.05 vs. L-NAME.

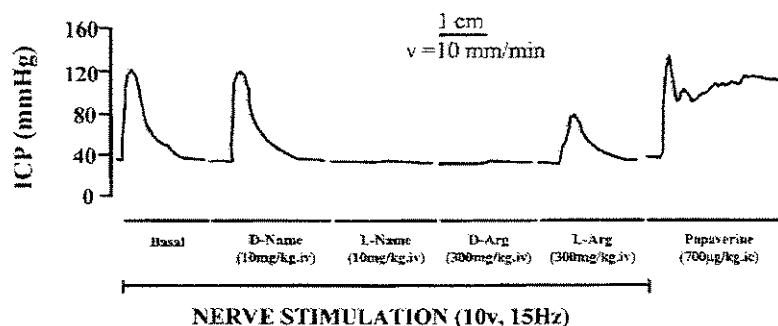


FIGURE 1. Representative tracings of ICP illustrating inhibitory effect of NO synthase inhibitor L-NAME on tumescence caused by stimulation of pelvic nerve. Inhibition significantly reversed by intravenous injection of L-arginine but not by D-arginine.

TABLE II. Effects of cromakalim, and pelvic nerve stimulation on ICP before and after intracavernous injection of glibenclamide*

Variable	Control	NS [†]	CK (3 µg)	CK (10 µg)	CK + Gli (10 mg)	NS + Gli (10 mg)	Papaverine (700 µg)
ICP (mm Hg)	12.8 ± 5.0	105 ± 8.7 [‡]	103 ± 14.4 [‡]	106 ± 12.1 [‡]	12.6 ± 3.0 [§]	88 ± 24.2 [‡]	100 ± 14.0 [‡]
Latency (s)	ND	10 ± 1.0	65 ± 8.5	48 ± 5.0	ND	22 ± 6.0	12 ± 7.0
MABP (mm Hg)	102 ± 4.5	114 ± 6.3	114 ± 8.1	115 ± 9.2	112 ± 5.1	112 ± 7.5	112 ± 5.1

Key: CK = cromakalim; Gli = glibenclamide; other abbreviations as in Table I.

Data presented as mean ± SEM (n = 4).

* Latency until beginning of response and effect of drugs on MABP also shown.

[†] 5–10 Hz, 5 V, 1 minute in duration, 1-ms pulses.

[‡] P < 0.05 vs. control.

[§] P < 0.05 vs. CK 10 µg.

values (12.8 ± 5 mm Hg, P < 0.05). Cromakalim (3 and 10 µg) also increased the ICP (103 ± 14.4 mm Hg, latency 65 ± 8 seconds, and 106 ± 12.1 mm Hg, latency 48 ± 5 seconds, respectively). The cromakalim-induced responses were abolished by glibenclamide (10 mg per corpus cavernosum) without affecting the increase in ICP induced by pelvic nerve stimulation (88 ± 24.2 mm Hg, latency 22 ± 6 seconds; Table II). A typical tracing of the pressor response to pelvic nerve stimulation and the intracavernous injection of cromakalim before and after treatment with glibenclamide is shown in Figure 2.

COMMENT

Previous work has suggested that erection induced by cavernous nerve stimulation in dogs is the best model for studying the hemodynamic parameters of penile erection.²⁹ Our results confirmed previous evidence of an L-arginine-NO-cGMP pathway in penile erection.³⁰ Direct pelvic nerve stimulation in dogs led to cavernous smooth muscle relaxation and penile erection, as measured by an increase in ICP. This increase was abolished by pretreatment with the NO synthase inhibitor L-NAME (but not with the inactive enantiomer D-

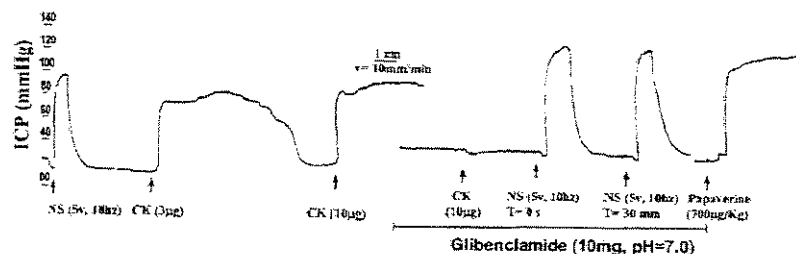


FIGURE 2. Representative tracing of increase in ICP after pelvic nerve stimulation (NS) and intracavernous injection of cromakalim (CK) before and after administration of glibenclamide in anesthetized dogs. T = time after injection.

NAME). These findings confirmed and extended previous observations that had indicated a major role for NO in the relaxation of canine cavernous smooth muscle.

The intracavernous injection of cromakalim significantly and dose dependently increased the ICP of anesthetized dogs. These results confirmed the presence of functional K_{ATP} channels in the erectile tissue of the dog corpus cavernosum. The most interesting finding of this study was the differential effects of the intracavernous injection of glibenclamide. The increase in ICP caused by the intracavernous injection of cromakalim was blocked by glibenclamide, but the latter had no effect on the response to pelvic nerve stimulation. This inability of glibenclamide to affect the increase in ICP (penile erection) induced by pelvic nerve stimulation suggests that K_{ATP} channels are unlikely to play a major role in penile erection in dogs.

REFERENCES

- Andersson KE, and Wagner G: Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75: 191-236, 1995.
- Lerner SE, Melman A, and Christ GJ: A review of erectile dysfunction: new insights and more questions. *J Urol* 149: 1246-1255, 1993.
- Christ GJ: The penis as a vascular organ: the importance of corporal smooth muscle tone in the control of erection. *Urol Clin North Am* 22: 727-745, 1995.
- Christ GJ, Moreno A, Parker ME, *et al*: Intercellular communication through gap junctions: a potential role in pharmacomechanical coupling and syncytial tissue contraction in vascular smooth muscle isolated from the human corpus cavernosum. *Life Sci* 49: PL195-PL200, 1991.
- Christ GJ, Moreno AP, Melman A, *et al*: Gap junction-mediated intercellular diffusion of Ca^{2+} in cultured human corporal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263: C373-C383, 1992.
- Christ GJ, Brink PR, Melman A, *et al*: The role of gap junctions and ion channels in the modulation of electrical signals in human corpus cavernosum smooth muscle. *Int J Impot Res* 5: 77-96, 1993.
- Christ GJ: K^+ channels and gap junctions in the modulation of corporal smooth muscle tone. *Drug News Perspect* 13: 28-36, 2000.
- Cho CK, Suh JK, Chang TG, *et al*: Effect of calcium channel blockers on penile erection in vivo. *J Urol* 151: 321A, 1994.
- Brayden JE, and Nelson MT: Regulation of arterial tone by activation of calcium dependent potassium channels. *Science* 256: 532-535, 1993.
- Christ GJ, Brink PR, Zhao W, *et al*: Gap junctions modulate tissue contractility and alpha adrenergic agonist efficacy in isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1054-1065, 1993.
- Ishikawa T, Hume JR, and Keef KD: Regulation of Ca^{2+} channels by CAMP and CGMP in vascular smooth muscle. *Circ Res* 73: 1128-1137, 1993.
- Longman SD, and Hamilton TC: Potassium channels activator drugs: mechanism of actions, pharmacological properties, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 12: 73-148, 1992.
- Bloch W, Klotz T, Sedlacek P, *et al*: Evidence for the involvement of endothelial nitric oxide synthase from smooth muscle cells in the erectile function of human corpus cavernosum. *Urol Res* 26: 129-135, 1998.
- Sanders DB, Kelly T, and Larson D: The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion* 15: 97-104, 2000.
- Christ GJ, Brink PR, and Ramnan SV: Neuronal innervation, signal transduction and erection. *J Urol* 155: 620A, 1996.
- Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, *et al*: cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265: C299-C303, 1993.
- Taniguchi J, Furukawa KI, and Shigekawa M: Maxi K^+ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pfluegers Arch* 463: 167-172, 1993.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, *et al*: Nitric oxide directly activates potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.
- Archer SL, Huang JM, Nelson DP, *et al*: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charbydotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7583-7587, 1994.
- Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, *et al*: Mechanism of nitric oxide-induced vasodilation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{++} ATPase, inhibition of store-operated Ca^{++} influx. *Circ Res* 84: 210-219, 1999.
- Christ GJ, Richards S, and Winkler A: Integrative erectile biology: the role of signal transduction and cell-to-cell communication in coordinating corporal smooth muscle tone and penile erection. *Int J Impot Res* 9: 69-84, 1997.

22. Melman A, and Christ GJ: Integrative erectile biology: the effects of age and disease on gap junctions and ion channels and their potential value to the treatment of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* 28: 1–10, 2001.
23. Archer SL: Potassium channels and erectile dysfunction. *Vasc Pharmacol* 38: 61–71, 2002.
24. Spektor M, Rodriguez R, Rosenbaum RS, *et al*: Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: further evidence of the physiological relevance of the Maxi-K channel subtype to the regulation of human corporeal smooth muscle tone in vitro. *J Urol* 167: 2628–2635, 2002.
25. Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, *et al*: Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 471–476, 1994.
26. Holmquist F, Andersson KE, and Hedlund H: Effects of pinacidil on isolated human corpus cavernosum penis. *Acta Physiol Scand* 138: 463–469, 1990.
27. Hsie GC, Kolasa T, Sullivan JP, *et al*: Dual mechanism of action of nicorandil on rabbit corpus cavernosal smooth muscle tone. *Int J Impot Res* 13: 240–246, 2001.
28. Moon DG, Byun HS, and Kim JJ: A K_{ATP} channel opener as a potential treatment modality for erectile dysfunction. *BJU Int* 83: 837–841, 1999.
29. Carter AJ, Ballard SA, and Naylor AM: Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile function in the anesthetized dog. *J Urol* 160: 242–246, 1998.
30. Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, *et al*: Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol* 264: H419–H422, 1993.