

91  
*JULIANA SIGNORI BARACAT*

*AVALIAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DOS EFEITOS DO  
ATIVADOR DE GUANILIL CICLASE SOLÚVEL  
BAY 41-2272 NA EREÇÃO PENIANA*

*Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado,  
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -  
UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da  
Farmacêutica – Juliana Signori Baracat.*

*Campinas, 06 de julho de 2006.*

  
*Prof. Dr. Gilberto de Nucci  
- Orientador -*

*CAMPINAS, 2006*

**JULIANA SIGNORI BARACAT**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DO  
ATIVADOR DE GUANILIL CICLASE SOLÚVEL  
BAY 41-2272 NA EREÇÃO PENIANA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-  
Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do Título de  
Doutor em Farmacologia.*

**ORIENTADOR:** *Gilberto De Nucci*

*wcd@unicamp.br  
cpqio@com.unicamp.br*

**CAMPINAS, 2006**

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

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

UNIVERSIDADE	BC
FACULDADE	TI/UNICAMP
CLASSIFICAÇÃO	B23a
EX	
BOB/	71138
C/	06-195-07
D	A
CO	11-00
D	171107
D	396304

B23a	Baracat, Juliana Signori Avaliação in vitro e in vivo dos efeitos do ativador de guanilil ciclase solúvel BAY 41-2272 na ereção peniana / Juliana Signori Baracat. Campinas, SP : [s.n.]. 2006.
	Orientador: Gilberto De Nucci Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	1. Óxido Nítrico. 2. Disfunção erétil. 3. Corpo cavernoso. I.Nucci, Gilberto De. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: In vitro and in vivo effects of the soluble guanilyl cyclase stimulator BAY 41-2272 on penile erection**

**Keywords:** • Nitric oxide  
• Erectile dysfunction  
• Corpus cavernosum

**Titulação: Doutorado em Farmacologia**

**Banca examinadora: Prof. Dr. Gilberto De Nucci**  
**Prof. Dr. Ubirajara Ferreira**  
**Profa. Dra. Angelina Zanesco**  
**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**  
**Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins**

**Data da defesa: 06-07-2006**



UNICAMP

---

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

---

Orientador:

---

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

---

---

Membros:

---

Prof. Dr. Gilberto De Nucci

---

Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

---

Prof. Dra. Angelina Zanesco

---

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

---

Prof. Dr. Rodrigo Lopes Martins Brandão

---

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 06/07/2006

---

## *DEDICATÓRIA*

*A Deus, Autor da Vida e Razão da minha existência,  
que, através de Seu filho Jesus Cristo, me ama incondicionalmente,  
me dá provas desse amor a todo instante e que,  
ao longo de toda minha caminhada,  
não andou ao meu lado...  
carregou-me no Colo.*

*À Nossa Senhora, Mãe de Jesus e minha Mãe, Poderosa Intercessora,  
que a todo instante esteve atenta às minhas necessidades,  
por sua proteção e por todas as graças alcançadas em minha vida.*

*Aos meus pais,  
Jorge e Marly  
Alegrias de minha vida,  
de quem Deus me deu a HONRA de ser filha,  
responsáveis pela formação do meu SER,  
meus heróis, meus exemplos, meus educadores,  
Professores Doutores na arte de Amar e de Doar-se:  
meu amor por vocês é infinito...incomparável...  
e minha gratidão, eterna....*

*Ao meu marido Gustavo*

*“ depois de ter você...pra que querer saber que horas são...  
se é noite ou faz calor...se estamos no verão...  
se o Sol virá ou não ....  
ou pra que é que serve uma canção como esta...”*

*Obrigada por seu amor incondicional , por sua presença constante,  
pela compreensão, respeito, dedicação e apoio infinitos.*

*Te amo...sempre e mais....*

*Ao meu irmão André,  
“meu amigo de fé, meu irmão camarada...  
amigo de tantos caminhos, de tantas jornadas...”  
testemunha de meus primeiros passos...  
em quem sempre me espelhei nos estudos e na competência profissional,  
e por quem possuo um amor imenso e eterno...*

*E à minha cunhada Hellen,  
que me deu a alegria de fazer parte de minha família  
e a quem considero e adoro como irmã...*

## *Agradecimentos*

*A toda minha família, aquela que é e sempre será a estrutura fundamental para o meu crescimento como pessoa e meu porto seguro. A vocês, que compartilham minha vida, meus sonhos, meu caminho, ofereço minha gratidão pelo apoio diário, pela torcida constante e pelo amor infinito.*

*Ao Prof. Dr. Gilberto De Nucci, por sua orientação, por todo crescimento que isto me proporcionou, pela acolhida, apoio e oportunidade inigualáveis que permitiram a realização deste trabalho e a conclusão deste Doutorado.*

*Ao Prof. Dr. Edson Antunes, por tê-lo conhecido, por sua amizade, orientação e contribuição generosas e fundamentais para o desenvolvimento deste projeto e pela dedicação exemplar ao trabalho e aos amigos ao longo desses anos.*

*Ao Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira, grande amigo, que me recebeu com tanto empenho e com quem tive a honra de aprender tudo o que foi necessário para o desenvolvimento deste e de todos os outros trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório. Obrigada pela amizade, orientação e por todas as portas abertas em meu favor, em todos os sentidos. Serei eternamente grata e admiradora da sua competência, dedicação, humildade e generosidade aplicadas em tudo o que faz. Conte sempre comigo.*

*À Prof. Dra. Angelina Zanesco pela alegria, pela amizade constante, pelo carinho e respeito dedicados a mim, por todas as experiências compartilhadas, pelas oportunidades e pela contribuição fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela amizade diária e pela disponibilidade e auxílio na realização de determinados experimentos.*

*Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Jr. pela amizade diária e contribuição na finalização deste trabalho.*

*Ao Prof. Marcos Dias Fontana (Marcão – in memoriam) por sua simpatia e amizade, e por todas as vezes que me permitiu aumentar minha experiência didática, podendo ministrar aulas em seus cursos.*

*À Prof. Dra. Alice Bricola, pelo exemplo de pessoa e profissional em quem sempre me espelhei e por todos os conselhos dados com tanta ternura e amizade, durante esses anos de convivência, meu agradecimento e admiração.*

*A Profa. Dra. Maria Ondina Pagani, grande professora e amiga, que foi o elo fundamental entre mim e a UNICAMP, por todo o apoio e incentivo.*

*À amiga Juliana Moreira, pela nossa amizade instantânea, pela generosidade com que me recebeu e me apresentou pela primeira vez à minha equipe de trabalho, pela amizade e por todos os momentos compartilhados a partir desse dia.*

*Aos amigos maravilhosos, anjos de Deus, Daniel e Roberta, para os quais não tenho palavras para definir o quanto são importantes em minha vida. Por todo apoio, torcida e por todos os momentos vividos em todos estes anos de amizade. Vocês foram um dos maiores presentes de Deus pra mim.*

*À querida amiga e afilhada Cristina E. Okuyama, que, com toda certeza, por obra Divina, encontrou-se comigo aqui nesta Universidade, para um laço eterno de amizade. A você, toda a minha admiração pela coragem, garra, competência e dedicação com que costuma vencer todos os obstáculos da sua caminhada e pelo exemplo de mulher e profissional que representa. Serei eternamente grata pela sua presença especial em minha vida, em todos os momentos e em todos os sentidos. Estaremos juntas pra sempre.*

*A Leticia Lintomen, carioca super-poderosa, e da gema com muito “orrrrrgulho”, pela sua alegria, dinamismo, pelo nosso encontro, por todo o respeito e carinho com que nos aproximamos e nos tornamos grandes amigas, e por todos os momentos divididos, de maneira tão especial. Muito obrigada, Lelê, por, hoje, também fazer parte da minha família.*

*Aos amigos Carla Penteado, Enilton Camargo e Raquel Lorenzetti pela amizade generosa e fiel, pelo exemplo de profissionais e por toda ajuda desempenhada com tanto amor em determinados experimentos deste trabalho.*

*A todos os grandes amigos de laboratório com quem dividi diretamente todos esses anos e com quem tive o prazer de conviver (galera da CASCATA): Fernanda Priviero (Fê), Mário Ângelo Claudino (Marinho), Haroldo (Harold), Camila Moraes (Cami), Maria Andréia Delbin (Ná), Rafael Annovazzi (Rafazildo), Fabíola Mônica Zacchia (Fá), Fernando Bau (BAU), Clésio Penna, pela amizade e companhia diárias, pelo respeito e ajuda indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho, e por serem portadores daquilo que mais enobrece o ser humano: a Alegria.*

*A todos os meus amigos da UNICAMP, companheiros de todas as horas: Aline, Rafael Morgantti, Ivani, Tatiane, Elen, Sara, Sisi, Ana Cecília, Fernanda e Marcelo Datti, Luis Gustavo, Nádia, Lineu, Priscila, Fábio, Luis Otávio, Leyge, Sergio Lilla, Juliano de Oliveira, Renato Faro, Renata Pennachin, Letícia Bignotto, Luciana Jankowisk, pela companhia diária e por terem feito, cada um a seu modo, meus dias mais bonitos.*

*Ao amigo Reginaldo Candido da Silva e ao Laboratório de Prótese Francisco Zeferino pela competência com que confeccionaram determinados aparatos laboratoriais que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos funcionários S. Miguel e Marcos por toda a dedicação e cuidado com os animais no biotério que permite o desenvolvimento dos projetos deste departamento.*

*A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP por todo respeito, carinho e dedicação com que sempre me receberam e por todos os momentos de ajuda indispensável: Wanderlei, Elaine, Fran, Toninho, Guina, José Hilton e Adilson.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho.*

*“Pouca ciência afasta de Deus. Muita, a Ele reconduz.”*

*Louis Pasteur*

# *SUMÁRIO*

Lista de abreviaturas.....	xxvii
Lista de materiais.....	xxix
Lista de figuras.....	xxxI
Lista de tabelas.....	xxxvii
Resumo.....	xxiv
Abstract.....	xli
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
1.1 Fisiologia da Ereção Peniana.....	48
1.1.1 Anatomia Peniana.....	48
1.1.2 Neuroanatomia Peniana: Vias Periféricas.....	49
1.1.2.1 Vias Autonômicas.....	49
1.1.2.2 Vias Somáticas.....	50
1.1.3 Hemodinâmica e Mecanismo da Ereção e Detumescência.....	51
1.2 Óxido Nítrico e a Ereção Peniana.....	54
1.2.1 Biossíntese de NO.....	56
1.2.2 Guanilil ciclase solúvel e o mecanismo de sinalização do NO..	58
1.3 BAY 41-2272 : um novo ativador de guanilil ciclase solúvel em sítio independente de NO.....	60
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
Objetivos gerais.....	63
Objetivos Específicos.....	64

---

---

<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
2.1 Preparação de Corpo cavernoso de Coelho.....	67
2.2 Preparação de Corpo Cavernoso Humano.....	67
2.3 Preparação de Corpo cavernoso de Rato.....	68
2.4 Banho Isolado de Corpo Cavernoso.....	68
2.5 Protocolos Experimentais <i>in vitro</i> .....	69
2.6 Dosagem de GMPc em Corpo Cavernoso Isolato de Rato.....	71
2.7 Monitoramento da pressão intracavernosa em ratos anestesiados – Experimentos <i>in vivo</i> .....	72
2.8 Protocolos experimentais <i>in vivo</i> .....	73
2.9 Cálculos dos experimentos.....	73
2.10 Cálculos estatísticos.....	74
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Corpo cavernoso de Coelho – Estudos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>77</b>
3.1.1 Relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	79
3.1.2 Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	80
3.1.2.1 Efeito do bloqueio da guanilil ciclase solúvel.....	80
3.1.2.2 Efeito da inibição da síntese de NO.....	81
3.1.2.3 Envolvimento das fibras nitrérgicas e do NO exógeno do relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	83
3.1.3 Participação da via adenilato ciclase - AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	85

---

---

3.1.3.1 Efeito da inibição da fosfodiesterase tipo 4.....	85
3.1.4 Envolvimento dos canais de potássio no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	87
<b>3.2 Corpo Cavernoso Humano – Estudos <i>in vitro</i>.....</b>	<b>89</b>
3.2.1 Relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	91
3.2.2 Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	92
3.2.2.1 Efeito do bloqueio da guanilil ciclase solúvel.....	92
3.2.2.2 Efeito da inibição da síntese de NO.....	93
3.2.3 Participação da via adenilil ciclase - AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	95
3.2.3.1 Efeito da inibição da fosfodiesterase tipo 4.....	95
3.2.4 Envolvimento dos canais de potássio no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	97
<b>3.3 Corpo cavernoso de rato – Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>	<b>99</b>
3.3.1 Relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	101
3.3.2 Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	102
3.3.2.1 Efeito do bloqueio da guanilil ciclase solúvel.....	102
3.3.2.2 Efeito da inibição da síntese de NO.....	103
3.3.2.3 Análise comparativa de acordo com os parâmetros de potência e resposta máxima induzidas pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho, rato e humano nos estudos <i>in</i>	

---

---

<i>vitro</i> .....	105
3.3.2.4 Efeito do BAY 41-2272 no aumento do conteúdo de GMPc em copro cavernoso de rato.....	106
3.3.3 Participação da via adenilil ciclase - AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272.....	108
3.3.3.1 Efeito do BAY 41-2272 no aumento do conteúdo de AMPc em corpo cavernoso de rato.....	108
3.3.4 Efeito do BAY 41-2272 na pressão intracavernosa – estudos <i>in vivo</i> .....	110
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	113
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	123
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	127

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b><math>\mu</math>M</b>	micromolar
<b>4-AP</b>	4- aminopiridina
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>BAY 41-2272</b>	(5-Ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1 <i>H</i> -pirazol[3, 4- <i>b</i> ]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloreto de cálcio
<b>ChTx</b>	caribdotoxina
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>Cys</b>	cisteína
<b>DE</b>	disfunção erétil
<b>EDRF</b>	fator relaxante derivado de endotélio
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintase endotelial
<b>GCs</b>	guanilil ciclase solúvel
<b>GMPc</b>	monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina
<b>GTN</b>	gliceril trinitrato
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>ICP</b>	pressão intracavernosa
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase induzível
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato
<b>KCl</b>	cloreto de potássio

---

---

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato ácido de potássio
<b>L-Arg</b>	L-arginina
<b>L-NAME</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>MAP</b>	pressão arterial média
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnésio
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NANC</b>	não adrenérgico - não colinérgico
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	nitrito de sódio
<b>nM</b>	nanomolar
<b>nNOS</b>	óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintase
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-a]quinoxalina-1-ona
<b>PDE5</b>	fosfodiesterase tipo 5
<b>PDE4</b>	fosfodiesterase tipo 4
<b>PKG</b>	proteína Kinase G
<b>PM</b>	peso molecular
<b>SNP</b>	nitroprussiato de sódio
<b>TEA</b>	tetraetilamônio

## ***LISTA DE MATERIAIS***

<b>SUBSTÂNCIA</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
4-aminopiridina	Sigma (EUA)
ACh	Sigma (EUA)
apamina	Sigma (EUA)
BAY 41-2272	Bayer Pharma Research Center (Germany)
CaCl <sub>2</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
caribdotoxina	Sigma (EUA)
D-Glicose anidra	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
DMSO	Sigma (EUA)
fenilefrina	Sigma (EUA)
forskolin	Sigma (EUA)
glibenclamida	Sigma (EUA)
GTN	Sigma (EUA)
HCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Hypnol (pentobarbital sódico)	Cristália Pr. Quím. Farm. (Itapira, SP)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit GMPc	Cayman Chem Co. (EUA)
L-Arginina	Sigma (EUA)
L-NAME	Sigma (EUA)
MgSO <sub>4</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaHCO <sub>3</sub>	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

---

---

<b>ODQ</b>	Sigma (EUA)
<b>rolipram</b>	Sigma (EUA)
<b>SNP</b>	Sigma (EUA)
<b>tetraetilamônio</b>	Sigma (EUA)
<b>uretana</b>	Sigma (EUA)

## *LISTA DE FIGURAS*

---

<b>Figura 1:</b> Inervação extrínscica do trato genital masculino.....	50
<b>Figura 2:</b> Biossíntese do NO.....	57
<b>Figura 3:</b> Estrutura da guanilil ciclase solúvel e sua ativação pelo NO.....	58
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do YC-1 e seu análogo BAY 41-2272.....	62
<b>Figura 5:</b> Sistema de banho para órgão isolado.....	68
<b>Figura 6:</b> Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho.....	79
<b>Figura 7:</b> Efeitos do ODQ no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 e pelo GTN em corpo cavernoso de coelho.....	80
<b>Figura 8:</b> Efeitos do L-NAME e do ODQ no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho.....	82
<b>Figura 9:</b> Efeitos do BAY 41-2272 sobre a duração dos relaxamentos induzidos por estimulação elétrica em corpo cavernoso de coelho.....	83
<b>Figura 10:</b> Efeitos do BAY 41-2272 sobre a duração dos relaxamentos induzidos pelo NO exógeno em corpo cavernoso de coelho.....	84
<b>Figura 11:</b> Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho.....	85
<b>Figura 12:</b> Representação gráfica da $pEC_{50}$ e $E_{máx}$ em dos bloqueadores de canais de potássio no relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo BAY 41-2272 .....	87

---

---

<b>Figura 13:</b> Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 em corpo cavernoso humano.....	91
<b>Figura 14:</b> Efeitos do ODQ no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 e pelo GTN em corpo cavernoso humano.....	92
<b>Figura 15:</b> Efeitos do L-NAME e do ODQ no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso humano.....	94
<b>Figura 16:</b> Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram no relaxamento induzido pelo pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso humano.....	95
<b>Figura 17:</b> Efeito dos bloqueadores de canais de potássio no relaxamento de corpo cavernoso humano induzido pelo BAY 41-2272.....	97
<b>Figura 18:</b> Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 em corpo cavernoso de rato.....	101
<b>Figura 19:</b> Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 na ausência e na presença de ODQ, em corpo cavernoso de rato.....	102
<b>Figura 20:</b> Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 na ausência e na presença de L-NAME, em corpo cavernoso de rato.....	103
<b>Figura 21:</b> Conteúdo de GMPc em strip de corpo cavernoso de rato exposto ao veículo, BAY 41-2272 ou SNP na ausência e na presença de ODQ ou BAY + SNP.....	107
<b>Figura 22:</b> Conteúdo de AMPc em strip de corpo cavernoso de rato exposto ao veículo, BAY 41-2272 ou SNP na ausência e na presença de ODQ ou BAY + SNP.....	108
<b>Figura 23:</b> Efeito da administração intracavernosa BAY 41-2272 sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do	

---

**Figura 24:** Efeito da administração intracavernosa sobre o aumento da área sobre a curva (AUC) induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*..... 112

## ***LISTA DE TABELAS***

<b>Tabela 1:</b> Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram no relaxamento induzido pelo forskolin e pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho .....	86
<b>Tabela 2:</b> Efeito dos bloqueadores de canal de potássio glibenclamida, apamina, charibdotoxina, 4-aminopiridina e tetraetilamônio no relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo BAY 41-2272.....	88
<b>Tabela 3:</b> Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram no relaxamento induzido pelo forskolin e pelo BAY 41-2272 em corpo humano.....	96
<b>Tabela 4:</b> Efeito dos bloqueadores de canais de potássio glibenclamida, apamina, charibdotoxina, 4-aminopiridina e tetraetilamônio no relaxamento de corpo cavernoso humano induzido pelo BAY 41-2272. ....	98
<b>Tabela 5:</b> Efeito do inibidor de NO sintase, L-NAME, do inibidor de guanilil ciclase solúvel ODQ, no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de rato.....	104
<b>Tabela 6:</b> Esquema comparativo de potência e resposta máxima do relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272 nas espécies estudadas.....	105
<b>Tabela 7:</b> Conteúdo de GMPc e AMPc em strips corpo cavernoso de rato expostos ao BAY 41-2272, SNP na presença e na ausência de ODQ ou ao BAY + SNP.....	109
<b>Tabela 8:</b> Efeito na pressão intracavernosa (ICP) durante a estimulação do nervo cavernoso (3Hz), após a administração intracavernosa do	



## ***RESUMO***

A ereção peniana é um evento fisiológico complexo que compreende mecanismos psíquicos, neurais e vasculares e envolve a interação da estimulação neural do músculo liso do corpo cavernoso bem como liberação neuro-humoral de fatores contráteis e relaxantes do endotélio. O sistema Óxido Nítrico (NO) - Guanilil Ciclase Solúvel (GCs) - GMPc é o mais expressivo e efetivo no mecanismo de ereção peniana. Recentemente, o composto BAY 41-2272 foi descrito como um ativador específico da enzima guanilil ciclase solúvel em sítio independente de NO. Portanto, o presente trabalho objetivou: 1) Investigar a participação das vias guanilil ciclase-GMPc e adenilil ciclase-AMPc bem como dos canais de potássio, nas respostas relaxantes de corpo cavernoso induzidas pelo BAY 41-2272; 2) Investigar a capacidade do BAY 41-2272 em produzir ereção peniana em modelo experimental *in vivo*. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados segmentos de corpo cavernoso de coelhos, rato e humano montados em banho isolado de 10 ml contendo solução de Krebs (37°C; 95%O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub>). As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos e registradas em sistema de aquisição de dados. Além disso, o conteúdo de GMPc tecidual foi determinado em corpo cavernoso de rato através de kit comercial na ausência e na presença de BAY 41-2272 (1 µM) ou do doador de NO, nitroprussiato de sódio (1µM). Para os estudos *in vivo*, ratos Wistar tiveram sua artéria carótida direita canulada para monitoramento contínuo da pressão arterial média, e o corpo cavernoso esquerdo, para registro da pressão intracavernosa, simultaneamente através de transdutores de pressão conectados a um sistema de aquisição de dados. O corpo cavernoso direito foi canulado para administração de

drogas. O nervo cavernoso esquerdo localizado na próstata foi exposto para receber estimulações elétricas, a diferentes frequências. Sendo assim, a adição de BAY 41-2272 (0.01 – 10  $\mu$ M) ao banho provocou um relaxamento concentração dependente do músculo liso de corpo cavernoso de coelho, rato e humano. Esta resposta relaxante foi inibida pelo ODQ (10  $\mu$ M) e pelo L-NAME (100  $\mu$ M), nas três espécies. Entretanto, a adição de rolipram e dos bloqueadores de canais de potássio apamina, charibdotoxina, 4-aminopiridina, tetraetilamônio e glibenclamida não afetou a resposta relaxante de maneira significativa, em coelho e humano. Em coelhos, o BAY 41-2272 potencializou a resposta relaxante evocada pelo estímulo elétrico, assim como pelo NO exógeno. Além disso, o BAY 41-2272 foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GMPc tecidual. Por outro lado, nos experimentos *in vivo* a administração de BAY 41-2272 provocou um aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico sem alterar padrões fisiológicos importantes como a pressão arterial. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o BAY 41-2272 foi capaz de induzir relaxamento de músculo liso de corpo cavernoso *in vitro*, em diferentes espécies, por um mecanismo que envolve principalmente a ativação da guanilil ciclase solúvel e o aumento de GMPc tecidual. Além disso, o BAY 41-2272 melhora a ereção peniana induzida pela estimulação do nervo cavernoso em ratos anestesiados.

## **ABSTRACT**

Penile erection is a physiologic event that includes psychic, neural and vascular mechanisms and involves the interaction of smooth muscle neural stimulation and releasing of relaxant and contractile agents from endothelium. The nitric oxide (NO) – soluble guanylyl cyclase (sGC) - cGMP system is the most significant and efficient mechanism of penile erection. BAY 41-2272 was recently identified as a potent sGC stimulator in a NO-independent manner. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of sGC-cGMP and adenylyl cyclase-cAMP pathways and potassium channel in corpus cavernosum relaxing response induced by BAY 41-2272; to evaluate the performance of BAY 41-2272 to induce penile erection *in vivo*. For *in vitro* studies, rabbit, rat and human corpus cavernosum strips were mounted in a 10-ml organ bath containing Krebs solution (37°C, 95%O<sub>2</sub> / 5%CO<sub>2</sub>). Each strip was connected to isometric transducer which was connected to a data acquisition system. Therefore, cGMP content was determined by EIA kit in rat corpus cavernosum in the absence or presence of BAY 41-2272 (1 μM) or SNP (1μM). For *in vivo* studies, the Wistar rat right carotid was cannulated to mean arterial pressure measurement and left corpus cavernosum was cannulated to registrate the intracavernous pressure through pressure transducers connected to a data acquisition system. The right corpus cavernosum was cannulated to drug administration. The cavernous nerve was exposed to receive electrical field stimulation in different frequencies. Thus, the addition of BAY 41-2272 (0.01 – 10 μM) relaxed, in a concentration dependent manner, the corpus cavernosum smooth muscle strips of rabbit, rat and human. The relaxing effects were reduced in the presence of ODQ (10 μM) or L-NAME (100 μM).

However, rolipram and potassium channel blockers apamin, charibdotoxin, 4-aminopiridin, tetraethylamonium and glibenclamide not affect significantly the relaxation of rabbit and human corpus cavernosum strips. In rabbit, BAY 41-2272 increased the relaxation induced by electrical and exogenous nitric oxide stimulation. Moreover, BAY 41-2272 increased significantly the cGMPc level in rat corpus cavernosum strip. On the other hand, in the *in vivo* studies BAY 41-2272 administration was able to increase the intracavernous pressure induced by electrical stimulation without affect mean arterial pressure. In conclusion, our results showed that BAY 41-2272 was able to induce smooth muscle relaxation of corpus cavernosum *in vitro*, in different species by a mechanism which involves mainly the soluble guanylyl cyclase stimulation and increase in cGMP level. Moreover, BAY 41-2272 improved the penile erection induced by cavernous nerve stimulation in anesthetized rats.

## **1. INTRODUÇÃO**

A disfunção erétil (DE) pode ser definida como a “incapacidade de alcançar ou manter uma ereção (peniana) adequada para uma atividade sexual normal” (National Institutes of Health Consensus Statement, 1993). Recentes estudos demonstraram que a prevalência da DE aumenta significativamente com a idade. Determinados graus de DE podem ser observados em 39% dos homens acima de 40 anos e em 67% dos homens acima de 70 anos (Feldman *et al.*, 1994; Ganz, 2005). Embora a DE possua tanto componentes orgânicos quanto componentes psicogênicos, sabe-se que esta disfunção está associada com a aterosclerose, dislipidemias, hipertensão, diabetes mellitus, sedentarismo, tabagismo e obesidade (Feldman *et al.*, 2000).

As recentes aplicações de sofisticadas técnicas clínicas e científicas no estudo dos mecanismos centrais (vias cerebrais e espinhais) e locais (músculo liso e endotélio) da ereção peniana levaram a grandes avanços no gerenciamento clínico da disfunção erétil. Durante a última década, foi observado um grande avanço no tratamento da disfunção erétil, o qual se estende desde técnicas cirúrgicas (próteses penianas ou revascularização) até o desenvolvimento recente de uma terapia oral eficaz (citrato de sildenafil). A eficácia de agentes administrados por via oral como o sildenafil, tadalafil, vardenafil representa o início de terapias farmacológicas não-invasivas no tratamento da disfunção erétil.

## 1.1 – Fisiologia da Ereção Peniana

### 1.1.1 – Anatomia Peniana

A anatomia geral do pênis é semelhante em todas as espécies de mamíferos (Sachs & Meisel, 1988). O pênis humano consiste de três segmentos cilíndricos: os corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, o qual circunda a uretra e forma a glânde peniana na porção distal. Cada um dos corpos cavernosos é circundado por um tecido fibroso e compacto, a túnica albugínea, a qual é constituída em grande parte de fibras de colágeno, bem como de algumas fibras de elastina (Sattar *et al.*, 1994). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes das lacunas e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (Goldstein *et al.*, 1982; Krane *et al.*, 1989). Os corpos cavernosos são divididos por um septo perfurado, incompleto no humano, que os permite funcionar como uma unidade. A túnica albugínea dos corpos cavernosos apresenta uma espessura de 2-3 mm no estado flácido (Bitsch *et al.*, 1990). A túnica albugínea do corpo esponjoso é menos densa do que a dos corpos cavernosos e contém mais fibras elásticas. A parte proximal do pênis encontra-se ancorada ao osso pélvico, sendo esta região denominada crura dos corpos cavernosos, enquanto a parte proximal do corpo esponjoso forma o bulbo peniano. Tanto a crura quanto o bulbo estão conectados aos músculos estriados. O bulbo peniano está circundado pelo músculo bulbocavernoso (ou bulboesponjoso), ao passo que a crura peniana está circundada pelo músculo isquiocavernoso. A glânde peniana apresenta uma

aparência de esponja devido a um vasto plexo venoso com um grande número de anastomoses.

### *1.1.2 – Neuroanatomia Peniana: Vias Periféricas*

A inervação do pênis (Figura 1) é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir da coluna espinhal e dos gânglios periféricos, a inervação simpática e parassimpática confluem, formando assim o nervo cavernoso, que adentra o corpo cavernoso e o corpo esponjoso para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência. Os nervos somáticos são responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso (Dean & Lue, 2005).

#### *1.1.2.1 – Vias Autonômicas*

A via simpática origina-se dos segmentos espinhais 11<sup>o</sup> torácico e 2<sup>o</sup> lombar e passa através do ramo branco para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras dirigem-se através dos nervos esplânicos para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior de onde partem através do nervo hipogástrico em direção ao plexo pélvico (De Groat & Booth, 1993, Dean & Lue, 2005).

A via parassimpática surge de neurônios localizados do 2<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam do plexo hipogástrico superior pélvico para o plexo pélvico. Os nervos cavernosos então ramificam-se do plexo pélvico em direção ao pênis (Walsh *et al.*, 1990). Estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência.

### 1.1.2.2 – Vias Somáticas

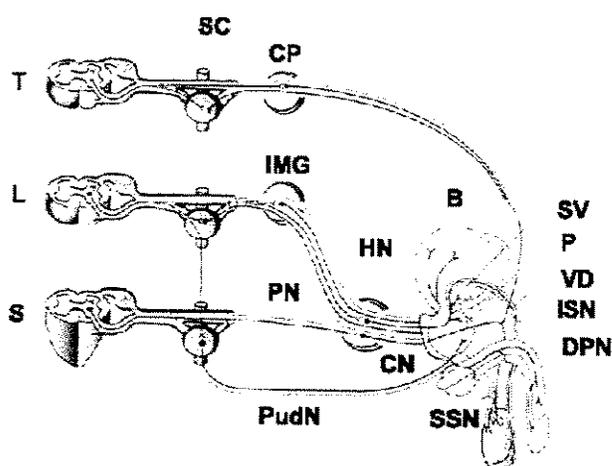
A via somatosensorial origina-se de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, glândea, uretra e no interior do corpo cavernoso. Na glândea do pênis humano há numerosas terminações aferentes: terminações nervosas livres e receptores corpusculares em uma razão de 10:1, respectivamente. As terminações nervosas livres são divididas em mielinizadas e não mielinizadas e são diferentes de qualquer outra área cutânea no corpo (Halata & Munge, 1986; Dean & Lue, 2005). As fibras

nervosas que partem dos receptores convergem para o nervo dorsal do pênis que se unem a outros nervos formando o nervo pudendo. Este último adentra a coluna espinhal via S2—S4 para

terminar nos neurônios espinais e interneurônios na região cinzenta central do segmento lombosacral (McKenna, 1998;

Dean & Lue, 2005). A ativação

destes nervos sensoriais envia mensagens de dor, temperatura e toque pelas vias espinotalâmica e espinoreticular para o tálamo e córtex sensorial desencadeando a percepção sensorial (Burnett *et al*, 1993; Dean & Lue, 2005).



**Figura 1:** Inervação extrínseca do trato genital masculino. As abreviações são: B: bexiga; CN: nervo cavernoso; CP: plexo pélvico; DPN: nervo peniano dorsal; HN: nervo hipogástrico; IMG: gânglio mesentérico inferior; ISN: nervo espermático inferior; P: próstata; PN: nervo pélvico; PudN: nervo pudendo; SC: cadeia simpática paravertebral; SSN: nervo espermático superior; SV: vesícula seminal; L: segmento lombar; T: segmento torácico; S: segmento sacral da coluna vertebral ( in Giuliano & Rampin, 2004).

O núcleo de Onuf no 2º ao 4º segmento sacral é o centro da inervação peniana somatomotora. Estes nervos dirigem-se através dos nervos sacrais para o nervo pudendo para inervar os músculos ísquio e bulbocavernosos. A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase rígida da ereção. A contração rítmica do músculo bulbocavernoso é necessária para a ejaculação (Dean & Lue, 2005).

### 1.1.3 – Hemodinâmica e Mecanismo da Ereção e Detumescência

A ereção é um evento fisiológico complexo que compreende mecanismos psíquicos, neurais e vasculares (Krane *et al.*, 1989), e envolve a interação da estimulação neural do músculo liso do corpo cavernoso bem como liberação neuro-humoral de fatores contráteis e relaxantes do endotélio (Saenz de Tejada *et al.*, 2004, Dean & Lue, 2005). São 4 os principais eventos inter-dependentes que ocorrem durante a ereção: dilatação das artérias e arteríolas pelo aumento do fluxo sanguíneo nas fases diastólica e sistólica; armazenamento de sangue nos espaços sinusoidais; compressão do plexo venoso subtúnica entre a túnica albugínea e os sinusóides periféricos reduzindo o efluxo venoso; estiramento da túnica albugínea em sua capacidade, o que oclui as veias emissárias diminuindo o efluxo venoso ao mínimo (Lue *et al.*, 1983; Dean & Lue, 2005).

Durante a ereção, o pênis atua como um capacitor, acumulando sangue sob pressão devido ao relaxamento dos corpos cavernosos (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Aboseif & Lue, 1988; Lue & Tanagho, 1987; Saenz de Tejada *et al.*, 1991).

Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, principalmente através de mecanismos  $\alpha$ -adrenérgicos (Traish *et al.*, 1999), e exercem resistência máxima ao influxo arterial; neste estado, apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais. Ao mesmo tempo em que sinusóides estão contraídos, as veias drenam livremente para veias extra-penianas. Assim, durante este estado, a musculatura lisa trabecular dos corpos cavernosos e das artérias cavernosas e helicinais mantém-se em contração permanente. As trabéculas são drenadas pelas vênulas emissárias que se comunicam com as veias cavernosas, e apresentam pressão de oxigênio,  $PO_2$ , de 20 a 40 mmHg quando o pênis encontra-se no estado flácido (Kim *et al.*, 1993; Sattar *et al.*, 1995). Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, essas musculaturas relaxam (tumescência) permitindo o influxo arterial e, conseqüentemente, o aumento progressivo da pressão sangüínea intracavernosa. Apenas o bloqueio da atividade adrenérgica não é suficiente para que seja alcançado o estado de ereção peniana total. Os principais eventos responsáveis pelo estado de ereção total são os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa e artérias helicinais, quando ocorre então expansão máxima dos espaços lacunares que terminam por comprimir os plexos venosos sub-albugíneos.

Durante a ereção, os músculos lisos de arteríolas e sinusóides relaxam, conseqüentemente reduzindo a resistência periférica. Assim, a dilatação das artérias cavernosa e helicinal levam ao aumento do fluxo sangüíneo nos espaços lacunares, e o relaxamento do músculo liso trabecular dilata os espaços

lacunares, causando expansão do pênis. O influxo de sangue arterial está associado com aumento na  $PO_2$  (90-100 mmHg) durante o desenvolvimento do estado de tumescência (Kim *et al.*, 1993). A pressão sangüínea sistêmica transmitida através das arteríolas helicinais dilatadas expande o músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas e reduz o efluxo venoso no espaço lacunar e, dessa forma, o pênis é mantido rígido (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Lue & Tanagho, 1988; Krane *et al.*, 1989). Em resumo, a pressão no espaço lacunar durante a ereção é resultado do equilíbrio entre a pressão de perfusão na artéria cavernosa e a resistência ao efluxo sangüíneo pelas vênulas sub-túnicas comprimidas. A redução do efluxo venoso pela compressão mecânica das vênulas sub-túnicas é conhecida como mecanismo de oclusão venosa (Shirai *et al.*, 1978), que leva ao aumento na pressão intracavernosa a um valor próximo da pressão sistêmica arterial média (Aboseif & Lue, 1988; Lue & Tanagho, 1987).

A ativação de nervos constritores simpáticos causa um aumento do *tonus* muscular das artérias helicinais e das trabéculas. Isto resulta na redução do influxo arterial e diminuição dos espaços lacunares, com descompressão das vênulas sub-túnicas e aumento do efluxo sangüíneo dos espaços lacunares, promovendo o retorno do pênis ao estado flácido (Lue & Tanagho, 1988; Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Krane *et al.*, 1989). Os eventos hemodinâmicos que ocorrem durante ereção e detumescência requerem alterações coordenadas do fluxo sangüíneo, pressão intracavernosa e volume peniano (Andersson & Wagner, 1995; Azadzo *et al.*, 1995).

## 1.2 – Óxido nítrico e Ereção peniana

Em 1980, Furchgott e Zawadski relataram que a acetilcolina (ACh) relaxava aorta isolada de coelho apenas na vigência de um endotélio íntegro. Esta descoberta sugeriu que as células endoteliais representariam um passo intermediário na resposta colinérgica, por produzir uma substância responsável pela resposta inibitória evocada pela ACh, através da ativação de receptores  $M_2$  localizados no endotélio. Tal substância foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF).

Demonstrou-se que o EDRF era extremamente lábil com meia-vida de poucos segundos em soluções fisiológicas (Förstermann *et al.*, 1984; Griffith *et al.*, 1984) e que, quando liberado, difundia-se para as células musculares lisas adjacentes provocando o relaxamento destas células através da estimulação da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), causando uma elevação nos níveis de monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina (GMPc; Rapoport & Murad, 1983). Este mecanismo de relaxamento era semelhante ao dos nitrovasodilatadores, que também exercem seu efeito através da formação de GMPc (Katsuki & Murad, 1977; Katsuki *et al.*, 1977; Ignarro *et al.*, 1981), mas de maneira independente do endotélio (Rapoport & Murad, 1983).

Estudos subseqüentes revelaram que o EDRF era química e farmacologicamente indistingüível do óxido nítrico (NO, Palmer *et al.*, 1987; Ignarro *et al.*, 1987a; Ignarro *et al.*, 1987b). Marletta *et al.* (1988) chegaram à mesma conclusão com respeito à origem dos íons nitrito e nitrato produzidos por macrófagos murinos imunoestimulados em cultura. O aminoácido L-Arg foi

estabelecido como substrato para a síntese de NO em células endoteliais e outros tipos celulares (Schmidt *et al.*, 1988; Palmer & Moncada, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

Diversos estudos demonstraram que inibidores da oxido nítrico sintase (NOS) têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso provocado por estimulação elétrica das terminações não adrenérgicas-não colinérgicas NANC em várias espécies, como coelho (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991; Holmquist *et al.*, 1992; Knispel *et al.*, 1992), camundongo (Göçmen *et al.*, 1998; Mizusawa *et al.*, 2001) e humanos (Holmquist *et al.*, 1991a; Kim *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Holmquist *et al.*, 1992; Kirkeby *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1994). Inibidores de NOS também bloqueiam as respostas eretogênicas *in vivo* decorrentes da estimulação do nervo cavernoso no coelho (Holmquist *et al.*, 1991b), no camundongo (Mizusawa *et al.*, 2001) e no rato (Burnett *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 1992; Garbán *et al.*, 1995; Escrig *et al.*, 1999); estimulação da medula sacral no rato (Finberg *et al.*, 1993) e estimulação do nervo pélvico no cão (Trigo-Rocha *et al.*, 1993a; Ayajiki *et al.*, 1997).

Após a estimulação elétrica do corpo cavernoso, foram observados níveis teciduais aumentados de nitrito e citrulina no coelho (Ignarro *et al.*, 1990; Bush *et al.*, 1992a) e, em humanos, foram detectados níveis aumentados de nitritos e nitratos (Leone *et al.*, 1994). Na vigência de inibição da NOS ou bloqueio da condução axonal, observou-se a interrupção na geração destes metabólitos do NO. Adicionalmente, o NO, bem como doadores de NO, relaxam preparações de tecido erétil de humanos e coelhos (Bush *et al.*, 1992b; Holmquist *et al.*, 1993;

Christ *et al.*, 1995) e causa tumescência em cães (Trigo-Rocha *et al.*, 1993a), gatos (Wang *et al.*, 1994), macacos (Hellstrom *et al.*, 1994).

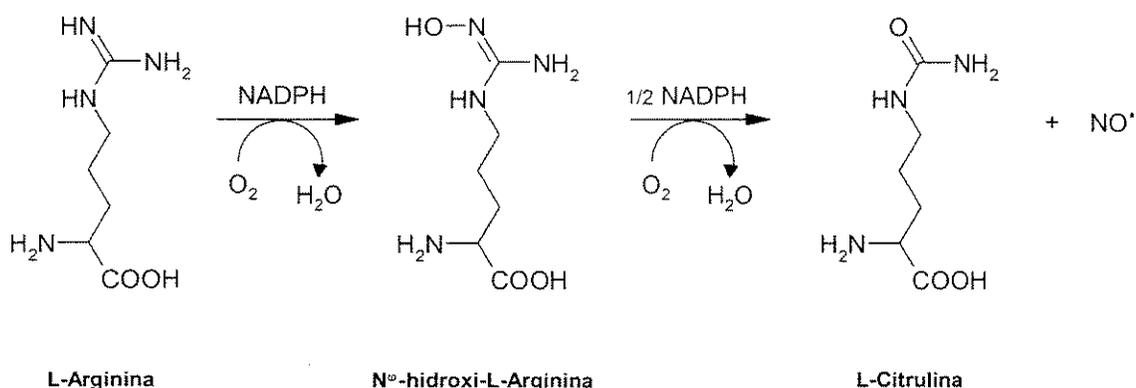
A participação do NO na fisiologia da ereção pode ser influenciada por vários fatores modulatórios, tais como condições oxidativas locais e substâncias reativas incluindo oxihemoglobina, tensão de oxigênio intracavernosa, estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e pH intracavernoso (Rand, 1992; Kim *et al.*, 1993). A estimulação direta do endotélio pela ACh representa um mecanismo alternativo para a liberação de NO no pênis (Blanco *et al.*, 1988; Knispel *et al.*, 1991). Substância P e bradicinina também podem relaxar o tecido cavernoso por estimular a formação e liberação de NO do endotélio (Wang *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1998a).

### 1.2.1 - Biossíntese de NO

As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como NO sintases (NOS) e catalizam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-Arg, formando NO e L-citrulina em duas etapas (Figura 2), com a formação do intermediário  $\text{N}^{\ominus}$ -hidroxi-L-arginina (Marletta, 1988; Marletta, 1993; Feldman *et al.*, 1993; Fukuto & Chaudhuri, 1995; Ignarro & Murad, 1995; Kerwin *et al.*, 1995). Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutiva (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II; Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann & Kleinert, 1995). As NOS constitutivas foram primariamente

caracterizadas em neurônios (NOS I ou nNOS) e em células endoteliais (NOS III ou eNOS), respectivamente, sendo reguladas pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM). Estas isoformas produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), o qual desempenha funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular (Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann & Kleinert, 1995; Ignarro & Murad, 1995). A NOS II (iNOS) foi primariamente isolada de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- $\gamma$ . Esta enzima é essencialmente  $\text{Ca}^{2+}$ -independente e pode produzir NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão.

As NOS são ativas na forma de homodímeros de pesos moleculares (PM) entre 250-300 kDa (Knowles & Moncada, 1994; Förstermann *et al.*, 1994; Förstermann & Kleinert, 1995; Förstermann *et al.*, 1998). A ligação da calmodulina realça a transferência de elétrons no domínio redutase e permite a redução do grupamento heme com conseqüente atividade da NOS (Matsuoka *et al.*, 1994;



**Figura 2:** Biossíntese de NO

Abu-Soud *et al.*, 1994).

Todas as isoformas da NOS podem ser inibidas, em graus variáveis, por análogos da L-Arg substituídos no grupamento guanidino (N<sup>o</sup>; Mayer & Andrew, 1998; Boucher *et al.*, 1999), como, por exemplo, o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

### 1.2.2 – Guanilil ciclase solúvel e o Mecanismo de sinalização do NO

Corroborando com os resultados obtidos utilizando-se inibidores da síntese de NO, verificou-se que inibidores de GCs inibem os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos por estimulação elétrica bem como aqueles evocados por agentes que atuam de maneira dependente ou independente do endotélio, confirmando o envolvimento da via do GMPc nos relaxamentos de corpo cavernoso mediados pelo NO em várias espécies (Ignarro *et al.*, 1990; Pickard *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Holmquist *et al.*, 1992; Hayashida *et al.*, 1996; Recio *et al.*, 1998; Hedlund *et al.*, 1999; Mizusawa *et al.*, 2001). A GCs (Figura 3) é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia várias funções fisiológicas importantes, tais como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do

### Guanilato ciclase solúvel

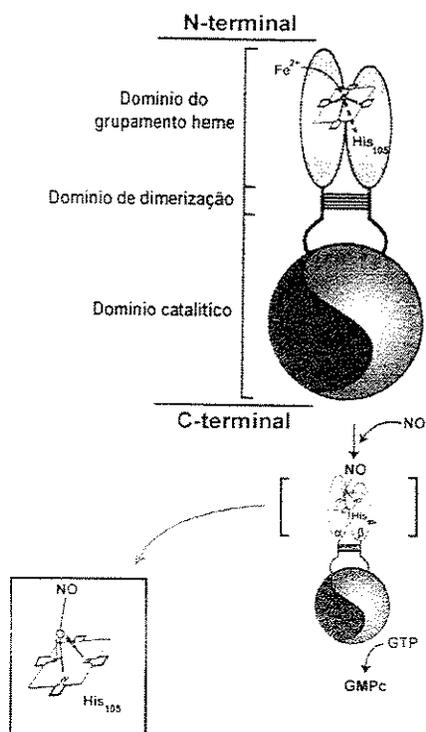


Figura 3: Estrutura da guanilil ciclase solúvel e sua ativação pelo NO.

músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier & Vallance, 1989). A GCs é um heterodímero composto de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Hobbs, 1997), com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (Koesling *et al.*, 1991; Schulz *et al.*, 1991). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991). Recentemente, as enzimas compostas pelas subunidades  $\alpha 1/\beta 1$  e  $\alpha 2/\beta 1$  presentes em tecidos de humanos foram completamente caracterizadas após expressão em células Sf9 e placenta (Zabel *et al.*, 1998; Russwurm *et al.*, 1998).

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO (Gerzer *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1982; Ohlstein *et al.*, 1982). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como  $Fe^{2+}$  (forma reduzida) ou  $Fe^{3+}$  (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição His<sub>105</sub> (Stone & Marletta, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade  $\beta 1$ , determina a incapacidade da GCs de se ligar ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO (Wedel *et al.*, 1994).

O NO ativa a GCs por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His<sub>105</sub> axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição e criando uma mudança conformacional que ativa a GCs (Traylor & Sharma, 1992; Lucas *et al.*, 2000). Esta ativação causa uma elevação nos níveis

de GMPc, o qual é clivado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) pela GCs (Rapoport & 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 & Murad, 1987; Lucas *et al.*, 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>); (2) aumento do seqüestro de Ca<sup>2+</sup> citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup>; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase de membrana e (7) abertura de canais de K<sup>+</sup>.

### **1.3 – BAY 41-2272: um ativador de guanilil ciclase solúvel em sítio independente de NO**

Com a descoberta de que o sistema NO-GCs-GMPc era o mais expressivo e efetivo no mecanismo de ereção peniana, foram identificados várias substâncias com potencial terapêutico no tratamento da disfunção erétil. Tais agentes estão divididos em dois grupos: os que inibem a degradação de GMPc como os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5), entre eles o sildenafil; e os que elevam os níveis de GMPc através da ativação direta da GCs, por sua vez representados pelo NO e os compostos doadores de NO, entre eles a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio (Brioni *et al.*, 2002). Entretanto, além das substâncias citadas acima, o YC-1 ([3-(5'-hidroximetil-2'fúril)-1-benzil indazol] foi descrito como um ativador direto de GCs devido ao seu acoplamento a um sítio regulatório independente do NO (Ko *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 1998). Não se trata de uma droga doadora de NO (Mülsch *et al.*, 1997), mas sim de um

composto que se liga a GCs em um sítio alostérico da enzima, na subunidade  $\alpha 1$ , a qual contém as Cys238 e Cys243. Esta região modula a atividade catalítica e a responsividade do ligante acoplado ao grupamento heme (Martin *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001) e tem sua atividade intensificada na presença do NO (Brioni *et al.*, 2002). Através de análises realizadas por espectrofotometria, não foram detectadas mudanças induzidas pelo YC-1 na absorvância da enzima basal, nem na estimulada pelo NO, fato este que comprova que o YC-1 tem um mecanismo independente do estado de ativação da enzima e da presença do grupamento heme (Friebe & Koesling, 1998). Trabalhos realizados em anéis de aorta de coelho e culturas de células endoteliais demonstraram que YC-1 aumenta o acúmulo de GMPc e este efeito é potencializado na presença de NO (Wohlfart *et al.*, 1999). Na presença de inibidores da NOS, como L-NAME, o efeito máximo do YC-1 é diminuído o que indica a existência de uma ação sinérgica sobre a GCs entre o YC-1 e o NO endógeno liberado pelas células endoteliais. (Wohlfart *et al.*, 1999). Demonstrou-se recentemente que o YC-1 induz respostas eréteis quando administrado por via intracavernosa, além de potencializar a ereção mediada pela estimulação do nervo cavernoso quando administrado por via oral (Mizusawa *et al.*, 2002). O composto sintético, YC-1, demonstrou apresentar atividade sinérgica ao NO na ativação da guanilil ciclase solúvel, aparentemente por retardar a dissociação do NO do grupamento heme da enzima (Friebe *et al.*, 1998). Adicionalmente, a  $EC_{50}$  do NO na presença de YC-1 para a ativação da enzima é significativamente diminuída, sugerindo que este composto aumenta a afinidade do NO ao grupamento heme

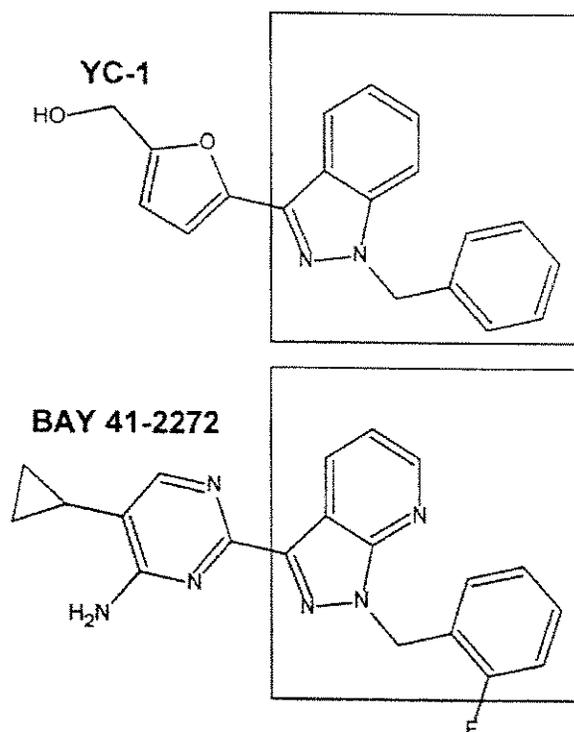
(Friebe *et al.*, 1996; Hoenicka *et al.*, 1999). Já foi demonstrado que este composto é capaz de promover o relaxamento da musculatura lisa vascular (Wegener *et al.*, 1997) e cavernosa (Brioni *et al.*, 2002; Nakane *et al.*, 2002).

Assim como o YC-1, o BAY 41-2272 (5-Ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3, 4-b]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina; Figura 4) e seu análogo, BAY 41-8543, moléculas com características e mecanismo similares ao YC-1, foram recentemente descritas como

ativadores específicos de GCs, porém sendo muito mais potentes e desprovidas de atividade inibitória sobre a fosfodiesterase (Stasch *et al.*, 2001; 2002a). Experimentos *in vitro* demonstraram uma potente ativação da GCs pelo BAY 41-2272 nas concentrações de 0.1 nM a 100  $\mu$ M e esta estimulação foi potencializada na presença de doador de NO DEA/NO (1  $\mu$ M) (Stasch *et al.*, 2001). Estudos

utilizando-se enzimas desprovidas de grupamento heme, o BAY 41-2272 não foi capaz de ativar a enzima, demonstrando que seu mecanismo de ação é NO-independente porém heme-dependente (Stasch *et al.*, 2001).

Trabalhos subseqüentes demonstraram que o BAY 41-2272 induziu vasodilatação em anéis aórticos *in vitro* e reduziu a pressão arterial em ratos



**Figura 4:** Estrutura química do YC-1 e seu análogo BAY 41-2272

normotensos e hipertensos (Straub *et al.*, 2002). Além disso, demonstrou-se também que a vasodilatação induzida por este composto não causa tolerância como os nitratos orgânicos (Stasch *et al.*, 2002). Em modelo de insuficiência cardíaca congestiva experimental o BAY 41-2272 também aumentou o débito cardíaco e preservou a função renal (Boerrigter *et al.*, 2003). Adicionalmente, em coelhos o BAY 41-2272 foi capaz de relaxar anéis aórticos de coelho tanto na presença quanto na ausência de endotélio (Priviero *et al.*, 2005) e demonstrou interação com o NO endógeno e exógeno causando um potente relaxamento do músculo anococcígeo de rato (Teixeira *et al.*, 2006)

Esta descoberta possibilitou o desenvolvimento de uma nova classe de compostos com perfil farmacológico diferente das drogas doadoras de NO e pode representar um novo recurso na regulação da ereção peniana.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivos gerais***

- Devido ao seu potencial terapêutico na disfunção erétil, o presente trabalho objetivou avaliar a capacidade do BAY 41-2272 de induzir o relaxamento de corpo cavernoso, além de investigar os mecanismos envolvidos neste fenômeno, em coelho, rato e humano.

### **Objetivos específicos**

- Investigar a participação das vias guanilil ciclase-GMPc e adenilil ciclase-AMPC bem como dos canais de potássio, nas respostas relaxantes de corpo cavernoso induzidas pelo BAY 41-2272;
- Investigar a capacidade do BAY 41-2272 em produzir ereção peniana em modelo experimental *in vivo*

## ***2. MATERIAIS E MÉTODOS***

## **2.1 - Preparação de Corpo Cavernoso de Coelho**

Foram utilizados coelhos machos New Zealand adultos (2-3 kg). Após anestesia com pentobarbital sódico (Hypnol; 50 mg/kg i.v.), os animais foram exsangüinados e o pênis retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado, após remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Cada pênis forneceu quatro segmentos de corpo cavernoso dissecado (1.0 x 0.3 x 0.2 cm). Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo CEEA\_IB UNICAMP 547-1).

## **2.3 - Preparação de Corpo Cavernoso Humano**

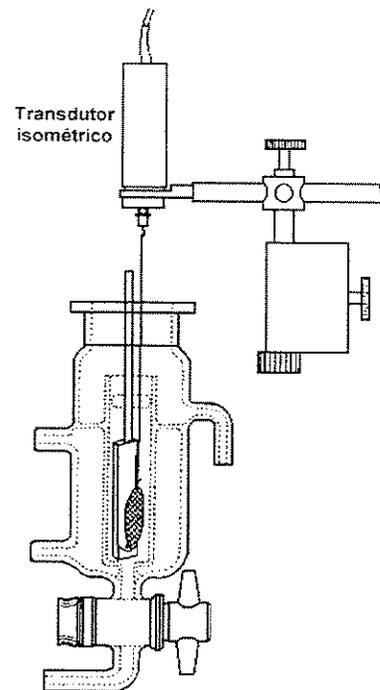
Segmentos da parte proximal do corpo cavernoso de 11 pacientes entre 16 e 55 anos de idade, que sofreram doação múltipla de órgãos foram utilizados após obtenção de consentimento informado dos familiares e aprovação prévia do Comitê de Ética do Hospital Universitário da Unicamp (protocolo CEP - HC UNICAMP 281/2001). Após remoção, os segmentos foram imediatamente colocados em solução de Krebs. Preparações de corpo cavernoso (12 x 3 x 3 mm) foram obtidas após dissecação da túnica albugínea e tecidos conectivos.

## 2.2 - Preparação de Corpo Cavernoso de Rato

Foram utilizados ratos Wistar machos (250-350g). Após anestesia com pentobarbital sódico (Hypnol; 50 mg/kg i.p), os animais foram exsangüinados e o pênis retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer. Em seguida, o tecido cavernoso foi dissecado, após remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Cada pênis forneceu 2 segmentos de corpo cavernoso dissecado (1.0 x 0.3 x 0.2 cm). Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo CEEA\_IB UNICAMP 547-1).

## 2.4 - Banho Isolado de Corpo Cavernoso

Cada segmento de corpo cavernoso foi montado em banhos isolados de 10 ml contendo solução de Krebs-Ringer aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 5). Os tecidos foram então suspensos entre duas pontas de metal em "L" e uma das pontas foi conectada a um transdutor de força, enquanto a outra foi fixada a uma unidade móvel, permitindo, assim, o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos



**Figura 5:** Sistema de banho para órgão isolado

(5 mN, 10 mN, 20 mN para rato, coelho e humano, respectivamente) foi

periodicamente ajustada até estabilização e a solução nutritiva trocada a cada 15 min durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.0, AD Instruments, MA, Estados Unidos). Após 60 min de estabilização, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). Indometacina (5.6  $\mu$ M) foi adicionada ao banho para inibir a geração de produtos da ciclooxigenase.

A composição da solução de Krebs foi (em mM): NaCl, **118**; NaHCO<sub>3</sub>, **25**; glicose, **5.6**; KCl, **4.7**; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, **1.2**; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, **1.17** e CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, **2.5**.

## **2.5 - Protocolos Experimentais *in vitro***

Após o período de estabilização de 60 minutos, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). Curvas concentração-resposta foram executadas adicionando-se BAY 41-2272 cumulativamente (0.01-10  $\mu$ M) no corpo cavernoso. Foi executada somente uma curva por tecido devido à baixa resposta à fenilefrina em curva subsequente.

Para os experimentos onde foi avaliada a participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY foram utilizados o inibidor de NOS, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M) e o inibidor de GCs, 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-a]quinoxalina-1-ona (ODQ, 10  $\mu$ M). Estes inibidores foram adicionados 30 minutos antes do início da curva. Protocolos similares foram realizados como

experimentos controles para obtenção das curvas concentração-resposta ao GTN (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) e à ACh (0.01-10  $\mu\text{M}$ ), na presença, também, destes mesmos inibidores. Porém as curvas concentração-resposta ao GTN (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) e à ACh puderam ser executadas nos mesmos tecidos após lavagem e incubação com os inibidores.

Em experimentos subseqüentes, foram obtidas curvas concentração-efeito para o NO através de uma solução de  $\text{NaNO}_2$  acidificado (NO; 1  $\mu\text{M}$ -100  $\mu\text{M}$ ). Após a obtenção das respostas, os tecidos foram encubados com BAY 41-2272 (100 nM) e a curva ao NO foi repetida após 20 minutos. Nas curvas ao estímulo elétrico, após a obtenção de respostas frequência-dependentes (2, 4, 8, 16 e 32 Hz), o BAY 41-2272 (100 nM) foi adicionado às cubas e a estimulação foi repetida após 20 min.

Para a avaliação da participação da via adenilil ciclase solúvel – AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272, o rolipram (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da PDE4, foi adicionado 30 minutos antes do início da curva. Protocolo similar foi realizado como experimento controle para obtenção da curva concentração-resposta ao forskolin, uma ativador de adenilil ciclase, na presença, também, deste mesmo inibidor.

Para a avaliação da participação dos canais de potássio no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 foram utilizados os inibidores de canais de potássio glibenclamida (10  $\mu\text{M}$ ; seletiva para canais de  $\text{K}^+$  ATP-dependentes), 4-aminopiridina (3  $\mu\text{M}$ ; seletiva para canais de  $\text{K}^+$  voltagem-dependentes),

charibdotoxina e apamina (100 nM; seletivas para canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup>), e tetraetilamônio (1 μM; bloqueador não-seletivo de canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes e ativados por Ca<sup>2+</sup>). Estes inibidores foram incubados na preparação 20 minutos antes que a curva em resposta ao BAY 41-2272 fosse desenvolvida.

## **2.6 - Dosagem de GMPc em corpo cavernoso isolado de rato**

Para determinar o conteúdo de GMPc tecidual, o corpo cavernoso de rato foi colocado em período de estabilização por 30 minutos em solução de Krebs aquecida e oxigenada. Os tecidos foram então expostos durante 5 minutos tanto ao BAY 41-2272 (1 μM), quanto ao SNP (1μM) na ausência e na presença de ODQ (10 μM). Os segmentos foram coletados imediatamente e congelados em nitrogênio líquido. O corpo cavernoso congelado foi pulverizado e homogeneizado em etanol 66% gelado. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 10,000 g. O sobrenadante foi seco em secadora de nitrogênio a 40 °C e usado para medida de GMPc em técnica de imunensaio enzimático. Os pesos dos pellets secos foram utilizados para padronizar as diferentes amostras. Preparação das amostras, padrões e a incubação com o anticorpo foram seguidas de acordo com os procedimentos descritos no kit comercial (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, U.S.A.). Os ensaios foram desenvolvidos em duplicata em diferentes diluições.

## 2.7- Monitoramento de Pressão intracavernosa em ratos anestesiados – Experimentos *in vivo*

### *Procedimento cirúrgico*

Ratos Wistar machos foram anestesiados com uretana (1,2g / kg) intraperitoneal. A artéria carótida direita foi canulada para monitoramento contínuo da pressão arterial média (MAP), e uma cânula provida de agulha 26G foi inserida no corpo cavernoso esquerdo para registro da pressão intracavernosa (ICP) simultaneamente através de transdutores (Grass, Astro-Med Industrial Park, U.S.A.). Outra cânula similar foi inserida no corpo cavernoso direito para administração de drogas. A cavidade abdominal foi aberta expondo o nervo cavernoso esquerdo localizado região dorso-lateral da próstata. Um eletrodo bipolar de platina conectado a um estimulador Grass S48 foi posicionado sobre o nervo cavernoso. Estimulações elétricas do nervo cavernoso (pulso de 1 ms, 45 s, 6 V) a diferentes frequências (1, 3, 5 Hz) foram aplicadas. As alterações de tensão foram registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, Estados Unidos).

## 2.8 - Protocolos Experimentais *in vivo*

Após um período de estabilização, uma curva frequência-dependente controle foi realizada e logo após, 50ul de veículo (Cremophor – dietilenoglicol mono etil éter – água na proporção 10/20/70, respectivamente) ou de uma solução de concentração 1mg/ml de BAY 41-2272 (o equivalente a 0.6  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi injetada intracavernosamente. Desta maneira, a curva frequência-dependente foi repetida após 5 minutos da injeção a fim de se registrar as alterações hemodinâmicas ocorridas.

## 2.9 - Cálculo dos Experimentos

Os relaxamentos de corpo cavernoso detectados nos experimentos *in vitro* foram calculados como percentual da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ), a qual foi tomada como 100%. Os valores de relaxamento foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de  $n$  experimentos. Respostas eréteis *in vivo* foram expressas como a área sobre a curva (AUC) e a razão entre ICP (mmHg)/MAP(mmHg), onde ICP representa o pico de ereção em resposta a determinado estímulo e MAP, a pressão arterial média no mesmo momento.

## **2.10 – Cálculos Estatísticos**

Análise de variância (ANOVA) e o teste  $t$  pareado de Student foram empregados para avaliar os dados. Valores de  $p$  menores do que 0.05 foram considerados significantes.

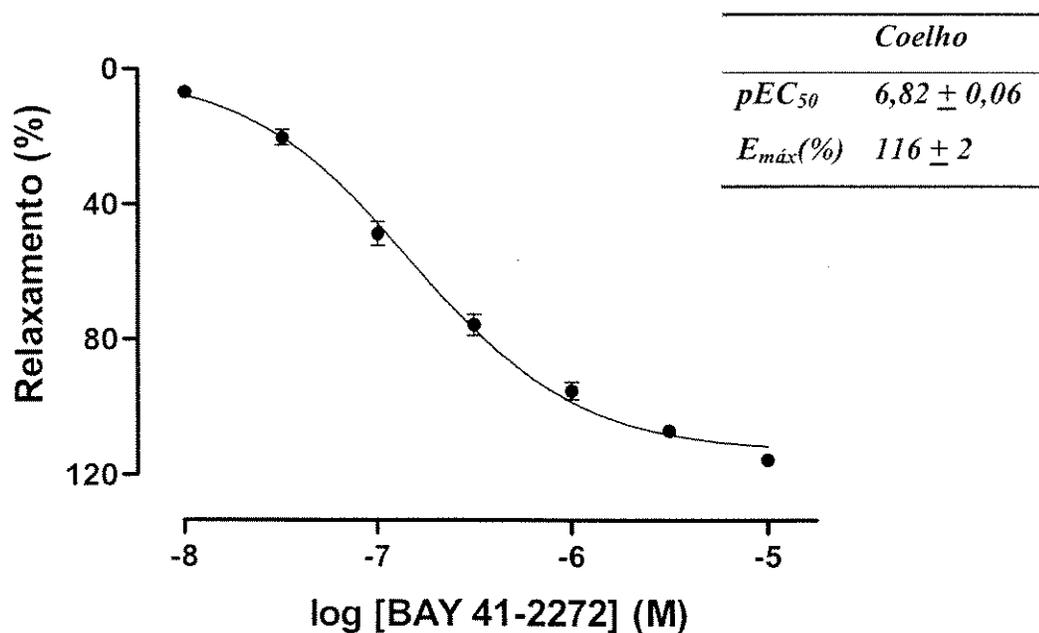
### **3. RESULTADOS**

### **3.1 - Corpo Cavernoso de Coelho**

**Estudos *in vitro***

### 3.1.1 – Relaxamento induzido pelo BAY 41-2272

O BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu$ M, n=19) promoveu um relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso de coelho de modo dependente da concentração, sendo tal resposta duradoura (Figura 6).



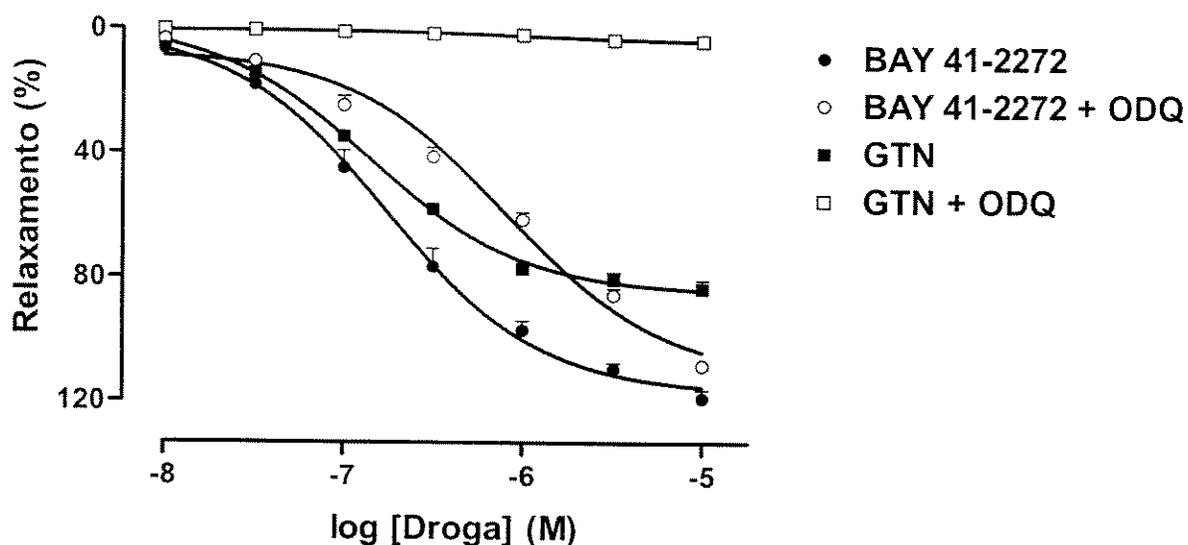
**Figura 6:** Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu$ M) em corpo cavernoso de coelho. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias do relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

### 3.1.2 – Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY

41-2272

#### 3.1.2.1 - Efeitos do bloqueio da guanilil ciclase solúvel

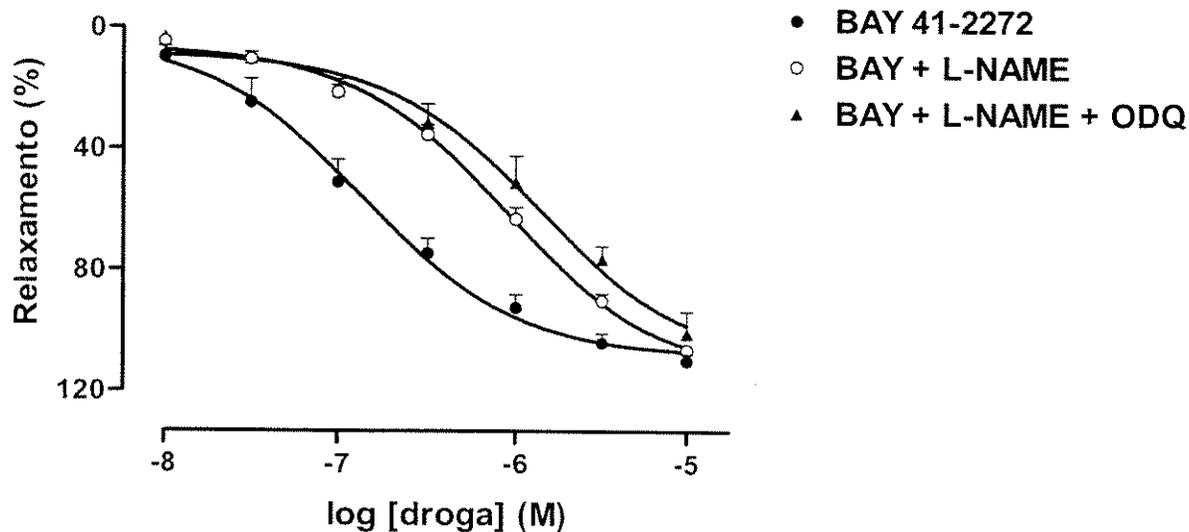
Adição do inibidor da GCs, ODQ (10  $\mu$ M; n=6), levou a um aumento no tônus da preparação e inibiu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ( $pEC_{50}$ :  $6.76 \pm 0.05$  na ausência e  $6.09 \pm 0.13$  na presença de ODQ) deslocando a curva concentração - efeito significativamente para a direita (4.7 vezes; Figura 7). Paralelamente, a adição de ODQ aboliu completamente a resposta relaxante ao GTN (0.01-10  $\mu$ M, n=6)



**Figura 7:** Efeitos do ODQ (10  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01 – 10  $\mu$ M; círculos) e pelo GTN (0.01 – 10  $\mu$ M, quadrados) em corpo cavernoso de coelho. Os valores experimentais foram obtidos na ausência (símbolos fechados) e na presença (símbolos abertos) de ODQ. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

### 3.1.2.2 - Efeito da inibição da síntese de NO

A adição do inibidor da síntese de NO, L-NAME (100  $\mu$ M, n=4), promoveu um aumento do tônus da preparação e inibiu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ( $pEC_{50}$   $6.86 \pm 0.06$  na ausência e  $6.06 \pm 0.05$  na presença de L-NAME), deslocando a curva concentração-resposta significativamente para a direita (5,9 vezes). Paralelamente, foram realizadas curvas concentração-resposta controle para acetilcolina na qual o L-NAME aboliu a resposta relaxante como esperado. A adição simultânea de ODQ (10  $\mu$ M, n=4) na curva em presença de L-NAME não promoveu nenhuma inibição adicional quando comparado ao experimento feito somente na presença de L-NAME ( $pEC_{50}$ :  $6.06 \pm 0.05$  na ausência e  $5.88 \pm 0.12$  na presença de ODQ; Figura 8).

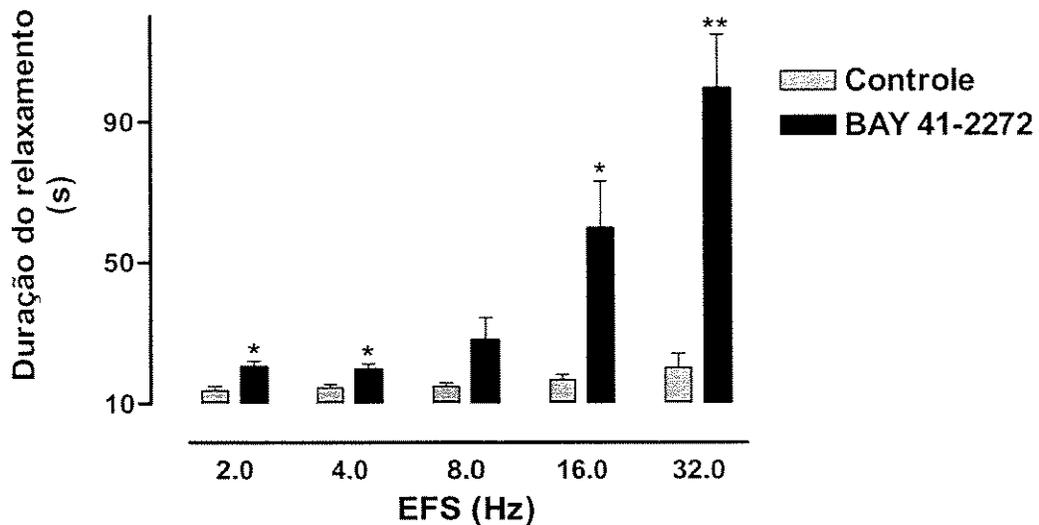


**Figura 8:** Efeitos do L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) e do ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01 – 10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso de coelho. Os valores experimentais foram obtidos na ausência (círculos fechados) e na presença (círculos abertos) de L-NAME ou L-NAME mais ODQ (triângulos fechados). Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ).

### 3.1.2.3 - Envolvimento do NO exógeno e do NO liberado das fibras nitrérgicas no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272

#### – Efeito da estimulação elétrica de corpo cavernoso

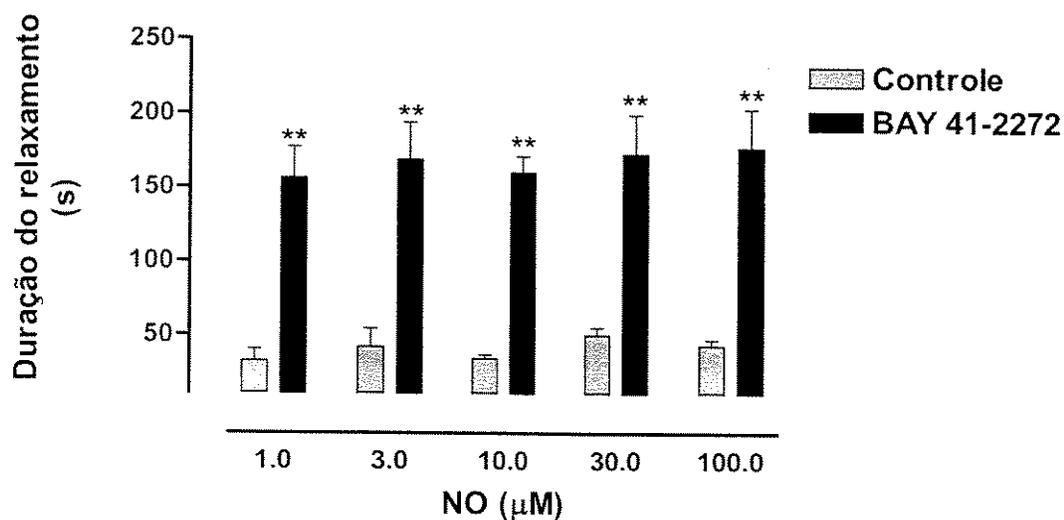
A estimulação elétrica do corpo cavernoso (2-32 Hz) causou relaxamentos de curta duração. A aplicação de BAY 41-2272 (100 nM; n=3) promoveu um aumento significativo na duração dos relaxamentos nas preparações (Figura 9).



**Figura 9:** Efeitos do BAY 41-2272 (100 nM) sobre a duração dos relaxamentos induzidos por estimulação elétrica (EFS, 2-32 Hz) em corpo cavernoso de coelho. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento, calculadas em relação à contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em comparação com os respectivos valores controles de relaxamento.

– Efeitos do NO exógeno.

O NO provocou um relaxamento instantâneo, e não duradouro, onde após cada dose de NO observou-se um relaxamento rápido e em seguida o retorno ao *tonus* inicial. Após o experimento controle, a adição de BAY 41-2272 (100 nM, n=3) causou um aumento significativo na duração das respostas relaxantes (Figura 10) induzidas pelo NO.

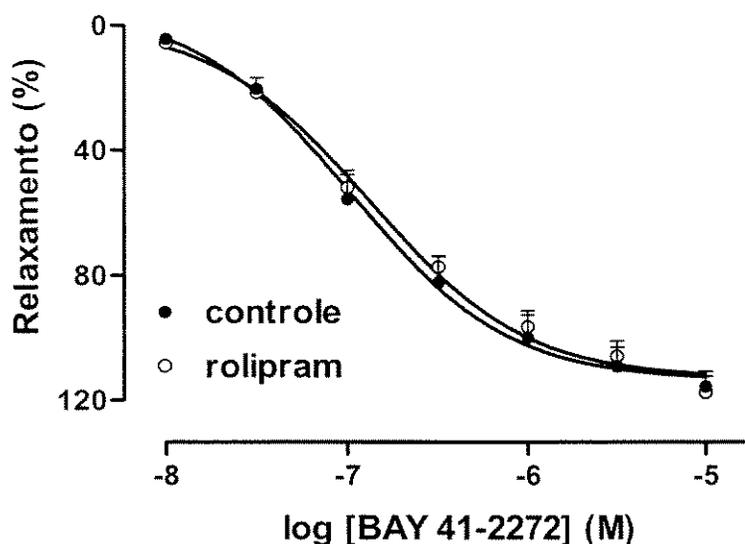


**Figura 10:** Efeitos do BAY 41-2272 (100 nM) sobre a duração dos relaxamentos induzidos pelo NO exógeno (1-100 µM) em corpo cavernoso de coelho. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento, calculadas em relação à contração induzida pela fenilefrina (10 µM). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em comparação com os respectivos valores controles de relaxamento.

### 3.1.3 – Participação da via adenilil ciclase – AMPc no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272

#### 3.1.3.1 - Efeito da inibição da fosfodiesterase tipo 4

A adição de rolipram potencializou o efeito do ativador de adenilil ciclase solúvel forskolin (0.01-10  $\mu$ M; n=4) promovendo um deslocamento significativo da curva concentração-resposta para a esquerda (tabela 3). Porém este mesmo inibidor não afetou a curva concentração -efeito ao BAY 41-2272, não alterando os parâmetros de potência e resposta máxima neste tecido (Figura 11, tabela 1).



**Figura 11:** Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram (10  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu$ M) em corpo cavernoso de coelho. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

**Tabela 1:** Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram (10  $\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pelo forskolin (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) e pelo BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso de coelho.

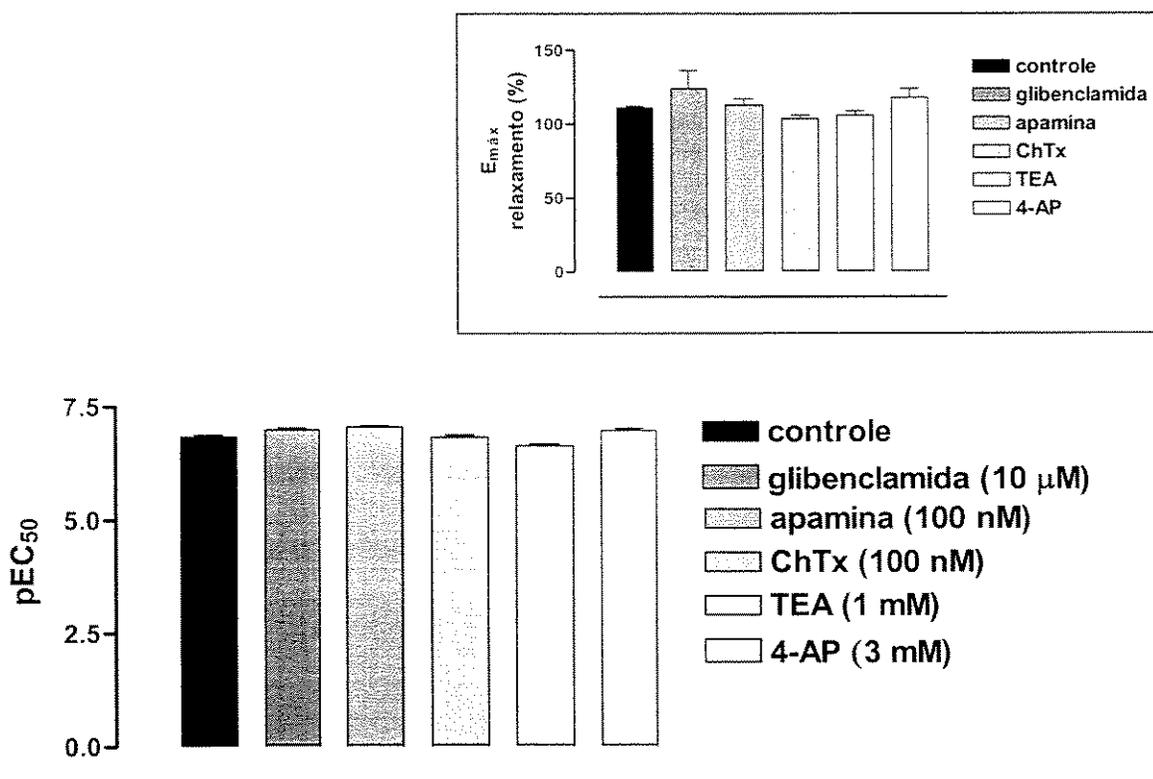
Potência de relaxamento ( $\text{pEC}_{50}$ )		
	BAY 41-2272	Forskolin
controle	$6.98 \pm 0.05$	$7.12 \pm 0.02$
+ Rolipram	$6.88 \pm 0.08$	$7.58 \pm 0.05^*$

Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ). \*  $P < 0.01$  comparado com os respectivos controles.

### 3.1.4 – Envolvimento dos canais de potássio no relaxamento induzido

#### pele BAY 41-2272

A adição dos bloqueadores específicos para canais de potássio não promoveu nenhuma alteração na curva concentração-resposta ao BAY 41-2272, onde não foi observado nenhum deslocamento significativo (Figura 12, Tabela 2), caracterizando assim uma resposta independente dos canais de potássio. Além disso, os bloqueadores não afetaram a resposta máxima promovida pelo BAY 41-2272.



**Figura 12:** Representação gráfica da  $pEC_{50}$  e  $E_{m\acute{a}x}$  em dos bloqueadores de canais de potássio no relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo BAY 41-2272 (0,01 – 10  $\mu$ M). Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relao ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

**Tabela 2:** Efeito dos bloqueadores de canal de potássio glibenclamida ( 10  $\mu$ M), apamina (100 nM), charibdotoxina (ChTx ;100 nM), 4-aminopiridina (4-AP; 1 mM) e tetraetilamônio (TEA; 3 mM) no relaxamento de corpo cavernoso de coelho induzido pelo BAY 41-2272.

	Potência de relaxamento (pEC <sub>50</sub> )	Resposta máxima (E <sub>max</sub> )
Coelho		
controle	6,83 $\pm$ 0,04	111 $\pm$ 1
glibenclamida	6,98 $\pm$ 0,05	124 $\pm$ 12
apamina	7,05 $\pm$ 0,03	113 $\pm$ 4
ChTx	6,82 $\pm$ 0,05	104 $\pm$ 2
4-AP	6,63 $\pm$ 0,05	106 $\pm$ 3
TEA	6,96 $\pm$ 0,05	118 $\pm$ 6

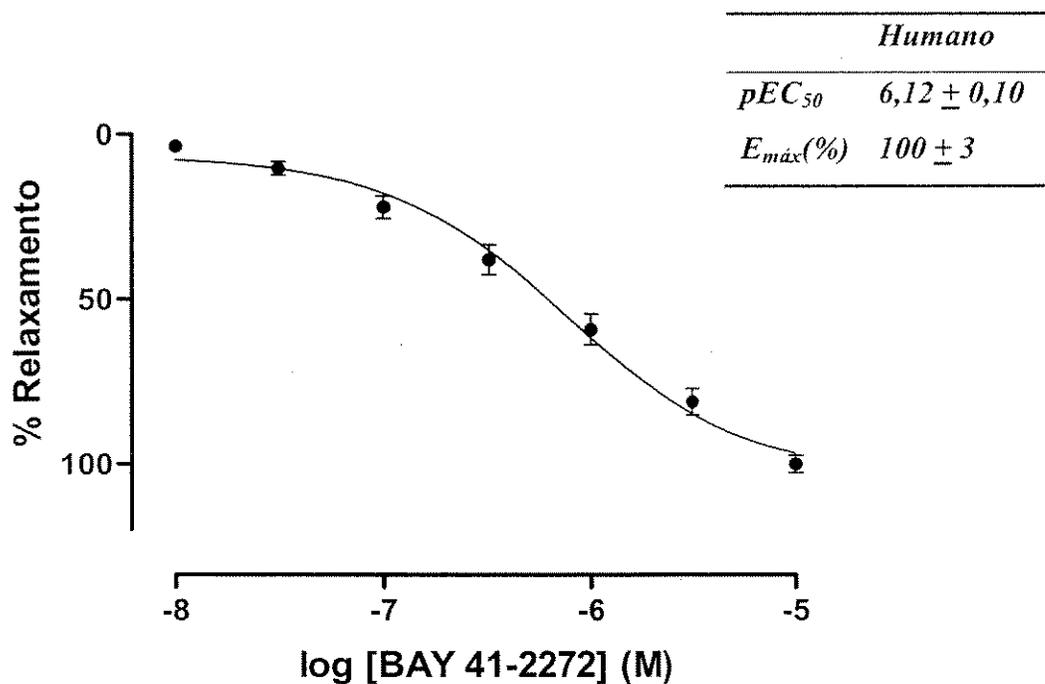
Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

### **3.2 - Corpo Cavernoso Humano**

**Estudos *in vitro***

### 3.2.1 - Efeitos do BAY 41-2272 no relaxamento de corpo cavernoso

O BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ , n=11) promoveu um relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso humano de modo dependente da concentração, sendo tal resposta duradoura (Figura 13).



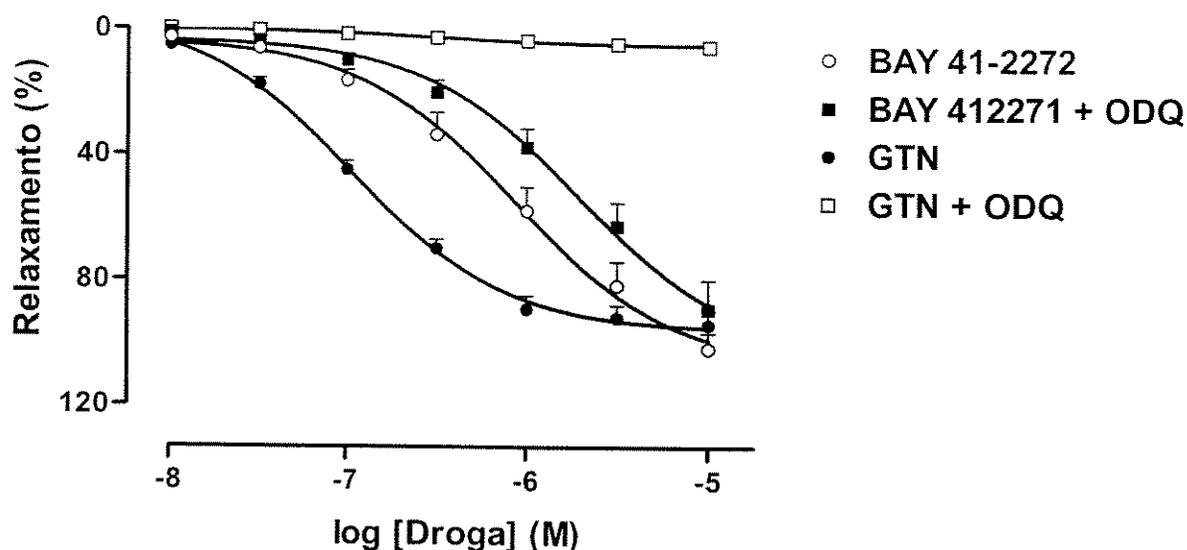
**Figura 13:** Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso humano. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias do relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ).

### 3.2.2 – Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY

41-2272

#### 3.2.2.1 - Efeitos do bloqueio da guanilil ciclase solúvel

Adição do inibidor da GCs, ODQ (10  $\mu$ M; n=7), levou a um aumento no tônus da preparação e inibiu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ( $pEC_{50} = 6.06 \pm 0.06$  na ausência e  $5.70 \pm 0.07$  na presença de ODQ, Figura 14), promovendo um deslocamento significativo para a direita (2.3 vezes) da curva concentração -efeito ao BAY 41-2272. Paralelamente a estes experimentos, foram realizadas curvas concentração-resposta controle para o GTN (0.01-10  $\mu$ M) nas quais o ODQ aboliu a resposta relaxante.

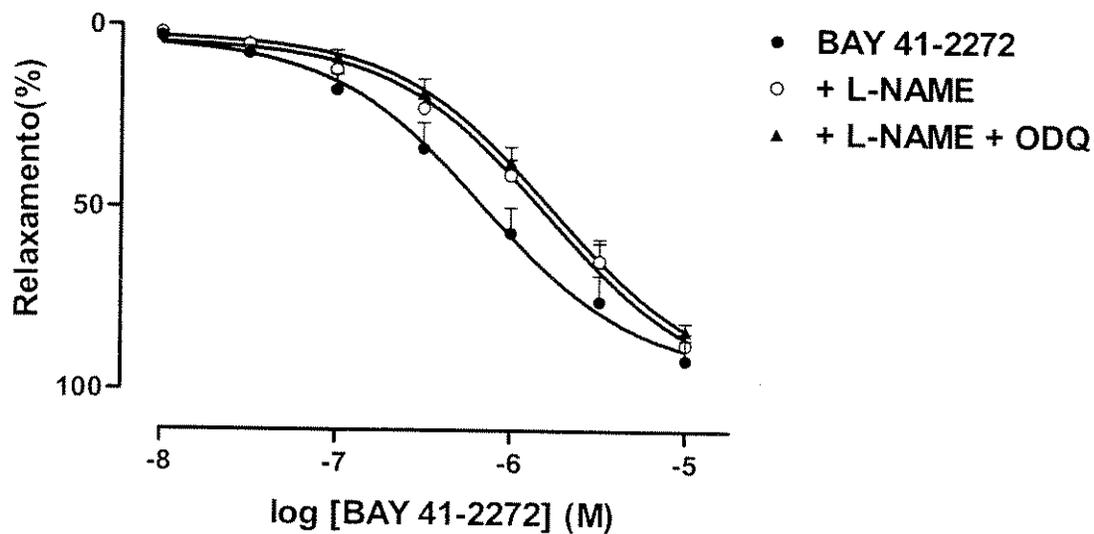


**Figura 14:** Efeitos do ODQ (10  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01 – 10  $\mu$ M; círculos) e pelo GTN (0.01 – 10  $\mu$ M, quadrados) em corpo cavernoso humano. Os valores experimentais foram obtidos na ausência (símbolos fechados) e na presença (símbolos abertos) de ODQ. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10 $\mu$ M).

### 3.2.2.2 - Efeitos da inibição da síntese de NO

A adição do inibidor da síntese de NO, L-NAME (100  $\mu$ M, n=5), promoveu um aumento do tônus da preparação e inibiu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 ( $pEC_{50}$   $6.16 \pm 0.06$  na ausência e  $5.81 \pm 0.07$  na presença de L-NAME; Figura 15) deslocando significativamente para a direita (2,5 vezes) a curva concentração-resposta. Paralelamente, foram realizadas curvas concentração-resposta controle para acetilcolina na qual o L-NAME aboliu a resposta relaxante como esperado.

Adição simultânea de ODQ e L-NAME (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, respectivamente; n=4) não promoveu nenhuma inibição adicional e, portanto nenhum deslocamento significativo em relação àquele experimento feito somente na presença de L-NAME ( $pEC_{50} = 5.81 \pm 0.07$  na ausência e  $5.78 \pm 0.12$  na presença de ODQ ; Figura 15).

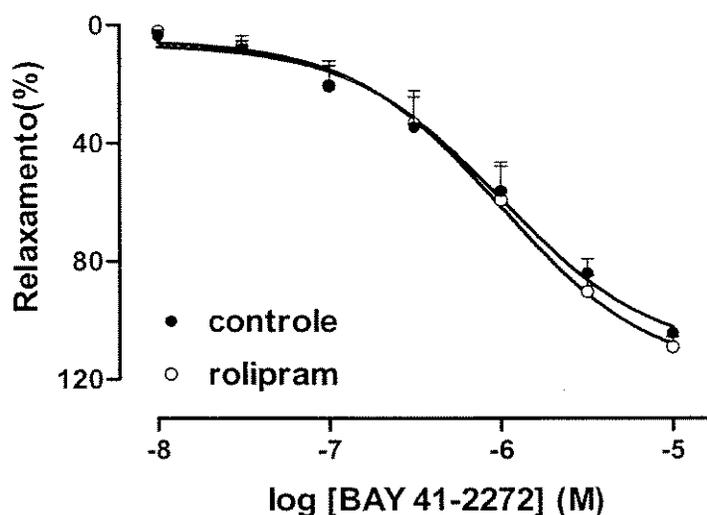


**Figura 15:** Efeitos do L-NAME (100  $\mu$ M) e do ODQ (10  $\mu$ M) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01 – 10  $\mu$ M) em corpo cavernoso humano. Os valores experimentais foram obtidos na ausência (círculos fechados) e na presença (círculos abertos) de L-NAME ou L-NAME mais ODQ (triângulos fechados). Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

### 3.2.3– Participação da via adenilil ciclase – AMPc no relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272

#### 3.2.3.1 - Efeito da inibição da fosfodiesterase tipo 4

A adição de rolipram (10  $\mu\text{M}$ ) potencializou o efeito ativador de adenilil ciclase solúvel forskolin (0.001-10  $\mu\text{M}$ ; n=4) promovendo um deslocamento significativo da curva concentração-resposta para a esquerda. Porém na curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 o rolipram não alterou os parâmetros de potência e resposta máxima neste tecido (Figura 16, Tabela 3).



**Figura 16:** Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram (10  $\mu\text{M}$ ; n=4) no relaxamento induzido pelo pelo BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso humano. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 3:** Efeitos do inibidor de fosfodiesterase tipo 4 rolipram (10  $\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pelo forskolin (0.001-10  $\mu\text{M}$ ) e pelo BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso humano.

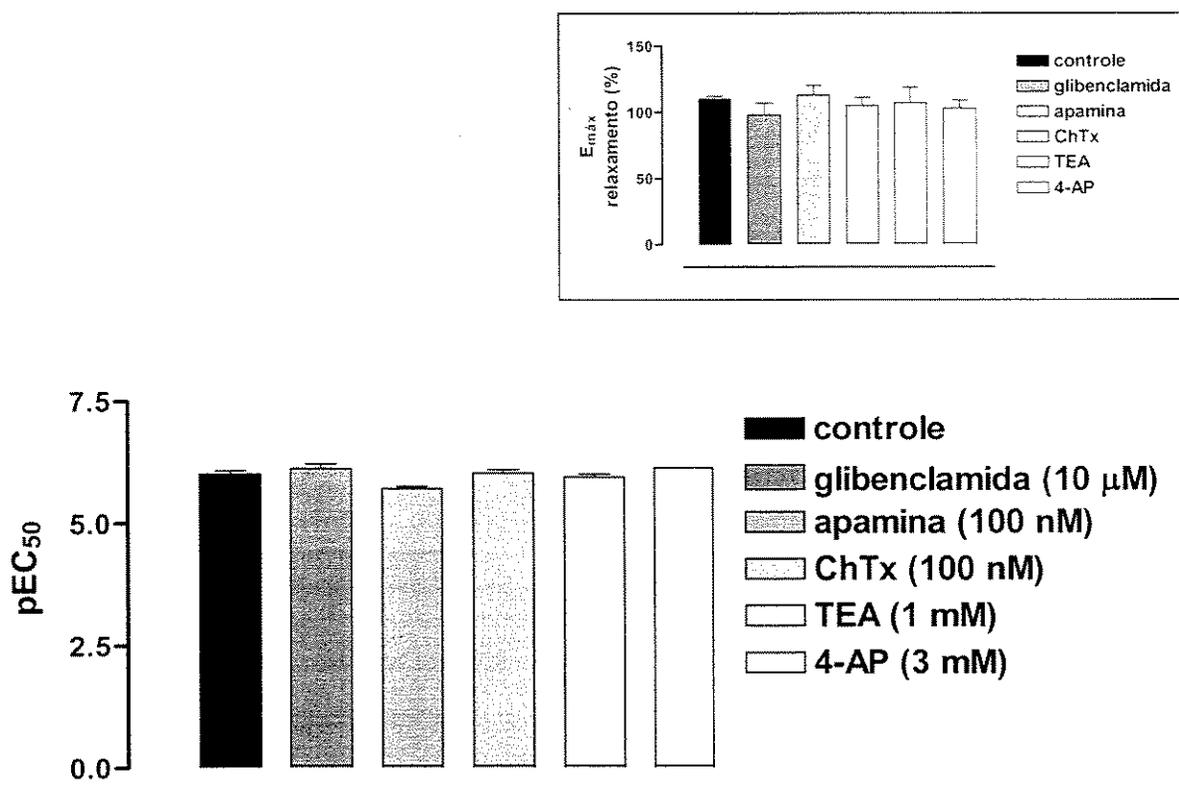
	Potência de relaxamento ( $\text{pEC}_{50}$ )	
	BAY 41-2272	Forskolin
controle	$5.99 \pm 0.09$	$6.17 \pm 0.05$
+ Rolipram	$6.00 \pm 0.07$	$6.51 \pm 0.02^*$

Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ). \*  $P < 0.01$  comparado com os respectivos controles.

### 3.2.4 – Envolvimento dos canais de potássio no relaxamento induzido

#### pele BAY 41-2272

A adição dos bloqueadores específicos para canais de potássio não promoveu nenhuma alteração na curva concentração-resposta ao BAY 41-2272, onde não foi observado nenhum deslocamento significativo (Figura 17, Tabela 4), caracterizando assim uma resposta independente dos canais de potássio. Além disso, os bloqueadores não afetaram a resposta máxima promovida pelo BAY 41-2272.



**Figura 17:** Efeito dos bloqueadores de canais de potássio ( $E_{m\acute{a}x}$ , painel lateral superior e  $pEC_{50}$ , painel inferior) no relaxamento de corpo cavernoso humano induzido pelo BAY 41-2272. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

**Tabela 4:** Efeito dos bloqueadores de canal de potássio glibenclamida (10  $\mu$ M), apamina (100 nM), charibdotoxina (ChTx ;100 nM), 4-aminopiridina (4-AP; 1 mM) e tetraetilamônio (TEA; 3 mM) no relaxamento de corpo cavernoso humano induzido pelo BAY 41-2272.

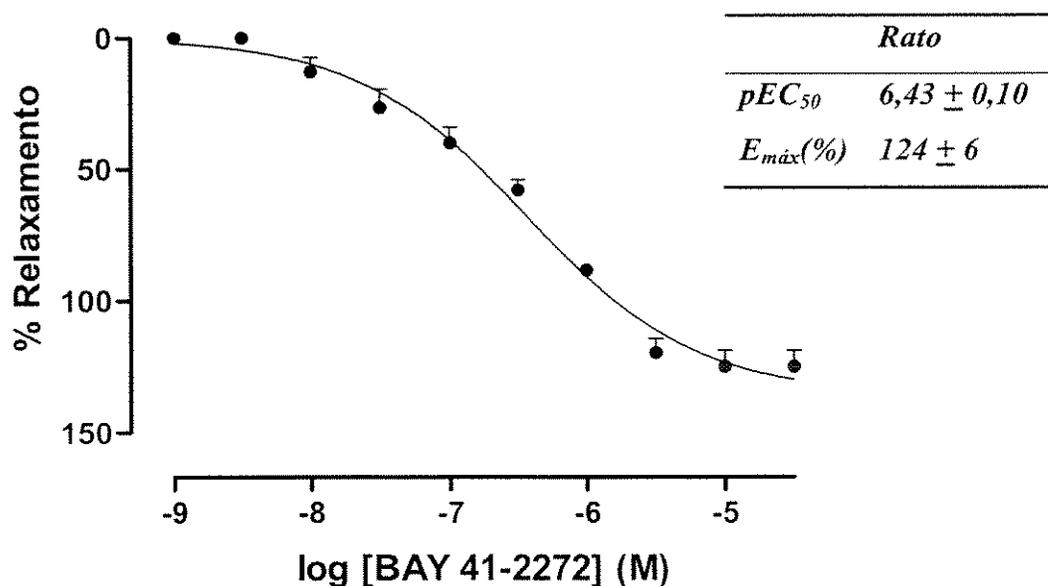
	Potência de relaxamento (pEC <sub>50</sub> )	Resposta máxima (E <sub>max</sub> )
	Humano	
controle	6,01 $\pm$ 0,06	110 $\pm$ 2
glibenclamida	6,13 $\pm$ 0,09	98 $\pm$ 9
apamina	5,71 $\pm$ 0,05	113 $\pm$ 7
ChTx	6,03 $\pm$ 0,07	105 $\pm$ 6
4-AP	5,95 $\pm$ 0,06	107 $\pm$ 12
TEA	6,14 $\pm$ 0,05	103 $\pm$ 6

Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

**3.3 - Corpo Cavernoso de Rato**  
**Estudos *in vitro* e *in vivo***

### 3.3.1 - Efeitos do BAY 41-2272 no relaxamento de corpo cavernoso

O BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ) promoveu um relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso de rato de modo dependente da concentração, sendo tal resposta duradoura (Figura 18).



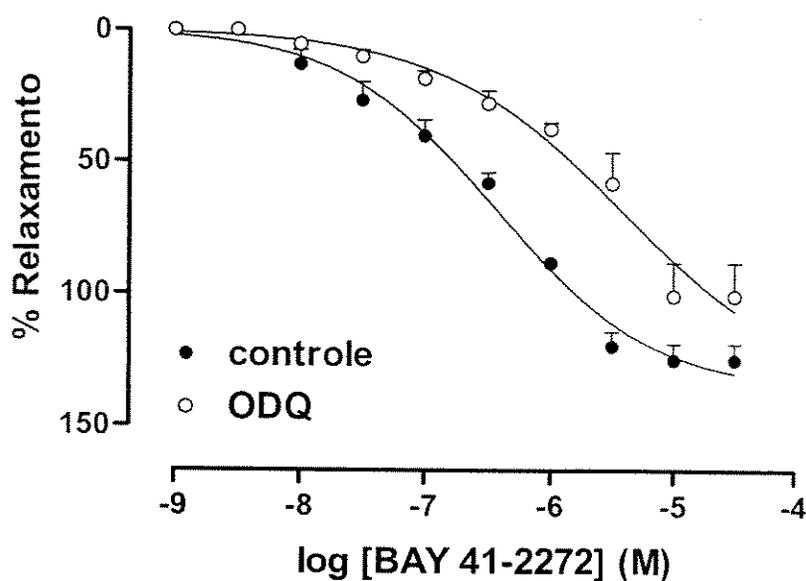
**Figura 18:** Curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) em corpo cavernoso de rato. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias do relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ).

### 3.3.2 – Participação da via NO-GMPc no relaxamento induzido pelo BAY

#### 41-2272

##### 3.3.2.1 - Efeitos do bloqueio da guanilil ciclase solúvel

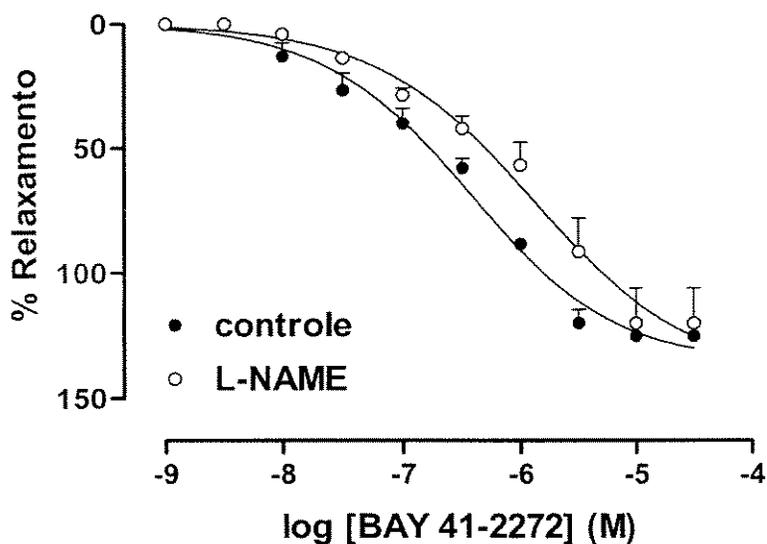
Adição do inibidor da GCs, ODQ (10  $\mu$ M), levou a um aumento no tônus da preparação e promoveu um deslocamento significativo para a direita (10,2 vezes,  $n=5$ ) da curva concentração -efeito ao BAY 41-2272 em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M; Figura 19; Tabela 5).



**Figura 19:** Curvas concentração-resposta ao BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu$ M) na ausência (círculos fechados) e na presença (círculos abertos) de ODQ (10  $\mu$ M), em corpo cavernoso de rato. Os dados representam médias  $\pm$  erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu$ M).

### 3.3.2.2 - Efeitos da inibição da síntese de NO

A adição do inibidor da síntese de NO, L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), promoveu um aumento do t $\acute{o}$ nus da prepara $\acute{c}$ o e inibiu o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 deslocando significativamente para a direita (3,5 vezes,  $n=4$ , Figura 20; Tabela 5) da curva concentra $\acute{c}$ o-resposta.



**Figura 20:** Curvas concentra $\acute{c}$ o-resposta ao BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ) na aus $\acute{e}$ ncia (c $\acute{r}$ culos fechados) e na presen $\acute{c}$ a (c $\acute{r}$ culos abertos) de L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), em corpo cavernoso de rato. Os dados representam m $\acute{e}$ dias  $\pm$  erro padr $\acute{o}$  das m $\acute{e}$ dias de relaxamento calculadas em rela $\acute{c}$ o ao *tonus* induzido pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 5:** Efeito do inibidor de NO sintase, L-NAME (100  $\mu$ M; n=4), e do inibidor de guanilil ciclase solúvel ODQ, (10  $\mu$ M; n=6) no relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (0.01-10  $\mu$ M) em corpo cavernoso de rato.

	<i>BAY 41-2272</i>	
	<i>pEC<sub>50</sub></i>	<i>Emáx</i>
<i>Controle</i>	6.44 $\pm$ 0.10	124 $\pm$ 6
<i>L-NAME</i>	5.89 $\pm$ 0.16 *	120 $\pm$ 14
<i>ODQ</i>	5.42 $\pm$ 0.37 **	100 $\pm$ 12

\*\*p<0.01 e \*p<0.05 comparado aos valores controle.

### 3.3.2.3 Análise comparativa de acordo com os parâmetros de potência e resposta máxima induzidas pelo BAY 41-2272 em corpo cavernoso de coelho rato e humano nos estudos *in vitro*

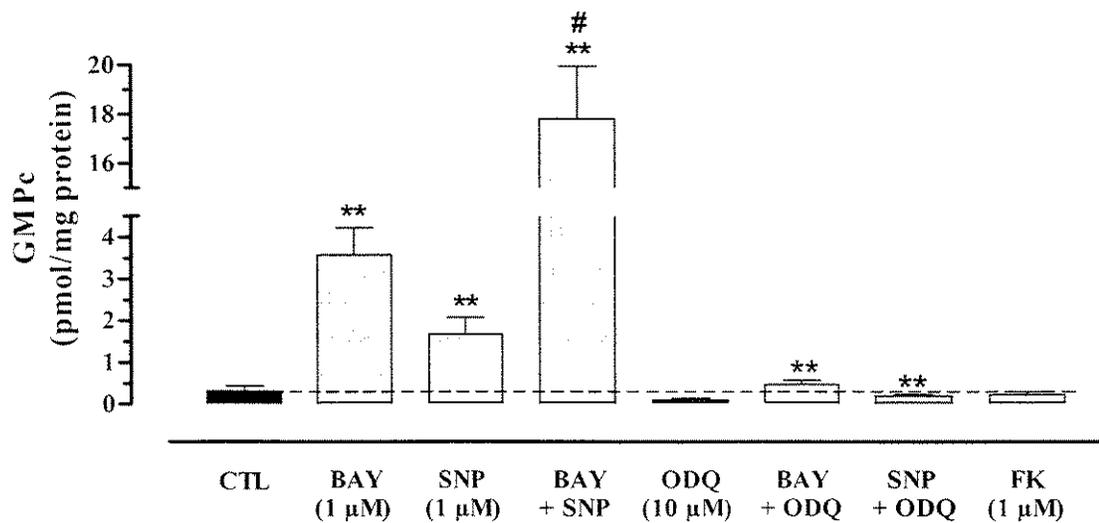
Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* demonstraram que o BAY 41-2272 foi mais potente no relaxamento de corpo cavernoso de coelho, seguido de rato e humano, embora não haja nenhuma diferença significativa nos relaxamentos máximos alcançados nas três espécies.

**Tabela 6:** Tabela comparativa de potência e resposta máxima do relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272 nas espécies estudadas.

<i>BAY 41-2272</i>		
	<i>pEC<sub>50</sub></i>	<i>Emáx</i>
<i>Coelho</i>	$6,82 \pm 0,06$	$116 \pm 2$
<i>Rato</i>	$6,43 \pm 0,10$	$124 \pm 6$
<i>Humano</i>	$6,12 \pm 0,10$	$100 \pm 2$

#### 3.3.2.4 - Efeito do BAY 41-2272 no aumento do conteúdo de nucleotídeo cíclico GMPc em corpo cavernoso de rato.

Em strips de corpo cavernoso de rato, o BAY 41-2272 (1  $\mu$ M, n=3) aumentou significativamente os níveis de GMPc em corpo cavernoso de rato. Em experimento controle o doador de NO, SNP (1  $\mu$ M, n=3), promoveu um aumento significativo dos níveis de GMPc. Além disso, com a administração simultânea de BAY 41-2272 mais SNP observou-se uma potencialização da resposta elevando-se esses níveis para valores superiores aos obtidos na presença dos dois ativadores sozinhos. O inibidor da guanilil ciclase solúvel, ODQ (10  $\mu$ M; n=3), inibiu o aumento de GMPc induzido pelo BAY 41-2272 em 87 % . O forskolin, um ativador de adenilil ciclase, foi utilizado como controle negativo e não promoveu alteração nos níveis de GMPc tecidual ( Figura 21; Tabela 7).

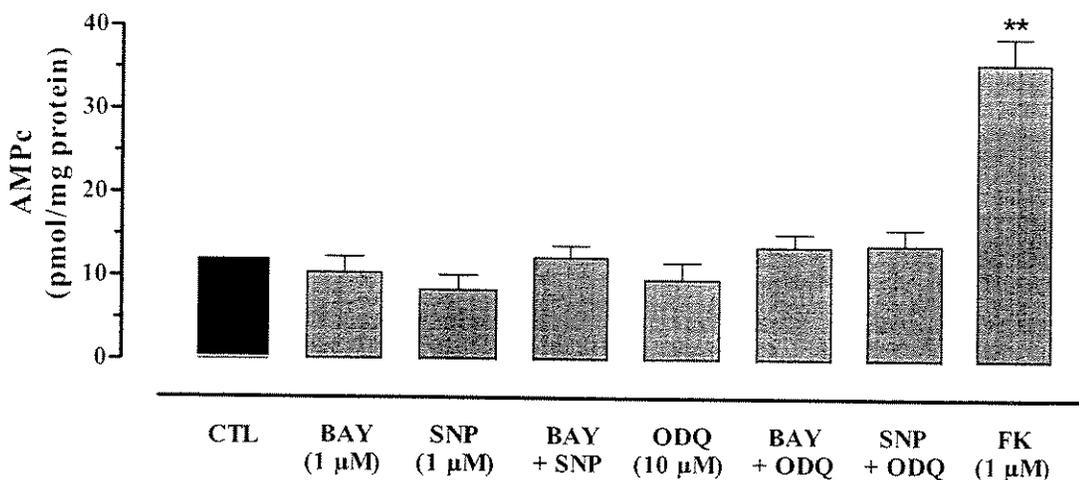


**Figura 21:** Conteúdo de GMPc (painel inferior) em strip de corpo cavernoso de rato exposto ao veículo, BAY 41-2272 (1 μM) ou SNP (1 μM) na ausência e na presença de ODQ (10 μM) ou BAY + SNP . Os níveis de GMPc são expressos como a média ± SEM de 3 experimentos. \*\* $P < 0,01$  comparado ao controle; # $P < 0,01$  comparado a soma de BAY 41-2272 e SNP sozinhos.

### 3.3.3 – Participação da via Adenilil ciclase – AMPc no relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272

#### 3.3.3.1 - Efeito do BAY 41-2272 no aumento do nucleotídeo cíclico AMPc em corpo cavernoso de rato.

O BAY 41272 não teve influência no conteúdo de AMPc presente em strip de corpo cavernoso de rato, uma vez que este conteúdo se manteve constante em todos os protocolos realizados. O ativador da adenilil ciclase solúvel, forskolin, foi utilizado como controle positivo e promoveu um aumento significativo nos níveis de AMPc da preparação quando comparado ao controle (n=3; Figura 22; Tabela 7).



**Figura 22:** Conteúdo de AMPc em strip de corpo cavernoso de rato exposto ao veículo, BAY 41-2272 (1 μM) ou SNP (1 μM) na ausência e na presença de ODQ (10 μM) ou BAY + SNP. Os níveis de AMPc são expressos como a média ± SEM de 3 experimentos. \*\* $P < 0,01$  comparado ao controle; # $P < 0,01$  comparado a soma de BAY 41-2272 e SNP sozinhos.

**Tabela 7:** Conteúdo de GMPc e AMPc em strips corpo cavernoso de rato expostos ao BAY 41-2272 (1 uM), SNP (1uM) na presença e na ausência de ODQ (10uM) ou ao BAY + SNP simultaneamente.

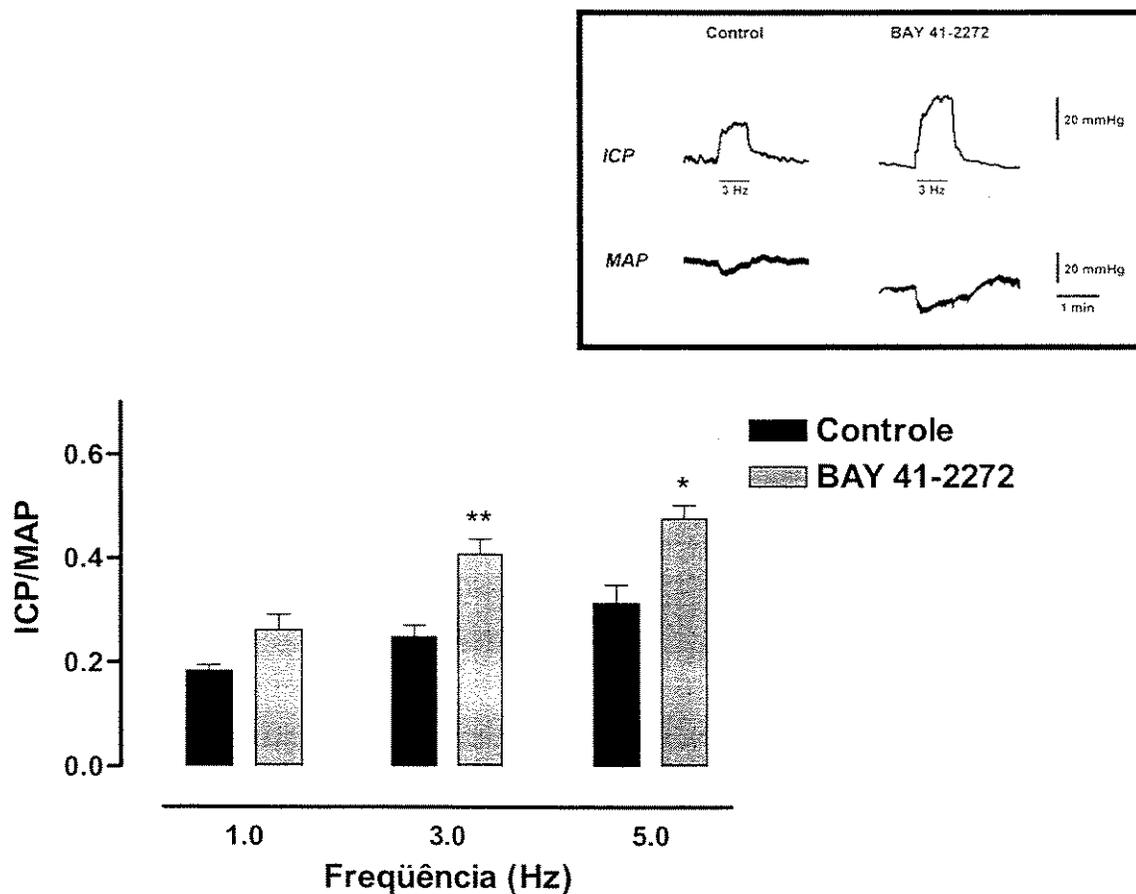
Níveis de nucleotídeo cíclico em corpo cavernoso isolado de rato (pmol nucleotídeo cíclico/mg de proteína)		
	GMPc	AMPc
controle	0,31 ± 0,11	12,26 ± 1,35
BAY 41-2272	3,57 ± 0,64 **	10,48 ± 1,93
SNP	1,67 ± 0,39 **	8,44 ± 1,78
BAY + SNP	17,82 ± 2,13 ** #	12,39 ± 1,40
ODQ	0,10 ± 0,04	9,76 ± 2,02
BAY + ODQ	0,47 ± 0,09**	13,73 ± 1,56
SNP + ODQ	0,20 ± 0,03**	13,98 ± 1,92
Forskolin	0,22 ± 0,06	35,75 ± 3,13**

Os níveis de GMPc são expressos como a média ± SEM de n experimentos. \*\* $P < 0.01$  comparado ao controle; # $P < 0.01$  comparado a soma de BAY 41-2272 e SNP sozinhos.

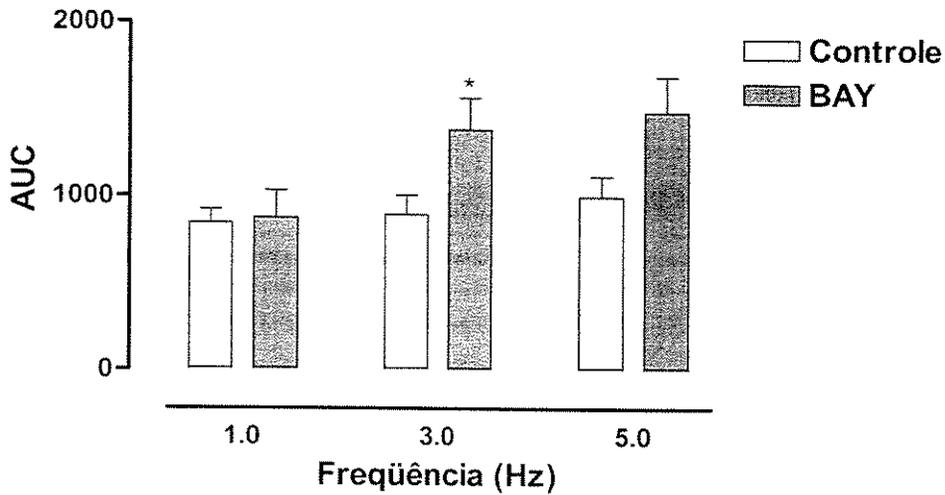
### 3.3.4 - Efeitos da administração de BAY 41-2272 no aumento da pressão intracavernosa de rato – estudo *in vivo*

A pressão intracavernosa (ICP) e a pressão arterial média (MAP) dos ratos anestesiados em condições basais registradas permaneceram entre os valores médios de  $13 \pm 1$  mmHg and  $98 \pm 5$  mmHg, respectivamente (n=10). A estimulação elétrica do nervo cavernoso causou aumentos sustentados na ICP de maneira frequência-dependente (1-5 Hz), acompanhado de diminuições transitórias na MAP. A razão ICP sobre MAP foi utilizada para estabelecer um índice de atividade erétil controlada por alterações na MAP. A frequência mais alta utilizada (5 Hz) produziu um aumento da ICP de  $36 \pm 3$  mmHg, que correspondeu a uma diferença no índice médio de ICP/MAP de  $0.36 \pm 0.12$  em comparação à situação controle sem estímulo.

A administração intracavernosa de BAY 41-2272 ( $0.6 \mu\text{mol/Kg}$ ; n=5) não afetou significativamente a razão ICP/MAP na ausência da estimulação elétrica do nervo cavernoso ( $0.16 \pm 0.02$  em condições controle;  $0.17 \pm 0.02$  depois de 5 minutos da administração de BAY 41-2272). Entretanto, BAY 41-2272 aumentou significativamente a resposta induzida pela estimulação elétrica alterando os significativamente a razão ICP/MAP (Figura 23; Tabela 8), bem como a área sobre a curva (AUC; figura 24, Tabela 8). Os picos de pressão intracavernosa chegaram a valores 60 % mais altos com relação às condições controle.



**Figura 23:** Efeito da administração intracavernosa do ativador de guanilil ciclase solúvel BAY 41-2272 sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Resultados foram calculados como a razão ICP/MAP. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M. \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado aos valores controle.



**Figura 24:** Efeito da administração intracavernosa do ativador de guanilil ciclase solúvel BAY 41-2272 sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Resultados foram calculados como a área sobre a curva (AUC). A AUC foi expressa em mmHg.s e calculada durante o estímulo nervoso. Dados representam a média  $\pm$  S.E.M. de *n* experimentos. \* $p < 0.05$  comparado aos valores controle.

**Tabela 8.** Efeito na pressão intracavernosa (ICP) durante a estimulação do nervo cavernoso (3 Hz), 5 minutos após a administração intracavernosa do ativador de guanilil ciclase solúvel BAY 41-2272 (0,6  $\mu$ mol/kg; *n*=5) *in vivo*.

	Controle	BAY 41-2272 (5 min)
AUC	892 $\pm$ 112	1382 $\pm$ 180 *
ICP/MAP	0,24 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,03 **

\* $P < 0.05$  comparado com o controle; e \*\* $P < 0.01$  comparado ao controle .

## **4. DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos demonstram que o BAY 41-2272 causa um relaxamento sustentado e concentração - dependente em tecido cavernoso pré-contraído de coelho, humano (Baracat et al., 2003) e rato, embora haja diferenças nos parâmetros de potência e resposta máxima entre estes tecidos. No presente estudo, o BAY 41-2272 demonstrou-se mais potente no relaxamento de corpo cavernoso de coelho, embora o relaxamento máximo alcançado não foi significativamente modificado de espécie para espécie. É válido mencionar que os seguimentos de corpo cavernoso humano utilizados nos experimentos foram provenientes de doadores de órgãos saudáveis.

O ODQ é um composto que inibe a atividade da guanilil ciclase solúvel sensível ao NO (Garthwaite *et al.*, 1995) e é freqüentemente utilizado nos estudos dos mecanismos de transdução de sinais da via NO-GMPc. Drogas como o gliceril trinitrato tem seu efeito relaxante mediado pelo NO (Feelisch, 1998), que se liga ao grupamento heme da enzima guanilil ciclase solúvel ativando-a, favorecendo assim a conversão do GTP em GMPc (Lucas *et al.*, 2000). Este efeito inibitório do ODQ sob a enzima sensível ao NO é devido à mudanças no estado de oxidação do grupamento heme, afetando a conformação da enzima, impedindo a ativação do seu sítio catalítico (Zhao *et al.*, 2000). Sendo assim, o relaxamento de corpo cavernoso, induzido pelo NO endógeno ou exógeno, foi abolido nos experimentos realizados.

Embora o ODQ tenha seu mecanismo de ação centrado na oxidação do grupamento heme da guanilil ciclase solúvel, é provável que ele também possa exercer um mecanismo alostérico por interferência na ligação do BAY 41-2272

como enzima, como os resultados observados de mudanças ocorridas na estrutura secundária da enzima recombinante quando o ODQ foi adicionado à guanilil ciclase solúvel estimulada pelo NO (Kosarikov *et al.*, 2001). É interessante observar que, tanto em coelho como em rato e humano, o ODQ afetou apenas parcialmente o relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272. Em outro estudo, demonstrou-se que, mesmo na presença da enzima purificada, o ODQ também não aboliu a estimulação da guanilil ciclase solúvel induzida pelo BAY 41-2272 (Stasch *et al.*, 2001).

O tratamento com L-NAME produziu um deslocamento para a direita da curva ao BAY 41-2272, em corpo cavernoso de coelho, rato e humano, indicando que o NO liberado do endotélio sinusoidal tem efeito sinérgico com o BAY 41-2272, como observado em ensaios com a enzima purificada (Stasch *et al.*, 2001). Estas evidências ainda não revelam se estes resultados são reflexos de uma liberação basal de NO ou, então, se o próprio BAY 41-2272 induz liberação de NO. Outros experimentos já demonstraram que o precursor do BAY 41-2272, YC-1, causa liberação de NO de células endoteliais através de um mecanismo dependente de cálcio (Wohlfart *et al.*, 1999). Além disso, os resultados que demonstram que não há nenhuma inibição adicional da resposta relaxante induzida pelo BAY 41-2272 em tecidos tratados com L-NAME e subsequentemente incubados com ODQ reforçam a idéia de que o deslocamento da curva concentração -efeito ao BAY 41-2272 para a direita provocado pelo ODQ é devido principalmente à inibição da guanilil ciclase solúvel estimulada por NO endógeno. Estes resultados realçam a hipótese de que o relaxamento de corpo

cavernoso induzido pelo BAY 41-2272 pode ser devido a ativação de uma via secundária, independente do aumento de GMPc ou, então, que o ODQ somente inibe a ativação da enzima que é sensível ao NO. Esta última hipótese é reforçada pelo fato de que o deslocamento da curva concentração-resposta ao BAY 41-2272 para a direita provocado pelo L-NAME foi similar àquele induzido pelo ODQ.

É visto que drogas que estimulam a adenilil ciclase como o forskolin, a prostaglandina  $E_1$  e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) causam relaxamento de corpo cavernoso (Hedlund *et al.*, 2000; Mizusawa *et al.*, 2001). Inibidores de fosfodiesterase tipo 4, como rolipram, aumentam as respostas relaxantes evocadas por estes agentes por previnirem a hidrólise do AMPc (Sparwasser *et al.*, 1994; Bivalacqua *et al.*, 1999). Realmente, os resultados demonstram que o rolipram causa um deslocamento para a esquerda da curva concentração-efeito ao forskolin. Porém, o rolipram não afeta os parâmetros de potência e resposta máxima do BAY 41-2272 em coelho e humano, sugerindo que a via adenilil ciclase-AMPc não está envolvida nesta resposta relaxante nestes tecidos. Em ratos, o BAY 41-2272 não proporcionou nenhum aumento dos níveis de AMPc medidos, reafirmando que também nesta espécie, esta droga não interfere na via adenilil ciclase –AMPc.

Por conseguinte, analisando-se a participação dos canais de potássio no relaxamento de corpo cavernoso de coelho e humano induzido pelo BAY 41-2272 constatou-se que esses canais não interferem na resposta relaxante evocada pela droga em estudo, uma vez que os bloqueadores desses canais utilizados, ou seja, apamina, charibdotoxina, 4-aminopiridina, tetraetilamônio e glibenclamida não

afetaram o efeito relaxante de maneira significativa. Este é um dado interessante uma vez que drogas que modulam a via do GMPc parecem estar intimamente ligadas à ativação desses canais no relaxamento do músculo liso de corpo cavernoso e outros tecidos vasculares. Trabalhos anteriores utilizando artéria peniana de cavalo constataram que, o NO liberado de fibras NANC, age por ativação da guanilil ciclase e acúmulo de GMPc, seguido da abertura dos canais de potássio ativados por cálcio. Estes canais quando ativados causam uma hiperpolarização de membrana e relaxamento da artéria peniana, auxiliando no mecanismo de ereção (Simonsen *et al.*, 1995). Outros trabalhos que investigam a participação dos canais de potássio na resposta vasodilatadora induzida pela ACh também confirmam esta hipótese, uma vez que demonstraram que ChTX e 4-AP reduziram a vasodilatação causada pela ACh em aorta torácica de rato (Ferrer *et al.*, 1999; Adeagbo e Malik, 1990), ou seja, pode haver uma participação dos canais de potássio dependentes de  $Ca^{++}$  nesta resposta que é mediada pela via do GMPc. Além disso, o bloqueador de canal de potássio dependente de cálcio, charibdotoxina, reduziu o relaxamento induzido por diferentes doadores de NO em diferentes artérias de cobaia sugerindo que parte de seu relaxamento está ligado à ativação desses canais (Bialecki & Stinson-Fisher, 1995). Por outro lado, trabalhos utilizando aorta femoral isolada de coelho demonstraram que o NO exógeno produziu uma hiperpolarização transitória de membrana a qual foi bloqueada pela glibenclamida, porém o relaxamento foi mantido, sugerindo que há uma independência entre a hiperpolarização da célula de músculo liso vascular e a vasodilatação (Plane *et al.*, 1995). Outros trabalhos ainda descrevem a ativação de canais de potássio ativados por cálcio por mecanismo dependente (Bolotina,

1994) e independente de GMPc (Archer *et al.*, 1994). Em corpo cavernoso de coelho, o TEA aboliu as alterações nas concentrações de K<sup>+</sup> intracelulares provocadas pela ACh (Seftel *et al.*, 1996), sugerindo mais uma vez a participação dos canais de potássio dependentes de cálcio e de voltagem na via NO-GMPc. Estudos recentes, relataram que o YC-1 por produzir uma ativação da guanilil ciclase e conseqüente aumento dos níveis de GMPc, causou um efeito inibitório no mecanismo de contração das células de músculo liso de endométrio de ratas gestantes e este efeito parece ser mediado por canais de potássio ativados ATP, uma vez que o uso da glibenclamida reduziu este efeito inibitório (Cetin *et al.*, 2004). Estes resultados realçam a hipótese de que o relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272 pode ser devido a ativação de uma via secundária, independente do aumento de GMPc.

No presente estudo, análises subseqüentes tiveram como objetivo a investigação da participação do BAY 41-2272 no relaxamento nitrérgico de corpo cavernoso e o seu sinergismo com o NO exógeno. Pôde-se observar que o composto potencializou a resposta relaxante evocada pelo estímulo elétrico em coelhos, assim como pelo NO exógeno uma vez que aumentou significativamente a duração da resposta, nesta espécie animal, embora não tenha interferido em sua amplitude. Estes resultados, juntamente com os resultados obtidos anteriormente, onde o tratamento com L-NAME produziu um deslocamento para a direita da curva ao BAY 41-2272, em corpo cavernoso de coelho, humano e rato, o NO liberado tanto do endotélio sinusoidal como o proveniente de fibras NANC possui uma interação com o BAY 41-2272, como observado em ensaios com a

enzima purificada (Stasch *et al.*, 2001). Como dito anteriormente, estas evidências ainda não revelam se estes resultados são reflexos de uma liberação basal de NO ou, então, se o próprio BAY 41-2272 induz liberação de NO. Sendo assim, estudos subseqüentes que investigaram a participação direta do composto BAY 41-2272 no aumento do GMPc tecidual foram necessários a fim de se esclarecer o grau de interferência desta droga na via NO-GMPc.

Sendo assim, os dados obtidos posteriormente, demonstraram que o ativador de guanilil ciclase solúvel BAY 41-2272 induziu relaxamento de corpo cavernoso de rato através do aumento de GMPc tecidual. O BAY 41-2272 induziu um aumento acentuado nas concentrações de GMPc o qual foi praticamente abolido pelo ODQ confirmando que, nesta espécie animal, seu efeito foi dependente de guanilil ciclase solúvel. Em tecidos expostos simultaneamente ao BAY 41-2272 e ao ODQ há uma tendência do conteúdo de GMPc ser maior do que o encontrado em tecidos expostos ao SNP na presença de ODQ e em tecidos controle. Este resultado pode ser atribuído ao fato de ativadores da enzima guanilil ciclase solúvel no sítio independente de NO possuírem atividade dependente e independente do grupamento heme (Martin, *et al.*, 2001; Becker, *et al.*, 2001). Este dado está de acordo com aqueles encontrados em estudos anteriores nos quais a estimulação da guanilil ciclase solúvel induzida pelo YC-1 e pelo BAY 41-2272 não foi completamente bloqueada pelo ODQ (Martin, *et al.*, 2001; Becker, *et al.*, 2001).

No mesmo ensaio de dosagem, foi possível confirmar o efeito sinérgico entre o BAY 41-2272 e o doador de NO, SNP, visto que o conteúdo de GMPc, quando comparado aquele induzido pelo BAY 41-2272 sozinho na preparação,

aumentou muito significativamente. Este achado confirma os resultados obtidos em experimentos realizados com ratos anestesiados, onde, através da medida de pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso, observou-se um sinergismo entre o BAY 41-2272 e o NO liberado das fibras nitrérgicas, o que proporcionou uma melhora na resposta erétil. Esta hipótese já foi estudada em estudo anterior realizado com YC-1, precursor do BAY 41-2272, demonstrando um aumento da pressão intracavernosa em ratos anestesiados, na dose de 10  $\mu\text{mol/kg}$  administrado por via intraperitoneal, aumentando a amplitude e a duração da resposta erétil (Mizusawa, 2002). No presente estudo constatou-se que a administração intracavernosa de BAY 41-2272 aumentou significativamente a pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico facilitando a ereção peniana *in vivo*. Estes resultados reforçam os achados deste estudo, onde o BAY 41-2272 demonstrou efeito sinérgico com o NO endógeno em experimentos *in vitro* e demonstrou ser eficiente no aumento da ereção em experimento *in vivo* sem afetar parâmetros fisiológicos importantes como pressão arterial.

## **5. CONCLUSÃO**

O presente trabalho demonstrou que:

- BAY 41-2272 promoveu um relaxamento duradouro e concentração-dependente do músculo liso de corpo cavernoso em coelho, rato e humano *in vitro*;
- O BAY 41-2272 potencializou a resposta erétil de rato induzida pelo estímulo elétrico *in vivo*;
- O relaxamento promovido pelo BAY 41-2272 em coelho, rato e humano *in vitro* foi dependente da via GCs - GMPc, mas não da via ACs – AMPc;
- O NO endógeno liberado tanto de fibras nitrérgicas quanto de endotélio sinusoidal interage com o BAY 41-2272 aumentando sua resposta relaxante;
- Os canais de potássio não interferiram no relaxamento de corpo cavernoso de coelho e humano promovido pelo BAY 41-2272, *in vitro*.

Portanto, o BAY 41-2272 pode ser considerado uma ferramenta de grande importância nos estudos de novos tratamentos para a disfunção erétil orgânica, uma vez que, ativando a enzima guanilil ciclase solúvel em sítio diferente ao do NO e sendo eficiente no aumento de GMPc intracelular, poderia atuar em quadros caracterizados por escassez de NO endógeno ocasionados, por sua vez, por disfunções endoteliais e por neuropatias freqüentemente desenvolvidas com o envelhecimento, através de hábitos como o tabagismo e em doenças de grande prevalência como diabetes, hipertensão e dislipidemias.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOSEIF SR & LUE TH (1988) Hemodynamics of penile erection. *Urol Clin North Am*, **15**: 1-7.

ABU-SOUD HM, YOHO LL & STUEHR DJ (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem*, **269**: 32047-32050.

ANDERSSON KE & WAGNER G (1995) Physiology of penile erection. *Physiol Rev*, **75**: 191-236.

ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(16):7583-7

AYAJIKI K, HAYASHIDA H, OKAMURA T & TODA N (1997) Pelvic nerve stimulation-induced pressor responses in corpus cavernosum of anesthetized dogs. *Am J Physiol*, **273**: H2141-H2145.

AZADZOI KM, KIM N, GOLDSTEIN I, BROWN M, COHEN R & SAENZ DE TEJADA I (1992) Modulation of penile corpus cavernosum smooth muscle tone by endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products. *J Urol*, **147**: 220-225

BARACAT JS, TEIXEIRA CE, OKUYAMA CE, PRIVIERO FB, FARO R, ANTUNES E, DE NUCCI G (2003) Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*. 2003 **477**(2):163-9.

BECKER EM, ALONSO-ALIJA C, APELER H, GERZER R, MINUTH T, PLEIBETA U, SCHMIDT P, SCHRAMM M, SCHRODER H, SCHROEDER W, STEINKE W, STRAUB A, STASCH JP. (2001) NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol.*; **1**: 13.

BEHREND S, STEENPASS A, PORST H & SCHOLZ H (2000) Expression of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase subunits in human corpus cavernosum. *Biochem Pharmacol*, **59**: 713-717.

BIALECKI RA, STINSON-FISHER C (1995) KCa channel antagonists reduce NO donor-mediated relaxation of vascular and tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*, **268**(1 Pt 1):L152-9

BITSCH M, KROMANN-ANDERSEN B, SCHOU J & SJONTOFT E (1990) The elasticity and the tensile strength of tunica albuginea of the corpora cavernosa. *J Urol*, **143**: 642-645.

BIVALACQUA, T.J., CHAMPION, H.C., RAJASEKARAN, M., SIKKA, S.C., KADOWITZ, P.J., DOHERTY, P.C., HELLSTROM, W.J., 1999. 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**, 1848-1855.

BLANCO R, SAENZ DE TEJADA I, GOLDSTEIN I, KRANE RJ, WOTIZ HH & COHEN RA (1988) Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II. Acetylcholine synthesis. *Am J Physiol*, **254**: H468-H472.

BOERRIGTER G, COSTELLO-BOERRIGTER LC, CATALIOTTI A, TSURUDA T, HARTY GJ, LAPP H, STASCH JP, BURNETT JC JR. (2003) Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation*. **11**;107(5):686-9.

BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**(6474):850-3

BOUCHER JL, MOALI C & TENU JP (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*, **55**: 1015-1028.

BRIONI JD, NAKANE M, HSIEH GC, MORELAND RB, KOLASA T, SULLIVAN JP. (2002) Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **14**: 8-14.

BUECHLER WA, NAKANE M & MURAD F (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun*, **174**: 351-357.

BURETTE, A., PETRUSZ, P., SCHMIDT, H.H., WEINBERG, R.J., (2001). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the ventral cochlear nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 431, 1-10.

BURNETT AL, LOWENSTEIN CJ, BREDT DS, CHANG TSK & SNYDER SH (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, **257**: 401-403.

BURNETT AL, TILLMAN SL, CHANG TS, EPSTEIN JI, LOWENSTEIN CJ, BREDT DS, SNYDER SH, WALSH PC. (1993) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol.*; **150**(1):73-6.

BUSH PA, ARANSON WJ, BUGA GM, RAJFER J & IGNARRO LJ (1992b) Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol*, **147**: 1650-1655.

BUSH PA, ARANSON WJ, RAJFER J, BUGA GM & IGNARRO LJ (1992a) Comparison of nonadrenergic, noncholinergic, and nitric oxide-mediated relaxation of corpus cavernosum. *Int J Impotence Res*, **4**: 85-93.

CETIN A, KAYA T, DEMIRKOPRULU N, KARADAS B, DURAN B, CETIN M (2004) YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits the spontaneous contractions of isolated pregnant rat myometrium. *J Pharmacol Sci*, **94**(1):19-24

CHRIST GJ, KIM DC, TAUB HC, GONDRE CM & MELMAN A (1995) Characterization of nitroglycerine-induced relaxation in human corpus cavernosum smooth muscle: implications to erectile physiology and dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol*, **73**: 1714-1726.

COLLIER J & VALLANCE P (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci*, **10**: 427-431.

CORBIN, J.D., FRANCIS, S.H., WEBB, D.J., 2002. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* 60, 4-11.

DE GROAT W, BOOTH A. (1993) Neural control of penile erection. London: Harwood, pp. 465-513.

DEAN RC, LUE TF (2005) Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile Dysfunction. *Urol Clin North Am*. 32 (4):379 -v

ESCRIG A, GONZALEZ-MORA JL & MAS M (1999) Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J Physiol*, **516**: 261-269.

FATHIAN-SABET, B., BLOCH, W., KLOTZ, T., NIGGEMANN, S., JACOBS, G., ADDICKS, K., ENGELMANN, U., (2001). Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J. Urol*. 165, 1724-1729.

FEELISCH, M. (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 358, 113-122.

FELDMAN HA, GOLDSTEIN I, HATZICHRISTOU DG, KRANE RJ, MCKINLAY JB.( 1994) Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*.151(1):54-61.

FELDMAN HA, JOHANNES CB, DERBY CA, KLEINMAN KP, MOHR BA, ARAUJO AB, MCKINLAY JB.( 2000) Erectile dysfunction and coronary risk factors:

prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med.* Apr;30(4):328-38

FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H & STUEHR DJ (1993) Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J Med Chem*, **36**: 491-496.

FERRER M, MARIN J, ENCABO A, ALONSO MJ, BALFAGON G (1999) Role of K<sup>+</sup> channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta. *Gen Pharmacol*,33(1):35-41

FINBERG JPM, LEVY S & VARDI Y (1993) Inhibition of nerve stimulation-induced vasodilation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, **108**: 1038-1042.

FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP & KLEINERT H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*, **12**: 773-790.

FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I & KLEINERT H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, **23**: 1121-1131.

FORSTERMANN U, KLEINERT H. (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; **352**(4):351-64.

FÖRSTERMANN U; TROGISCH G & BUSSE R (1984) Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Eur J Pharmacol*, **106**: 639-643.

FRIEBE A, KOESLING D. (1998) Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.*, **53**: 123-7.

FRIEBE A, MULLERSHAUSEN F, SMOLENSKI A, WALTER U, SCHULTZ G, KOESLING D (1998) YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol*, **54**(6):962-7

FRIEBE A, SCHULTZ G, KOESLING D (1996). Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J*, **15**(24):6863-8

FUKUTO JM, CHAUDHURI G. (1995) Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; **35**:165-94.

FURCHGOTT RF & ZAWADSKI JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle to acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-376.

GANZ P. (2005) Erectile dysfunction: pathophysiologic mechanisms pointing to underlying cardiovascular disease. *Am J Cardiol*; **96**(12B):8M-12M.

HALATA Z, MUNGER BL. (1986) The neuroanatomical basis for the prostatic sensibility of the human glans penis. *Brain Res*; **371**(2):205-30.

HARTENECK C, KOESLING D, SOLING A, SCHULTZ G, BOHME E (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett*; **272** (1-2):221-3.

GARBAN H, VERNET D, FREEDMAN A, RAJFER J, GONZALEZ-CADAVID N. (1995) Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats. *Am J Physiol*. **268** H467-75.

GARTHWAITE J, BOULTON CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**:683-706.

GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L., NIELSEN, E.B., SCHMIDT, K., MAYER, B., (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive

guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48**, 184-188.

GERZER R, RADANY EW & GARBERS DL (1982) The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, **108**: 678-686.

GOCMEN C, SECILMIS A, UCAR P, KARATAS Y, ONDER S, DIKMEN A & BAYSAL F (1998) A possible role of S-nitrosothiols at the nitregeric relaxations in the mouse corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*, **361**: 85-92.

GOLDSTEIN AMB, MEEHAN JP, ZAKHARY R, BUCKLEY PA & ROGERS FA (1982) New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology*, **3**: 259-266.

GRIFFITH TM, EDWARDS DH, LEWIS MJ, NEWBY AC & HENDERSON AH (1984) The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, **308**: 645-647.

HAYASHIDA H, OKAMURA T, TOMOYOSHI T & TODA N (1996) Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. *J Urol*, **155**: 1122-1127.

HEDLUND P, LARSSON B, ALM P & ANDERSSON KE (1995) Distribution and function of nitric oxide-containing nerves in canine corpus cavernosum and spongiosum. *Acta Physiol Scand*, **155**: 445-455.

HEDLUND, P., ASZODI, A., PFEIFER, A., ALM, P., HOFMANN, F., AHMAD, M., FASSLER, R., ANDERSSON, K.E (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2349-2354.

HEINRICH U, MAURER J, KOESLING D, MANN W, FORSTERMANN U. (2000) Immuno-electron microscopic localization of the alpha (1) and beta (1)-subunits of soluble guanylyl cyclase in the guinea pig organ of corti. *Brain Res.*; **885**(1):6-13.

HELLSTROM WJG, MONGA M, WANG R, DOMER FR, KADOWITZ PJ & ROBERTS JA (1994) Penile erection in the primate: induction with nitric oxide donors. *J Urol*, **151**: 1723-1727.

HOBBS AJ (1997) Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci*, **18**: 484-491.

HOENICKA M, BECKER EM, APELER H, SIRICHOKE T, SCHRODER H, GERZER R, STASCH JP (1999) Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. *J Mol Med*, **77**(1):14-23

HOLMQUIST F, FRIDSTRAND M, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1993) Actions of 3-morpholinosydnonimin (SIN-1) on rabbit isolated penile erectile tissue. *J Urol*, **150**: 1310-1315.

HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1991a) L-N<sup>G</sup>-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. *Acta Physiol Scand*, **141**: 441-442.

HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1992) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *J Physiol*, **449**: 295-311.

HOLMQUIST F, STIEF CG, JONAS U & ANDERSSON KE (1991b) Effects of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol Scand*, **143**: 299-304.

IGNARRO LJ & MURAD F (eds), Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. (1995) *Advances in Pharmacology*, **34**:516.

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE & CHAUDHURI G (1987a) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 9265-9269.

IGNARRO LJ, BUSH PA, BUGA GM, WOOD KS, FUKUTO JM & RAJFER J (1990) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **170**: 843-850.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM & WOOD KS (1987b) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, **61**: 866-879.

IGNARRO LJ, DEGNAN JN, BARICOS WH, KADOWITZ PJ & WOLIN MS (1982) Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta*, **718**: 49-59.

IGNARRO LJ, LIPPTON H, EDWARDS JC, BARICOS WH, HYMAN AL, KADOWITZ PJ & GRUETTER CA (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, **218**: 739-749.

KATSUKI S & MURAD F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, **23**: 330-341.

KATSUKI S, ARNOLD WP & MURAD F (1977) Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res*, **3**: 239-247.

KERWIN JF JR, LANCASTER JR JR & FELDMAN PL (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem*, **38**: 4343-4362.

KIM N, AZADZOI KM, GOLSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1991) A nitric oxide-like factor mediates neurogenic relaxation of penile smooth muscle. *J Clin Invest*, **88**: 112-118.

- KIM N, VARDI Y, PADMA-NATHAN H, DALEY J, GOLSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1993) Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. *J Clin Invest*, **91**: 437-442.
- KIRKEBY HJ, SVANE D, POULSEN J, TOTTRUP A, FORMAN A & ANDERSSON KE (1993) Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. *Acta Physiol Scand*, **149**: 385-392.
- KNISPEL HH, GOESSL C, BECKMANN R. (1991) Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. *J Urol*. **146**(5):1429-33.
- KNISPEL HH, GOESSL C, BECKMANN R. (1992) Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation. *Urology*.;**40**(5):471-6.
- KNOWLES RG & MONCADA S (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J*, **298**: 249-258.
- KO FN, WU CC, KUO SC, LEE FY, TENG CM.(1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* **84**: 4226-4233.
- KOSARIKOV, D.N., LEE, J.M., UVERSKY, V.N., COUNTS-GERBER, N., 2001. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. *J. Inorg. Biochem.* 87, 267-276.
- KRANE RJ, GOLDSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1989) Impotence. *N Engl J Med*, **321**: 1648-1659.
- LEONE AM, WIKLUND NP, HOKFELT T, BRUNDIN L & MONCADA S (1994) Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport*, **5**: 733-736.

- LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP, WALDMAN SA. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**: 375-414.
- LUE TF, TAKAMURA T, SCHMIDT RA, PALUBINSKAS AJ & TANAGHO EA (1983) Hemodynamics of erection in the monkey. *J Urol*, **130**: 1237-1241.
- LUE TH & TANAGHO EA (1987) Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J Urol*, **137**: 829-836.
- LUE TH & TANAGHO EA (1988) Functional anatomy and mechanism of penile erection. In: *Contemporary management of impotence and infertility*, edited by E. A. Tanagho, T. H. Lue and R. D. McClure. Baltimore, Williams & Wilkins, 39-50.
- MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD & WISHNOK JS (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**: 8706-8711.
- MARLETTA MA. (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.*; **268**(17):12231-4.
- MARTIN E, LEE YC, MURAD F.(2001) YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12938-12942.
- MATSUOKA A, STUEHR DJ, OLSON JS, CLARK P & IKEDA-SAITO M (1994) L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **269**: 20335-20339.
- MAYER B & ANDREW P (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **358**: 127-133.

MIZUSAWA H, HEDLUND P, BRIONI JD, SULLIVAN JP, ANDERSSON KE.(2002) Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. *J Urol* **167**: 2276-2281.

MIZUSAWA H, HEDLUND P, HAKANSSON A, ALM P & ANDERSSON KE (2001) Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, **132**: 1333-1341.

MONCADA S, PALMER RMJ & HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **43**: 109-142.

MULSCH A, BAUERSACHS J, SCHAFFER A, STASCH JP, KAST R, BUSSE R. (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 681-689.

NAKANE M, HSIEH G, MILLER LN, CHANG R, TERRANOVA MA, MORELAND RB, KOLASA T, BRIONI JD (2002) Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: synergism of nitric oxide and YC-1. *Int J Impot Res*,14(2):121-7

OHLSTEIN EH, WOOD KS & IGNARRO LJ (1982) Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys*, **218**: 187-198.

PALMER RMJ & MONCADA S (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **158**: 348-352.

PALMER RMJ, FERRIGE AG & MONCADA S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.

PICKARD RS, POWELL PH, ZAR MA. (1991) 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**(3):755-9.

PLANE F, PEARSON T, GARLAND CJ ( 1995) Multiple pathways underlying endothelium-dependent relaxation in the rabbit isolated femoral artery. *Br J Pharmacol*;115(1):31-8

PRIVIERO FB, BARACAT JS, TEIXEIRA CE, CLAUDINO MA, DE NUCCI G, ANTUNES E. (2005) Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*; **32**(9):728-34.

RAND MJ & LI CG (1995a) Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu Rev Physiol*, **57**: 659-682

RAND MJ (1992) Nitrgenic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **19**: 147-169.

RAPOPORT RM & MURAD F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat toracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, **52**: 352-357.

RECIO P, LOPEZ PG, HERNANDEZ M, PRIETO D, CONTRERAS J & GARCIA-SACRISTAN A (1998) Nitrgenic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of cGMP. *Eur J Pharmacol*, **351**: 85-94.

RUSSWURM M, BEHREND S, HARTENECK C & KOESLING D (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J*, **335**: 125-130.

SAENZ DE TEJADA I, ANGULO J, CELLEK S, GONZALEZ-CADAVID N, HEATON J, PICKARD R, SIMONSEN U. (2004 ) Physiology of erectile function. *J Sex Med.*;1(3):254-65.

SAENZ DE TEJADA I, GOLSTEIN I, BLANCO R, COHEN RA & KRANE RJ (1985) Smooth muscle of the corpora cavernosae: role in penile erection. *Surg Forum*, **36**: 623-624.

SAENZ DE TEJADA I, MOROUKIAN P, TESSIER J, KIM JJ, GOLDSTEIN I & FROHRIB D (1991) Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am J Physiol*, **260**: H1590-H1595.

SATTAR AA, SALPIGIDES G, VANDERHAEGHEN JJ, SCHULMAN CC, WESPES E. (1995) Cavernous oxygen tension and smooth muscle fibers: relation and function. *J Urol.*; **154**(5):1736-9.

SATTAR AA, WESPES E & SCHULMAN CC (1994) Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur Urol*, **25**: 142-144.

SCHMIDT HHHW, NAU H, WITTFHOHT W, GERLACH J, PRESCHER KE, KLEIN MM, NIROOMAND F & BÖHME E (1988) Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, **154**: 213-216.

SCHULZ S, YUEN OS & GARBERS DL (1991) The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci*, **12**: 116-120.

SEFTEL AD, VIOLA KA, KASNER SE, GANZ MB (1996) Nitric oxide relaxes rabbit corpus cavernosum smooth muscle via a potassium-conductive pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 219(2):382-7

SHIRAI M, ISHII N, MITSUKAWA S, MATSUDA S & NAKAMURA M (1978) Hemodynamic mechanism of erection in the human penis. *Arch Androl*, **1**: 345-349.

SIMONSEN U, PRIETO D, SANEZ DE TEJADA I & GARCIA-SACRISTAN A (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+)-channels. *Br J Pharmacol*, **116**: 2582-2590.

SPARWASSER, C., DRESCHER, P., WILL, J.A., MADSEN, P.O., 1994. Smooth muscle tone regulation in rabbit cavernosal and spongiosal tissue by cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent mechanisms. *J. Urol.* 152, 2159-2163.

STASCH JP, ALONSO-ALIJA C, APELER H, DEMBOWSKY K, FEURER A, MINUTH T, PERZBORN E, SCHRAMM M, STRAUB A. (2002a) Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol*, **135**: 333-343.

STASCH JP, BECKER EM, ALONSO-ALIJA C, APELER H, DEMBOWSKY K, FEURER A, GERZER R, MINUTH T, PERZBORN E, PLEISS U, SCHRODER H, SCHROEDER W, STAHL E, STEINKE W, STRAUB A, SCHRAMM M. (2001) NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, **410**: 212-215.

STASCH JP, DEMBOWSKY K, PERZBORN E, STAHL E, SCHRAMM M. (2002b) Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. *Br J Pharmacol*, **135**: 344-355.

STIEF CG, SAUERWEIN D, THON WF, ALLHOFF EP & JONAS U (1992a) The influence of anterior root stimulation (S2) in deafferented spinal cord injury men on cavernous electrical activity. *J Urol*, 148: 107-110

STONE JR, MARLETTA MA.(1998) Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbonmonoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide *Chem Biol* 5: 255-261.

STRAUB A, BENET-BUCKHOLZ J, FRODE R, KERN A, KOHLSDORFER C, SCHMITT P, SCHWARZ T, SIEFERT HM, STASCH JP. (2002) Metabolites of

orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem.*; **10**(6):1711-7.

TEIXEIRA CE, MORENO RA, FERREIRA U, RODRIGUES NETTO N JR, FREGONESI A, ANTUNES E & DE NUCCI G (1998a) Pharmacological characterization of kinin-induced relaxation of human corpus cavernosum. *Br J Urol*, **81**: 432-436.

TEIXEIRA CE, PRIVIERO FB, CLAUDINO MA, BARACAT JS, DE NUCCI G, WEBB RC, ANTUNES E. (2006) Stimulation of soluble guanylyl cyclase by BAY 41-2272 relaxes anococcygeus muscle: interaction with nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. **530**(1-2):157-65.

TEUNISSEN, C., STEINBUSCH, H., MARKERINK-VAN ITTERSUM, M., KOESLING, D., DE VENTE, J., 2001. Presence of soluble and particulate guanylyl cyclase in the same hippocampal astrocytes. *Brain Res*. 891, 206-212.

TRAISH AM, KIM NN, GOLDSTEIN I & MORELAND RB (1999) Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J Androl*, **20**: 671-682.

TRAYLOR TG & SHARMA VS (1992) Why NO? *Biochemistry*, **31**: 2847-2849.

TRIGO-ROCHA F, ARONSON WJ, HOHENFELLNER M, IGNARRO LJ, RAJFER J & LUE TF (1993a) Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol*, **1264**: H419-H422.

WALDMAN SA & MURAD F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev*, **39**: 163-196.

WALSH PC, BRENDLER CB, CHANG T, MARSHALL FF, MOSTWIN JI, STUTZMAN R, SCHLEGEL PN. (1990) Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. *Md Med J.*; **39**(4):389-93.

WEDEL B, HUMBERT P, HARTENECK C, FOERSTER J, MALKEWITZ J, BOHME E, SCHULTZ G & KOESLING D (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 2592-2596.

WEGENER JW, GATH I, FORSTERMANN U, NAWRATH H (1997) Activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 in aortic smooth muscle but not in ventricular myocardium from rat. *Br J Pharmacol*, **122**(7):1523-9

WOHLFART P, MALINSKI T, RUETTEN H, SCHINDLER U, LINZ W, SCHOENAFINGER K, STROBEL H, WIEMER G. (1999) Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*, **128**: 1316-1322.

WU CC, KO FN, KUO SC, LEE FY, TENG CM.(1995) YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* **116**: 1973-1978.

ZABEL U, WEEGER M, LA M, SCHMIDT HH. (1998) Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem J.*; **335**:51-7.

ZABEL, U., KLEINSCHNITZ, C., OH, P., NEDVETSKY, P., SMOLENSKI, A., MULLER, H., KRONICH, P., KUGLER, P., WALTER, U., SCHNITZER, J.E., SCHMIDT, H.H., 2002. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* **4**, 307-311.

ZHAO,Y., BRANDISH, P.E., DIVALENTIN, M., SCHELVIS, J.P., BABCOCK, G.T., MARLETTA, M.A., 2000. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* **39**, 10848-10854.