



**Wagner Mendes Faria**

**Caracterização farmacológica do ativador da  
guanilato ciclase solúvel, BAY 60-2770, em  
artéria pulmonar isolada de coelho**

**CAMPINAS**

**2013**





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**Wagner Mendes Faria**

**Caracterização farmacológica do ativador da  
guanilato ciclase solúvel, BAY 60-2770, em  
artéria pulmonar isolada de coelho**

***ORIENTAÇÃO:***

***Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiola Taufic Monica Iglesias***

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ESTE EXEMPLA CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR WAGNER MENDES FARIA, E ORIENTADO PELA PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

---

***Assinatura do Orientador***

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F225c Faria, Wagner Mendes, 1972-  
Caracterização farmacológica do ativador da guanilato ciclase solúvel, BAY 60-2770, em artéria pulmonar isolada de coelho / Wagner Mendes Faria. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Fabíola Taufic Monica Iglesias.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Guanilato ciclase - Farmacologia. 2. BAY 60-2770. 3. Proteínas ativadoras de guanilato ciclase. 4. Hipertensão pulmonar. 5. Artéria pulmonar. I. Iglesias, Fabíola Taufic Monica. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pharmacological characterization of the soluble guanylate cyclase activator, BAY 60-2770, in isolated rabbit pulmonary artery

**Palavras-chave em inglês:**

Guanylate ciclase, Pharmacology

BAY 60-2770

Guanylate cyclase-activating proteins

Hypertension, Pulmonary

Pulmonary artery

**Área de concentração:** Farmacologia

**Titulação:** Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora:**

Fabíola Taufic Monica Iglesias [Orientador]

Heitor Moreno Junior

Maria Andreia Delbin

**Data de defesa:** 27-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Farmacologia

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**WAGNER MENDES FARIA**

---

**ORIENTADORA: PROF. DR. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS**

---

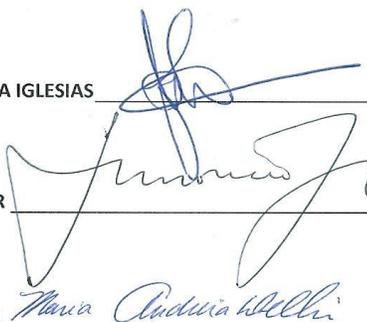
**MEMBROS:**

---

1. PROF. DR. FABIOLA TAUFIC MONICA IGLESIAS

2. PROF. DR. HEITOR MORENO JUNIOR

3. PROF. DR. MARIA ANDREIA DELBIN



The image shows three handwritten signatures in blue ink. The first signature is for Prof. Dr. Fabiola Taufic Monica Iglesias, the second is for Prof. Dr. Heitor Moreno Junior, and the third is for Prof. Dr. Maria Andreia Delbin. The signatures are written over horizontal lines.

---

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

---

**Data: 27 de agosto de 2013**

---

*DEDICATÓRIA*

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Iracy Faria e Telma Faria, que sempre me incentivaram  
e rezaram para que Deus estivesse sempre me acompanhando nas viagens semanais.*

*Ao amor da minha vida, minha esposa,  
Renata Faria, a qual foi chave fundamental neste processo de aperfeiçoamento. Durante dois  
anos e meio me apoiou em todos os momentos, principalmente naqueles em que o cansaço e o  
desanimo assumem o comando e somente uma pessoa iluminada e comprometida poderia ajudar.*

*As minhas pequenas, Maria Clara e Gabriela, que ficavam todo final da semana me esperando  
chegar de viagem até altas horas para me dar um beijo e dizer: “estávamos com saudade, te  
amamos papai...!”*

*Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, Warlei, Tereza, Mateus e Caio Faria, Weber Faria e  
Marcia Alves, Gustavo Leste e Marcia Leste,  
que a cada encontro, a alegria e companhia de vocês  
me faz imensamente feliz.  
Vocês são os meus melhores amigos que a vida me deu...*

*Ao meu sogro e a minha incansável sogra, na qual admiro sua disposição, sou grato pela sua  
preciosa ajuda no dia a dia, agradeço de coração todo apoio e incentivo dado em todo este  
período.*

*A minha ex-chefe, Prof<sup>a</sup> Elizebeth Guedes e ao amigo Prof. Dr. Marcovan Porto, pelo apoio e  
encorajamento dado para que eu pudesse dar início e me dedicasse a este projeto.*

*Finalmente, aos dois anjos que Deus colocou em meu caminho. Minha professora, orientadora e  
amiga Dra. Fabíola Monica e o meu grande amigo  
Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso, que foram incansáveis, me apoiando em todos os momentos.  
Nunca mediram esforço para me ajudar a completar esta fase tão difícil e tão importante.  
MUITO OBRIGADO. Vocês são a melhor prova que Deus existe...*

## *AGRADECIMENTOS*

*A minha orientadora,  
Dra. Fabíola Monica,  
agradeço imensamente pela oportunidade, confiança e ajuda despendida durante a orientação.*

*Ao amigo,  
Lorenzo Pissinatti,  
meu agradecimento, pela recepção dada logo na chegada à Campinas, a sua disponibilidade e atenção prestada durante todo o tempo em que estive nesta Cidade, que tão bem me acolheu...*

*Agradeço também,  
a minha amiga, Renata Lopes, que me ajudou muito com suas explicações em alguns temas aos quais apresentava maior dificuldade. Muito obrigado!*

*Aos amigos da cascata, Paulo Gonzalez, Celso Saragossa Filho e Fabiano Calmasini com seus questionamentos extremamente construtivos e ajuda no dia a dia. Ao companheiro de madrugada, Rafael de Moraes Campos que permanecia até a madrugada me apoiando na realização dos experimentos. Aos amigos Fernando Ricardo Báu, Camila Estancial, Eduardo Costa, Tuany Cândido, Fabio Henrique, Luis Osório, Marcy Lancia Pereira, Fernanda Del Grossi, Rodrigo Capel, pela amizade, companhia, conselhos e alegria compartilhada ao longo deste período.*

*Aos amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elen Cristina Landucci, Lineu Baldissera, Gláucia Mello, Maria Elisa, Rafael Prada, Nádia, Marina Calixto, Letícia Lintomen, Dalize Squebola, Priscila Monteiro, Camila Bitencourt Silvério, Raquel Lorenzetti, Lourdes Dias agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.*

*Aos Professores do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Prof. Dr. Gilberto De Nucci, Prof. Dr. Edson Antunes, Profa. Dra. Sisi Marcondes, Dr. Stephen Hyslop, Dr. Gabriel Forato Anhô, Dr. André Schenka e Dr. Heitor Moreno Junior pela atenção dispensada durante o cumprimento dos créditos.*

*Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Elaine, Rosicler, Gildo, Agnaldo, Antonio, Adilson, Sr. Miguel Borges da Silva e Denise pelo competente trabalho que realizam no apoio aos alunos deste laboratório.*

*Agradeço à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado Acadêmico.*

## **RESUMO**

Duas classes de medicamentos denominadas estimuladores e ativadores da guanilato ciclase solúvel (GCs) foram desenvolvidas para uso terapêutico em situações patológicas onde há menor formação ou biodisponibilidade NO ou tolerância farmacológica. A GCs é uma enzima heterodímera, composta pelas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), nas quais há a presença do grupo prostético heme e que catalisa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) pela ação do NO. Em situações patológicas o átomo de ferro pode encontrar-se na sua forma oxidada ( $Fe^{3+}$ ), diminuindo assim a resposta máxima do óxido nítrico (NO). A principal diferença entre os moduladores da GCs é que os ativadores (BAY 58-2667, HMR 1766, BAY 60-2770) atuam de maneira mais eficaz mesmo quando a enzima encontra-se no estado oxidado. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar funcionalmente o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 em artéria pulmonar isolada de coelho. O BAY 60-2770 (0,0001-100  $\eta$ M) relaxou de maneira potente ( $10,1 \pm 0.04$ ) e eficaz ( $105 \pm 0,9 \%$ ) a artéria pulmonar, sendo este efeito significativamente potencializado na presença dos inibidores da GCs (ODQ, 10  $\mu$ M, 4,9 vezes), da fosfodiesterase tipo 5 (tadalafil, 100  $\eta$ M, 5,6 vezes) ou da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100  $\mu$ M, 3,0 vezes). A presença do sequestrador de NO, do doador de NO, da indometacina, do bloqueador do canal de potássio ou a remoção endotelial não interferiram no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770. A fenilefrina (0,00001-3 mM) e a estimulação elétrica (4-16 Hz) produziram contração dependente da concentração e frequência, respectivamente. Na presença de tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu$ M) e fentolamina (1  $\mu$ M) houve abolição da resposta contrátil a estimulação elétrica, mostrando a liberação neurogênica de catecolamina. Na presença de BAY 60-2770 co-incubado com ODQ uma redução significativa na contração induzida pela estimulação elétrica foi

observada. Apesar desta mesma redução ter sido observada na presença do L-NAME, a mesma não foi estatisticamente significativa em comparação aos anéis incubados somente com BAY 60-2770 (1  $\eta$ M). Nossos resultados mostraram que a oxidação do grupamento heme, a inibição da fosfodiesterase e a ausência do NO favoreceram a resposta relaxante do BAY 60-2770.

## **ABSTRACT**

Soluble guanylate cyclase (sGC) stimulators and activators have been developed for use in pathophysiological condition when NO formation or bioavailability are impaired or when NO tolerance gas developed. Soluble guanylate cyclase is a heterodimer enzyme composed by alpha ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ) subunits and a prostetic heme group. Soluble guanylate cyclase converts guanosine triphosphate (GTP) into cyclic guanosine monophosphate (GMPc) after nitric oxide (NO) activaton. Under pathophysiological conditions heme can be oxidized ( $\text{Fe}^{3+}$ ), thus reduzing NO efficacy. The main difference between stimulators and activators (BAY 58-2667, BAY 60-2770 and HMR 1766) is that the latter class of drugs is more efficacious when heme is oxidized. The aim of the present study is to characterize the relaxation induced by BAY 60-2770 in isolated pulmonary artery from rabbit. BAY 60-2770 (0.0001-100  $\eta\text{M}$ ) produced concentration dependent relaxation with potency and maxima response values of  $10,1 \pm 0.04$  and  $105 \pm 0.9\%$ , respectively. The inhibition of sGC (ODQ, 10  $\mu\text{M}$ ) or phosphodiesterase type 5 (tadalafil, 100  $\eta\text{M}$ ) or the nitric oxide synthase (L-NAME, 100  $\mu\text{M}$ ) produced significantly leftward shifts by, approximately, 4.9, 5.4 and 3.0, respectively. The NO-scavenger, the NO-donor, the cyclooxygenase inhibition, the potassium channel blocker or endothelial removal did not interfere on the pharmacological parameters of BAY 60-2770. Phenylephrine (PE, 0.0001- 3 mM) and electrical field stimulation (EFS, 4-16 Hz) induced concentration and frequency dependent-contraction, respectively. Phentolamine (1  $\mu\text{M}$ ) and tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu\text{M}$ ) practically abolished EFS-induced contraction, showing the neurogenic source of catecholamines. Co-treatment with BAY 60-2770 with ODQ reduced significantly the EFS-induced contraction in comparison with BAY 60-2770 (1  $\eta\text{M}$ ) alone. Although we have observed a tendency of reduction in the amplitude of contraction when BAY 60-2770 was co-incubated with L-NAME, it was not statistically

significant. Therefore, our results showed that the oxidation of heme group, the inhibition of phosphodiesterase and lower levels of NO favoured the relaxing response of BAY 60-2770 in isolated rabbit pulmonary artery.

## **LISTA DE DROGAS**

**SUBSTÂNCIA****PROCEDÊNCIA**

Cloreto de sódio (NaCl)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, Alemanha)
D-Glucose	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cloreto de potássio (KCl)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Fostato de Potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Sulfato de Magnésio (MgSO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cloreto de Hidrogénio (HCl)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
ODQ (H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Tadalafil	Biolab (São Paulo, Brasil)
Indometacina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Glibenclamida	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Hidroxibolamina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Nitroprussiato de Sódio	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Fenilefrina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Acetilcolina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Tetrodotoxina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
Fentolamina	Sigma (St. Louis, LO, EUA)
BAY 60-2770	Bayer (Leverkusen, Alemanha)
Ketamina	Ceva (São Paulo, Brasil)

Isoflurano

Cristália (São Paulo, Brasil)

## **LISTA DE ABREVIACES**

ACh: acetilcolina

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: análise de variância

ADP: adenosina difosfato

ATP: adenosina trifosfato

BK: bradicinina

BAY41-2272: 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-i]-pirimidin-4-lamina.

BAY 60-2770: Ácido 4-((4-Carboxybutyl)[2-(5-fluoro-2-[[4'-(trifluoromethyl)biphenyl-4-yl]methoxy}phenyl)ethyl]amino)methyl) [benzoico]

BAY 58-2667: (4-[[4-carboxybutyl]{2-[(4-phenethylbenzyl)oxy] phenethyl}amino)methyl[benzoic]acid)

BAY41-8543: 2-[1-[(2-fluorophenyl)methyl]-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-5-(4-morpholinyl)-4,6-pyrimidinediamine

BAY 63- 2521: (methyl 4,6-diamino-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-5-ylmethylcarbamate)

HMR-1766: 5-chloro-2-(5-chloro-thiophene-2-sulfonylamino-N-(4-(morpholine-4-sulfonyl)-phenyl)-benzamide sodium salt

YC-1: 3-(59-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole)

CO: Monóxido de carbono

ChAT: colina acetil transferase

DEA: dietilamina

DE: disfunção endotelial

E.P.M.: erro padrão da média

EFS: estimulação elétrica de campo

$E_{max}$ : resposta máxima

eNOS: sintase de óxido nítrico endothelial

$Fe^{2+}$  : ferro na forma reduzida

$Fe^{3+}$  : ferro na forma oxidada

GCs: guanilato ciclase solúvel

GTP: guanosina monofosfato cíclico

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

HIS 105: histidina 105

H-NOX: heme-óxido nítrico oxigênio

H<sub>2</sub>S: sulfeto de hidrogênio

Hz: hertz (símbolo) é a unidade de frequência

$K_{Ca^{2+}}$ : canais de potássio ativados por calico

$K_v$ : canais de potássio ativados por voltagem

$K_{ATP}$ : canais de potássio ativados por ATP

$K_{ir}$ : corrente de potássio retificadora tardia

L-Arg: L-arginina

LDL: lipoproteína de baixa densidade

L-NAME: N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster

mim: minuto

mmHg: milímetros de mercúrio

mm: milímetros

g: grama

Kg: quilograma

mg: miligrama

µg: micrograma

M: molar

mN: milinewton

NOS: sintase de óxido nítrico

NO: óxido nítrico

ODQ: H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

PAM: pressão arterial média

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

pEC<sub>50</sub>: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

PGI<sub>2</sub>: prostaciclina

SNP: nitroprussiato de sódio

TH: tirosina hidroxilase

TTX: tetrodotoxina

TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>

V: volt – unidade de medida

α : Alfa

β: Beta

µM: micromolar

nM: nanomolar

mM: milimolar

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Valores de potencia (pEC <sub>50</sub> ) e resposta máxima (E <sub>max</sub> ) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença do ODQ, tadalafil e L-NAME.	40
<b>Tabela 2</b>	Valores de potência (pEC <sub>50</sub> ) e resposta máxima (E <sub>max</sub> ) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença da hidroxicoalamina, nitroprussitato de sódio ou remoção endotélio.	42
<b>Tabela 3</b>	Valores de potência (pEC <sub>50</sub> ) e resposta máxima (E <sub>max</sub> ) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença de indometacina ou glibenclamida.	45
<b>Tabela 4</b>	Valores de potência (pEC <sub>50</sub> ) e resposta máxima (E <sub>max</sub> ) da contração induzida pela fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 1 $\eta$ M, BAY 1 $\eta$ M+ODQ e ODQ.	46
<b>Tabela 5</b>	Valores de potência (pEC <sub>50</sub> ) e resposta máxima (E <sub>max</sub> ) da contração induzida pela fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 1 $\eta$ M, BAY 1 $\eta$ M + L-NAME e L-NAME.	49

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Ilustração representativa Subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) da enzima guanilato ciclase solúvel.	29
<b>Figura 2.</b>	Ativação da guanilato ciclase solúvel pelo monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO).	30
<b>Figura 3a.</b>	Conformação do grupamento heme.	33
<b>Figura 3b.</b>	Conformação do ativador da guanilato ciclase solúvel BAY 58-2667.	33
<b>Figura 3A.</b>	Estrutura química do cinaciguat (Cin, BAY 58-2667).	33
<b>Figura 3B.</b>	Estrutura química do grupamento heme e ação do cinaciguat quando o grupamento heme encontra-se ausente.	33
<b>Figura 3C.</b>	Ação do cinaciguat quando o ferro encontra-se no estado oxidado ( $Fe^{3+}$ ).	33
<b>Figura 4.</b>	Estrutura química do BAY 60-2770.	34
<b>Figura 5.</b>	Relaxamento induzido pelo ativador da GCs, BAY 60-2770 na ausência (E+) e na presença dos inibidores da GCs, ODQ, da fosfodiesterase tipo 5, da sintase de óxido nítrico.	41
<b>Figura 6.</b>	Relaxamento induzido pelo ativador da GCs, BAY 60-2770 ausência (E+) e na presença do sequestrador de NO, do doador de NO, nitroprussiato de sódio ou da remoção endotelial.	43
<b>Figura 7.</b>	Relaxamento induzido pelo BAY 60-2770, na presença do inibidor da ciclooxygenase, indometacina.	44

<b>Figura 8.</b>	Relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na presença do inibidor dos canais de potássio ativados pelo ATP.	44
<b>Figura 9.</b>	Curva concentração resposta a fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + ODQ (10 μM) e ODQ (10 μM).	46
<b>Figura 10.</b>	Estimulação elétrica com adição prévia de fentolamina e tetrodotoxina.	47
<b>Figura 11</b>	Curva frequência resposta na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + ODQ (10 μM) e ODQ (10 μM).	48
<b>Figura 12.</b>	Curva concentração resposta a fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + L-NAME (10 μM) e L-NAME (10 μM).	49
<b>Figura 13.</b>	Curva frequência resposta na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + L-NAME (10 μM) e L-NAME (10 μM).	50

## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT .....	xiii
LISTA DE DROGAS .....	xvi
LISTA DE ABREVIACOES .....	xix
LISTA DE TABELAS .....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
1.1. Regulação do tnus vascular .....	31
1.2. Guanilato ciclavel solúvel (GCs).....	32
1.3. Moduladores da guanilato ciclavel solúvel: estimuladores e ativadores ..	34
JUSTIFICATIVA .....	39
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
Objetivos gerais.....	40
Objetivos específicos .....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Animais de experimentação .....	41
3.2. Preparação de artéria pulmonar .....	41
3.3. Protocolos funcionais de relaxamento.....	42
3.4. Protocolo de contração.....	42
3.5. Análise de resultados .....	43
3.6. Análise estatística.....	43
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
4.1. Efeito dos inibidores da via NO/GCs/PDE5 no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 .....	44
4.2. Efeito da remoção do endotélio e do sequestrador e doador de NO no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 .....	46

4.3. Efeito da inibição da ciclooxigenase ou do bloqueador do canal de potássio no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 .....	48
4.4. Efeito do BAY 60-2770 na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista alfa-1 adrenérgico na presença e ausência do inibidor da guanilato ciclase solúvel .....	50
4.5. Efeito do BAY 60-2770 na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista adrenérgico na presença e ausência de NO.....	53
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>6. SUMÁRIO .....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Regulação do tônus vascular**

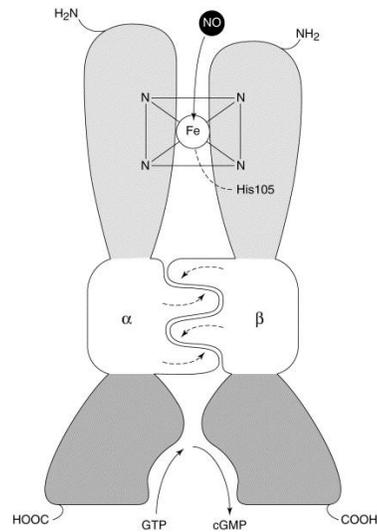
O tônus vascular é o resultado do equilíbrio entre a liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, as quais são oriundas, principalmente, de estruturas neurais, endoteliais e do metabolismo. Os principais agentes que levam a contração da musculatura lisa vascular são as catecolaminas, tromboxano A<sub>2</sub>, histamina, serotonina, endotelina-1, angiotensina II e adenosina difosfato (ADP). Dentre os agentes relaxantes incluem a bradicinina (BK), substância P, acetilcolina (ACh), óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), adenosina trifosfato (ATP), ADP, histamina (Vanhoutte et al., 2009; Feletou et al., 2011) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (Mani et al., 2013). De uma maneira geral, as substâncias que levam ao relaxamento da musculatura lisa atuam, principalmente, aumentando os níveis intracelulares dos segundos mensageiros adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Cogolludo et. al.; Kummer al., 2007), guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Somlyo & Somlyo, 2003) ou pela ativação direta dos diferentes tipos de canais de potássio presentes na membrana, como ativados por cálcio, pelo ATP ou os dependentes de voltagem, levando assim a menores concentrações de íons cálcio no meio intracelular.

O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina sob a ação das enzimas sintase de óxido nítrico (NOS, sigla em inglês). Na circulação pulmonar, o NO é oriundo, principalmente, da ação da NOS endotelial, a qual está expressa no endotélio. Animais knockout para a eNOS apresentaram discreto aumento da pressão arterial pulmonar, porém, quando os mesmos foram submetidos a condições de hipóxia o aumento da pressão pulmonar foi notadamente maior do que nos animais controle

(Fagan et al., 1999; Wu et al., 2004; Han & Stewart, 2006), sugerindo que o NO contrabalancearia a resposta vasoconstritora associada à hipóxia. Fisiologicamente o NO leva a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, da adesão/infiltração de leucócitos e da proliferação da musculatura lisa vascular (Davignon & Ganz, 2004)

## **1.2 Guanilato ciclase solúvel (GCs)**

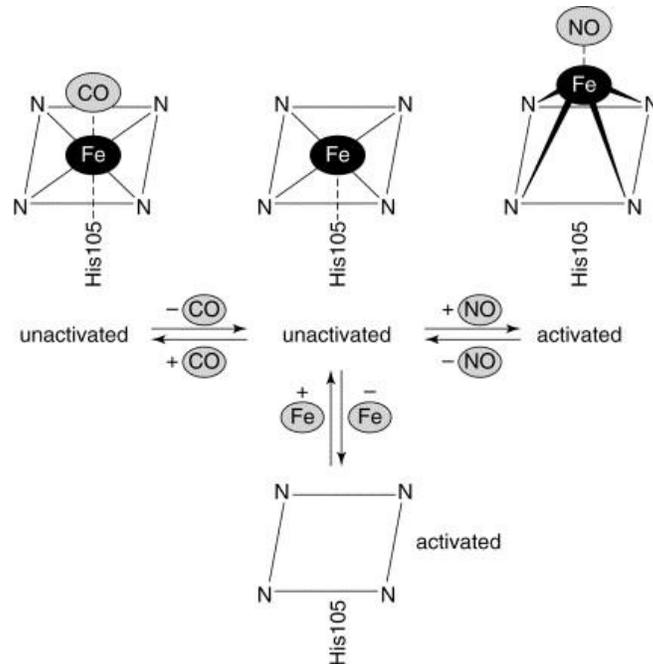
A guanilato ciclase solúvel (GCs) está expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeia várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso vascular e não vascular, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Denninger & Marletta, 1999). A GCs é um heterodímero composto de subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), sendo que cada subunidade contém um domínio regulatório e catalítico. A porção N-terminal da subunidade  $\beta$  contém o domínio de ligação do heme-óxido nítrico oxigênio (H-NOX, sigla em inglês), enquanto que o domínio C-terminal de ambas subunidades possui o domínio catalítico, levando a conversão da guanosina trifosfato (GTP) a GMPc (Harteneck et al., 1991; Yu et al., 1996; Gupta et al., 1996; Denninger & Marletta, 1999). Experimentos utilizando a GCs isolada e purificada (Ballou et al., 2002) mostraram que o NO ativa a GCs em baixas concentrações 80-250 nM, sendo este efeito rapidamente finalizado quando o NO se desliga da enzima (Schrammel et al., 1996; Stone & Marletta, 1996) (Figura 1).



**Figura 1. Desenho esquemático mostrando as subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) da enzima guanilato ciclase solúvel. O grupo prostético heme está ligado pelo resíduo de histidina na posição 105 na região “N terminal da subunidade beta. A porção C-terminal de ambas subunidades forma o domínio catalítico responsável pelo conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). (Hobbs, 1997)**

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da GCs pelo NO (Craven et al., 1978; Gerzer et al., 1981; Ignarro 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  $\text{Fe}^{2+}$  (forma reduzida) ou  $\text{Fe}^{3+}$  (forma oxidada). O quinto membro do anel na GCs é um ligante axial imidazólico na posição histidina105 (His105) (Gerzer et al., 1981; Zhao et al., 2000). A mutação deste aminoácido, localizado próximo a região N-terminal da subunidade  $\beta_1$  torna a enzima insensível ao NO (Zhao et al., 1998; Karow et al., 2005). O NO se liga a GCs por um processo de difusão, formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o

ferro criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a GCs (Stone & Marletta, 1995; Hobbs 1997) (Figura 2).



**Figura 2. Ativação da guanilato ciclase solúvel pelo monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO).** A ligação do NO com a GCs resulta na formação de um complexo ferrosnitrosil penta-coordenado, quebrando a ligação axial da histidina e ativando a enzima. A ligação do CO resulta em uma ligação hexa-coordenada, sem quebra da ligação axial e, portanto, com menor ativação da GCs. (Hobbs, 1997)

### 1.3 Moduladores da guanilato ciclase solúvel: estimuladores e ativadores

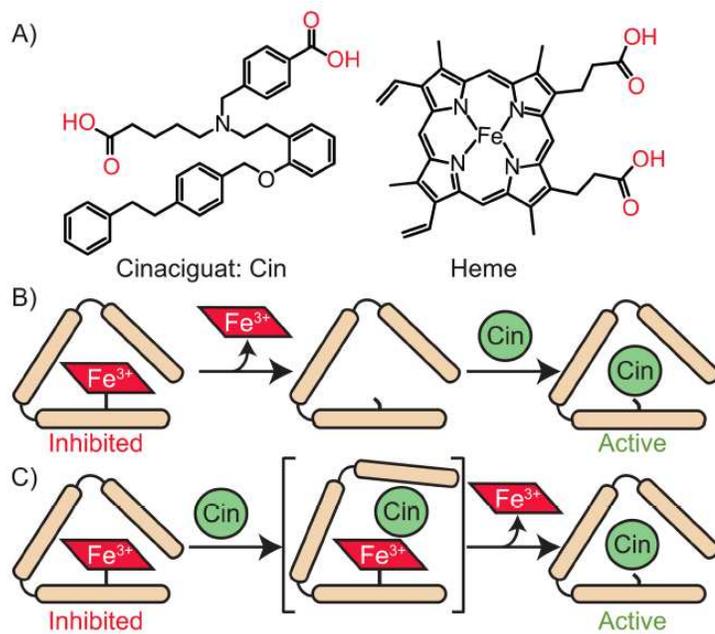
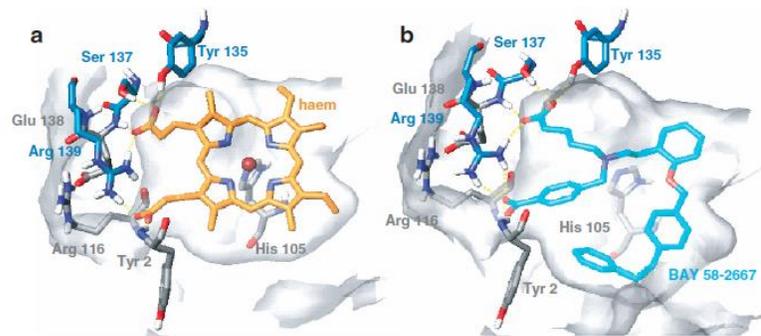
A disfunção endotelial (DE), que contribui para a formação da placa de ateroma, está presente em diversas situações patológicas como diabetes, hipertensão arterial e pulmonar, obesidade, insuficiência cardíaca, disfunção erétil, dentre outras. Diversos fatores contribuem para a DE, como 1) desacoplamento da enzima NOS, 2) formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, diminuindo assim a biodisponibilidade de NO e levando à nitração, nitrosilação e oxidação de proteínas, 3) oxidação ou

degradação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da GCs, 4) maior biodisponibilidade de agentes vasoconstritores, como endotelina-1 e angiotensina-II, 5) oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) contribuindo para a formação das células espumosas, 6) maior expressão de moléculas de adesão e 7) aumento da atividade plaquetária (Behrendt et al., 2002; Davignon & Ganz, 2004), dentre outros.

Até o presente momento, duas classes de medicamentos que modulam a GCs estão em estudo clínico para o tratamento da hipertensão pulmonar. Estas classes denominam-se estimuladores e ativadores e, diferentemente dos nitrovasodilatadores, estas substâncias não causam tolerância farmacológica. Em relação à primeira classe, existem o YC-1, BAY 41-2272, BAY 41-8543 e BAY 63-2521 (riociguat). O YC-1 é o precursor desta classe, porém menos potente e seletivo em relação ao BAY 41-2272 (Stasch et al., 2001), BAY 41-8543 (Stasch et al., 2002 a,b) e BAY 63-2521 (Schermuly et al., 2008). Além disso, diferentemente do YC-1, as outras moléculas são desprovidas de atividade inibitória sobre a fosfodiesterase tipo-5. Estudos funcionais *in vitro* (Priviero et al., 2005; Teixeira et al., 2006 a,b) mostraram que a ausência de NO reduz significativamente a potência e eficácia dos estimuladores.

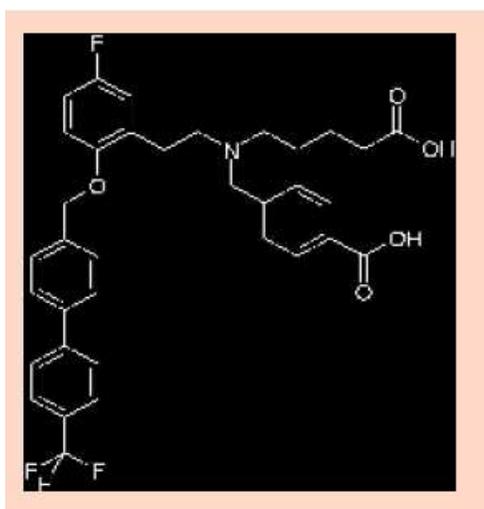
Em situações patológicas onde há DE tem-se mostrado que o ferro do grupamento heme encontra-se oxidado ou mesmo ausente, o que favoreceria a degradação proteossômica das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Meurer et al., 2009). O grupamento heme é importante não somente para a ação do NO, como também para manter as subunidades unidas. Assim, tanto a oxidação do ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) como a ausência do heme diminuem a eficácia do NO (Hoffman et al., 2011; Sumerli & Marletta, 2012). Diferentemente dos estimuladores da GCs, os ativadores, BAY 58-2667 (cinaciguat), HMR 1766 (ataciguat) e BAY 60-2770 ligam-se na GCs quando o ferro encontra-se no

estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou mesmo ausente (Stasch et al., 2002; Sumerli & Marletta, 2012). Entretanto, os ativadores atuam de maneira mais eficaz quando a enzima encontra-se nos dois últimos estados, e, por isso, caracterizam-se como substâncias NO- e heme-independente. Estudos de cristalografia mostraram que o BAY 58-2667 se liga no mesmo sítio do grupamento heme no domínio H-NOX pela presença de dois grupamentos carboxílicos, grupos funcionais esses também presentes no grupamento heme (Surmeli & Marletta, 2012). Assim, as hipóteses mais aceitas são que os ativadores deslocariam o grupamento heme da enzima ou na sua ausência “ocupariam” seu lugar (Surmeli & Marletta, 2012) (Figura 3). Em relação a primeira hipótese existe uma correlação positiva entre aumento da atividade da GCs pelo BAY 58-2667 (Surmeli & Marletta, 2012) ou BAY 60-2770 (Kumar et al., 2013) e perda do grupamento heme em células Sf9 infectadas com baculovírus. Em aorta isolada de animais espontaneamente hipertensos, em artéria safena de coelhos hiperlipidêmicos e em artéria mesocólica de pacientes diabéticos tipo II, o ativador BAY 58-2667 relaxou de maneira mais potente estes vasos em comparação aos seus respectivos controles (Stasch et al., 2006).



**Figura 3. Painel superior: conformação do grupamento heme (a) e do ativador da guanilato ciclase solúvel BAY 58-2667 (b) na GCs (Schmidt et al., 2009). Painel inferior: A. Estrutura química do cinaciguat (Cin, BAY 58-2667) e do grupamento heme. Mecanismos propostos de ação do cinaciguat quando o grupamento heme encontra-se ausente (B) ou presente com o ferro no estado oxidado ( $Fe^{3+}$ , C). (Surmeli & Marletta, 2012).**

Em relação ao BAY 60-2770 (Figura 4), somente doze trabalhos foram publicados até o momento. Desses, oito avaliaram o efeito desta substância em modelos patológicos como fibrose hepática induzida em ratos (Knorr et al., 2008; Xie et al., 2012); camundongos deficientes de heme-oxigenase-1 (Jones et al., 2010; Wang et al., 2013); hipertrofia cardíaca causada por aumento da pressão (Tsai et al., 2012) ou volume (Liu et al., 2013) em ratos, hipertensão após infusão de oxi-hemoglobina (Raat et al., 2013) e disfunção erétil induzida pela lesão do nervo cavernoso (Lasker et al., 2013). Assim como observado com BAY 58-2667, a adição *in vitro* do BAY 60-2770 em célula Sf9 infectada com baculovírus (Knorr et al., 2008) ou em plaquetas (Mendes-Silvério et al., 2012) aumentou os níveis de GMPc, sendo este aumento potencializado na presença do ODQ. Mais recentemente, Kumar e colaboradores, 2013 mostraram que o BAY 60-2770 ativou de maneira mais eficaz (aproximadamente 10%) a GCs isolada em comparação ao BAY 58-2667 e que assim como este último adquiriu conformação semelhante ao grupamento heme devido também a presença de grupos carboxílicos.



**Figura 4.** Estrutura química do BAY 60-2770 (4-((4-carboxibutil)[2-(5-fluoro-2-[[4'-(trifluorometil)bifenil-4-yl]metoxi} fenil)etil]amino}ácido benzóico).

## JUSTIFICATIVA

Após o reconhecimento do óxido nítrico (NO) como “factor de relaxamento derivado do endotélio”, encontramos um aumento expressivo de pesquisas com relação à resposta a exposição ao NO. Uma das linhas de pesquisa relaciona-se às possíveis terapias com pacientes que apresentam hipertensão arterial pulmonar (HAP). Inicialmente a inalação de NO foi introduzida como uma potencial terapia para esse tipo de patologia. Apesar da clara demonstração de suas propriedades vasodilatadora pulmonar seletiva e potente, a terapia inalatória só foi formalmente aprovada pelo Federal Drug Administration (FDA) para uso clínico no tratamento de bebês nascidos a termo e de curto prazo com hipertensão pulmonar persistente grave do recém-nascido (HPPN), com insuficiência respiratória hipoxêmica aguda. Nas últimas décadas, a conduta inalatória permanece sendo a terapia central para HPP e é comumente usado para testes vasoreatividade pulmonar agudo durante o cateterismo cardíaco direito e para o tratamento de pacientes adultos e pediátricos com HAP associada à cirurgia cardíaca no pós-operatório, insuficiência respiratória grave, crises de hipertensão pulmonar e outras desordens.

Relatórios recentes sobre Hipertensão Arterial Pulmonar (PAH) sugerem que a idade média de diagnóstico está aumentando, delineando uma proporção crescente de pacientes idosos do sexo masculino. Como consequência, a descrição clássica da doença está mudando e não pode mais ser descrito como uma doença rara que afeta normalmente mulheres jovens. Explicações potenciais desta mudança pode incluir um envelhecimento da população nos países ocidentais, o aumento da expectativa de vida e a crescente conscientização da HAP e surgimento de potenciais tratamentos eficientes (Lador F, Herve P, 2013).

Uma vez que os ativadores da GCs constituem uma promissora e vantajosa classe terapêutica para o tratamento de desordens cardiovasculares, pulmonares e até mesmo urológicas, o presente trabalho visa compreender de maneira mais detalhada o efeito do BAY 60-2770 em artéria pulmonar isolada de coelho.

## **2. OBJETIVOS:**

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar *in vitro* o relaxamento induzido pelo ativador da guanilato ciclase solúvel, BAY 60-2770 em artéria pulmonar isolada de coelho.

Os objetivos específicos incluem:

- Avaliar o efeito dos inibidores da guanilato ciclase solúvel, da sintase de óxido nítrico, da ciclooxygenase, da fosfodiesterase tipo 5 no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 em artéria pulmonar.
- Avaliar o efeito da remoção do endotélio, do sequestro de NO ou da doação de NO no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 em artéria pulmonar isolada;
- Avaliar o efeito do bloqueador dos canais de potássio ativados por ATP no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 em artéria pulmonar isolada;
- Avaliar o efeito do BAY 60-2770 sozinho ou co-incubado com os inibidores da GCs ou da sintase de óxido nítrico na contração induzida pela estimulação elétrica ou por agonista dos receptores alfa-1 em artéria pulmonar isolada.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Os experimentos foram realizados utilizando coelhos machos da raça New Zealand (3 a 4 kilogramas) provenientes da Granja ANILAB. Os animais foram mantidos no coelhário da UNICAMP, alocados em estantes ventiladas, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25 °C) com ração e água fornecidas *ad libitum*. Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética em Experimentação Animal (protocolo CEEA/IB UNICAMP N° 2720-1).

### **3.2. Preparação de artéria pulmonar**

Os animais foram anestesiados com ketamina 70 mg/Kg intramuscular, seguido de isoflurano 100%. O tórax foi aberto medialmente e os animais exsanguinados através da secção da artéria aorta abdominal e o leito arterial pulmonar foi isolado. O tecido arterial pulmonar isolado foi cortado em 4 anéis (dois anéis da artéria pulmonar direita e dois anéis da esquerda) de, aproximadamente, 5 mm e montados em ganchos de aço inox em forma de L, colocados em cubas para órgão isolado de 10 ml contendo solução nutritiva de Krebs, mantidos a 37° C de temperatura e constantemente aerado com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Foi aplicado uma tensão por volta de 10 mN durante 45 minutos, sendo a tensão reajustada quando necessário. Os dados foram captados pelo sistema de Aquisição de Dados PowerLab 4/30™; software LabChart, version 7.3.7, AD Instruments, MA, (USA). A presença do endotélio foi confirmada quando se obteve relaxamento à acetilcolina (ACh 1 μM) de, pelo menos, 80%. Experimentos preliminares mostraram que a incubação prévia dos inibidores/antagonistas não interferiu na pré-contracção induzida pela fenilefrina.

### 3.3. Protocolos funcionais de relaxamento

- Curva concentração resposta ao BAY 60-2770 (0.001-30  $\eta$ M) na ausência (controle) e na presença dos inibidores da sintase de óxido nítrico (L-NAME, 100  $\mu$ M), da guanilato ciclase solúvel (ODQ, 10  $\mu$ M), da fosfodiesterase tipo 5 e da ciclooxygenase (indometacina, 10  $\mu$ M).
- Curva concentração resposta ao BAY 60-2770 (0.001-30  $\eta$ M) na ausência (controle) e na presença do bloqueador de canal de potássio ativado por ATP ( $K_{ATP}$ , glibenclamida, 10  $\mu$ M), do sequestrador de NO (hidroxicobalamina, 100  $\mu$ M), do doador de NO (SNP, 30  $\eta$ M) ou na ausência de endotélio.

### 3.4. Protocolo de contração:

- a) Curva de contração frente a estimulação elétrica (4-16 Hz, 80 V, 40 segundos de estimulação) na ausência e na presença de tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu$ M) ou fentolamina (1  $\mu$ M).
- b) Curva de contração frente a estimulação elétrica (4-16 Hz, 80 V, 40 segundos de estimulação) na ausência e presença do ativador BAY 60-2770 (1 $\eta$ M) ou BAY 60-2770 (1 $\eta$ M) + ODQ (10  $\mu$ M).
- c) Curva de contração frente a estimulação elétrica (4-16 Hz, 80 V, 40 segundos de estimulação) na ausência e presença do ativador BAY 60-2770 (1  $\eta$ M) ou BAY 60-2770 (1 $\eta$ M) + L-NAME (100  $\mu$ M)
- d) Curva concentração resposta a fenilefrina (0.000001-3 mM) na ausência e na presença de ODQ (10 $\mu$ M), BAY 60-2770 (1 $\eta$ M) sozinho ou co-incubado com ODQ (10 $\mu$ M).

e) Curva concentração resposta a fenilefrina (0.000001-3 mM) na ausência e na presença de L-NAME (100  $\mu$ M), BAY 60-2770 (1 $\eta$ M) sozinho ou co-incubado com L-NAME (100  $\mu$ M).

### **3.5 Análise dos resultados**

O relaxamento provocado pelo BAY 60-2770 foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (3  $\mu$ M). Os protocolos experimentais de contração foram corrigidos pelo KCl (80 mM).

### **3.6 Análise Estatística:**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias (E.P.M) de um número experimental ( $n$ ). O teste “t” de student foi utilizado para as análises estatísticas. O programa Instat (GraphPad Software) foi usado para estas análises. Em algumas análises a análise de variância de um caminho (one-way ANOVA), seguido do teste Bonferroni foi utilizada.  $P < 0.05$  foi aceito como significante.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito dos inibidores da via NO/sGC/PDE5 no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770

O ativador da GCs, BAY 60-2770 relaxou a artéria pulmonar de maneira potente e eficaz (tabela 1). Na presença dos inibidores da GCs (ODQ, 10  $\mu$ M, n=4, Figura 5A,) ou da fosfodiesterase tipo 5 (tadalafil, 100  $\eta$ M, n= 4, Figura 5B) houve potencialização no relaxamento de, aproximadamente, 4,9 e 5,6 vezes, respectivamente. A inibição da sintase de óxido nítrico pelo L-NAME (100  $\mu$ M, n=5, Figura C) produziu um deslocamento de 3 vezes para a esquerda no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770.

**Tabela 1. Valores de potência (pEC<sub>50</sub>) e resposta máxima (E<sub>max</sub>) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença do ODQ, tadalafil e L-NAME**

Grupos	E <sub>max</sub>	pEC <sub>50</sub>
Controle E+(n=4-5)	107,75 $\pm$ 1,96	9,97 $\pm$ 0,06
ODQ 10 $\mu$ M(n= 4)	104,84 $\pm$ 1,99	10,79 $\pm$ 0,03 *
Tadalafil 100 $\eta$ M (n=4)	104,79 $\pm$ 1,48	10,85 $\pm$ 0,05 *
L-NAME 100 $\mu$ M (n=5)	105,33 $\pm$ 1,67	10,40 $\pm$ 0,06 *

Os dados representam média  $\pm$  erro padrão média para 4-5 animais. comparado com os respectivos grupos controles \*. \*P<0,05

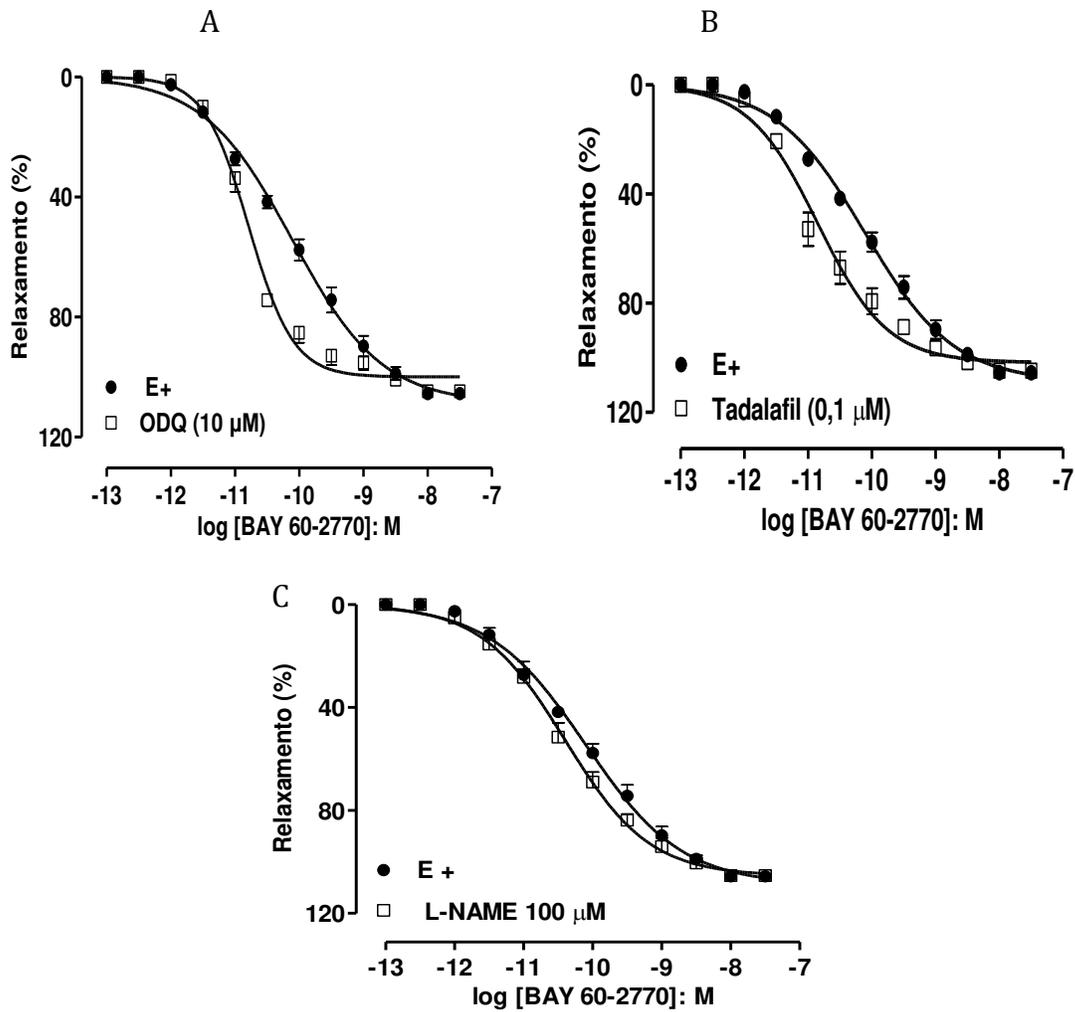


Figura 5. Relaxamento induzido pelo ativador da GCs, BAY 60-2770 (0.0001- 30  $\mu$ M) na ausência (E+) e na presença dos inibidores da guanilato ciclase solúvel (ODQ, 10  $\mu$ M, n=4, A), da fosfodiesterase tipo 5 (tadalafil, n=4, 100  $\mu$ M, B) e da sintase de óxido nítrico (L-NAME, n=5 100  $\mu$ M, C). Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média, “n” animais.

## 4.2 Efeito da remoção do endotélio, do sequestrador e doador de NO no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770

Uma vez que na etapa anterior havíamos observado um discreto aumento na potência do BAY 60-2770 frente ao L-NAME, procuramos utilizar de outras ferramentas farmacológicas que sabidamente interferem na biodisponibilidade de NO endógeno. Assim, na presença do sequestrador de NO, hidroxicoalamina (100  $\mu$ M, n= 8, Figura 6A), do doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, 30  $\eta$ M, n= 4, Figura 6B) ou a remoção da camada endotelial (n= 8, Figura 6C) não houve alteração nos parâmetros farmacológicos do BAY 60-2770 em comparação a curva controle (tabela 2). A concentração de 30  $\eta$ M de SNP foi escolhida, pois esta foi a máxima concentração utilizada sem interferir na amplitude de contração da fenilefrina.

**Tabela 2. Valores de potência (pEC<sub>50</sub>) e resposta máxima (E<sub>max</sub>) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença da hidroxicoalamina, nitroprussiato de sódio ou remoção endotélio.**

Grupos	E <sub>max</sub>	pEC <sub>50</sub>
Controle E+(n=4-8)	107,75 ± 1,96	9,97 ± 0,06
Sem endotélio E- (n=8)	115,47 ± 3,22	9,81 ± 0,10
Hidroxicoalamina 100 $\eta$ M (n=8)	103,13 ± 1,60	10,25 ± 0,06
Nitroprussiato de Sódio 30 $\eta$ M (n=4)	105,46 ± 3,05	9,87 ± 0,09

Os dados representam media  $\pm$  erro padrão média para 4-8 animais. comparado com os respectivos grupos controles \*. \*P<0,05

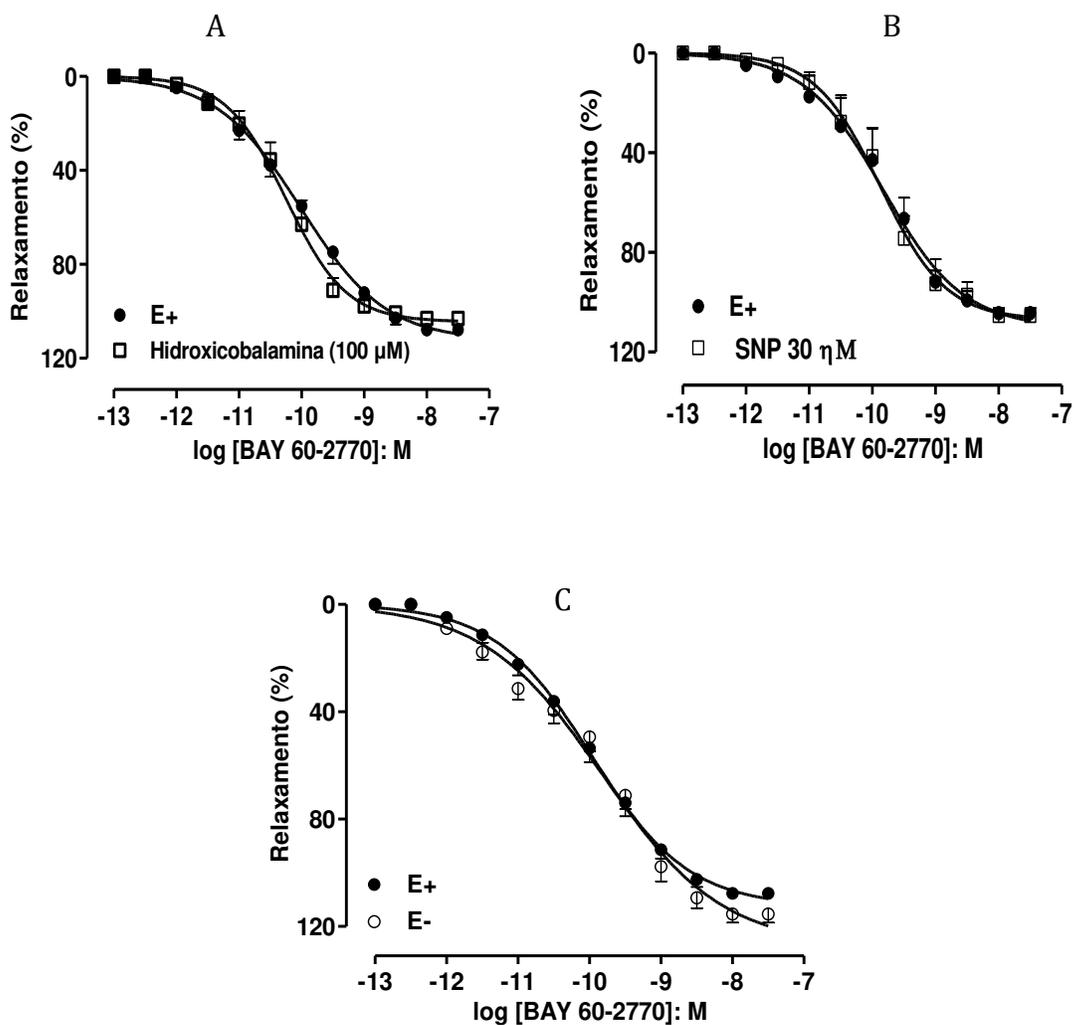


Figura 6. Relaxamento induzido pelo ativador da GCs, BAY 60-2770 (0.0001- 30 ηM) na ausência (E+) e na presença do sequestrador de NO (hidroxicobalamina, 100 μM, n=8, A), do doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, 30 ηM, n=4 B) ou da remoção endotelial (C, n=8). Os dados representam média ± erro padrão da média, “n” animais.

### 4.3 Efeito da inibição da ciclooxygenase ou do bloqueador do canal de potássio no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770

A incubação prévia de indometacina (10  $\mu$ M) (tabela 3, figura 7) ou do bloqueador dos canais de potássio ativados por ATP, glibenclamida (10  $\mu$ M) não interferiu no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 (tabela 3, Figura 8)

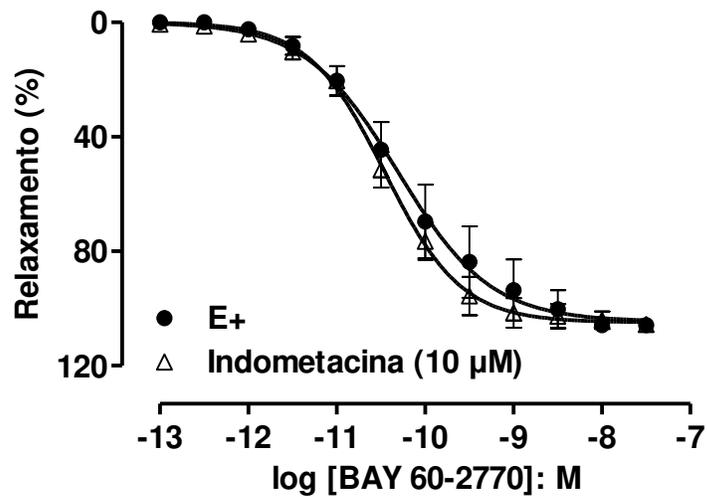


Figura 7. Relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 (0.0001-30  $\eta$ M) na presença do inibidor da ciclooxygenase, indometacina (10  $\mu$ M, n=8). Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média, “n” animais.

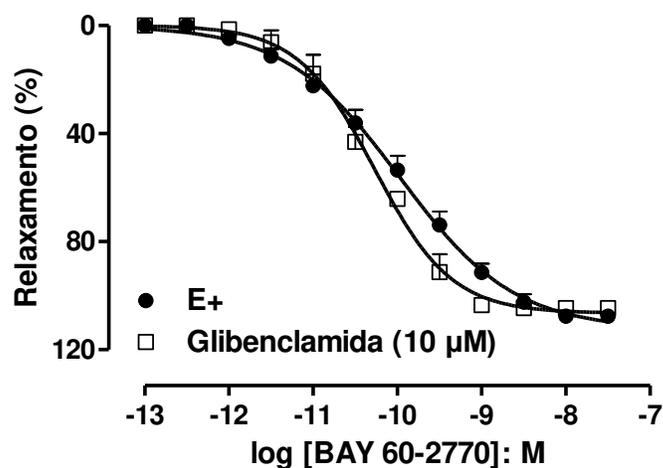


Figura 8. Relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 (0.0001-30  $\eta$ M) na presença do inibidor dos canais de potássio ativados pelo ATP (glibenclamida, 10  $\mu$ M, n= 4). Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média, “n” animais.

Tabela 3. Valores de potência ( $pEC_{50}$ ) e resposta máxima ( $E_{max}$ ) do relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 na ausência (controle) e na presença de indometacina ou glibenclamida.

Grupos	$E_{max}$	$pEC_{50}$
Controle E+(n=4-8)	105,75 $\pm$ 2,40	10,31 $\pm$ 0,06
Indometacina 10 $\mu$ M(n=8)	105,67 $\pm$ 2,21	10,46 $\pm$ 0,05
Glibenclamida 10 $\mu$ M(n=4)	104,76 $\pm$ 1,54	10,27 $\pm$ 0,04

Os dados representam media  $\pm$  erro padrão média para 4-8 animais. comparado com os respectivos grupos controles \*. \* $P < 0,05$

#### 4.4 Efeito do BAY 60-2770 na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista alfa-1 adrenérgico na presença e ausência do inibidor da guanilato ciclase solúvel

Na presença BAY 60-2770 (1  $\eta$ M) houve um deslocamento para a direita de, aproximadamente, 2,5 vezes ( $P < 0,05$ ). Na presença de ODQ não observamos redução da contração induzida pela fenilefrina em comparação aos anéis incubados somente com BAY 60-2770 (1  $\eta$ M) (Figura 9, tabela 4). A presença do ODQ sozinho não interferiu nos parâmetros farmacológicos da fenilefrina.

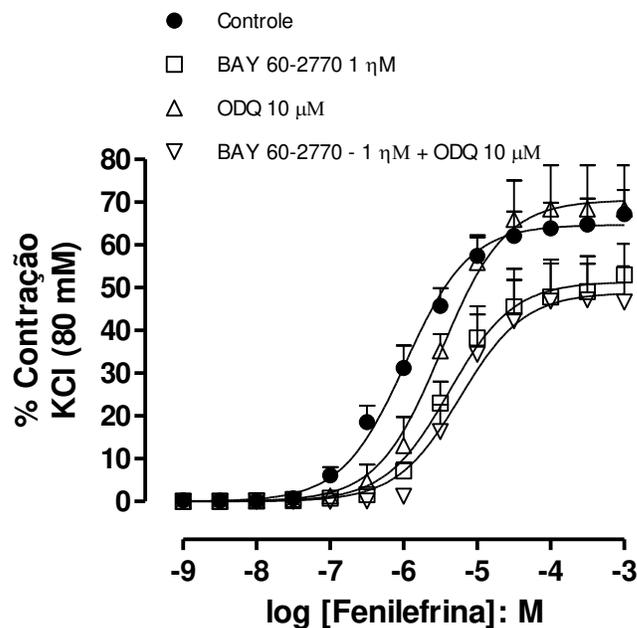


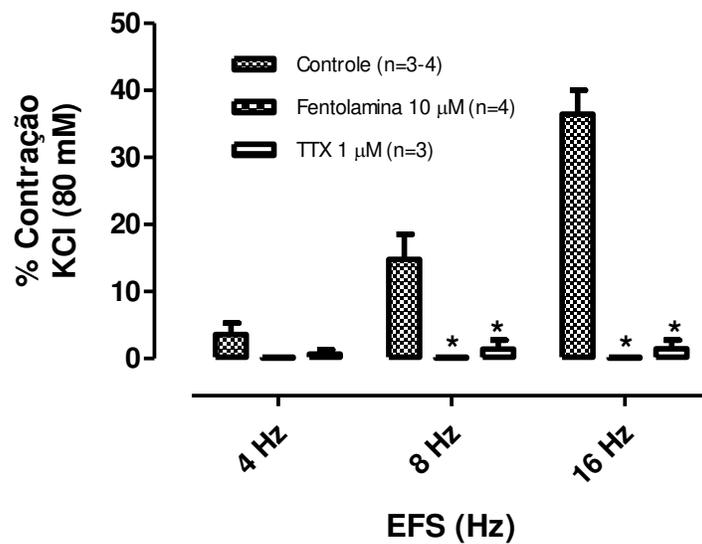
Figura 9. Curva concentração resposta a fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1  $\eta$ M), BAY 60-2770 (1  $\eta$ M) + ODQ (10  $\mu$ M) e ODQ (10  $\mu$ M). A contração foi corrigida em relação ao KCl 80 mM. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média, “n” animais.

**Tabela 4. Valores de potência (pEC<sub>50</sub>) e resposta máxima (E<sub>max</sub>) da contração induzida pela fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 1  $\eta$ M, BAY 1 $\eta$ M+ODQ e ODQ.**

<b>Grupos</b>	<b>E<sub>max</sub></b>	<b>pEC<sub>50</sub></b>
Controle (n=3-7)	67,19 $\pm$ 5,67	5,97 $\pm$ 0,08
BAY 1 $\eta$ M (n=7)	53,00 $\pm$ 7,22	5,38 $\pm$ 0,13 *
BAY 1 $\eta$ M + ODQ 10 $\mu$ M (n=6)	46,60 $\pm$ 8,37	5,22 $\pm$ 0,15 *
ODQ 10 $\mu$ M (n=3)	68,40 $\pm$ 10,24	5,48 $\pm$ 0,10

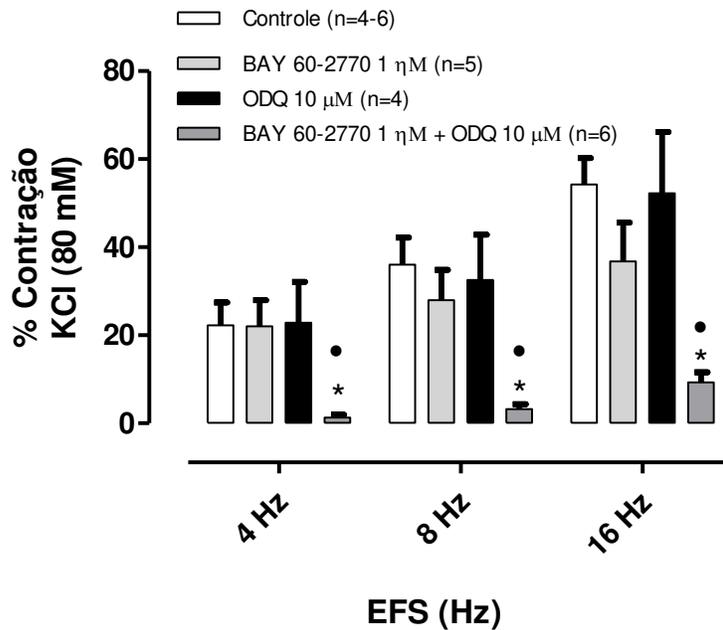
Os dados representam media  $\pm$  erro padrão média para 3-7 animais. comparado com os respectivos grupos controles \*. \* $P < 0,05$

A estimulação elétrica (4-16 Hz, 80 V, 45 segundos de estimulação) produziu contração que foi dependente da frequência. A adição prévia de fentolamina (1  $\mu$ M, n= 4) ou tetrodotoxina (TTX, 1  $\mu$ M, n=3) praticamente aboliu a resposta contrátil, mostrando a liberação neurogênica de catecolamina (Figura 10).



**Figura 10.** Curva frequência resposta na ausência (controle) e na presença de tetrodotoxina (1 µM) ou fentolamina (10 µM). Os dados representam média ± erro padrão da média, “n” animais.

Na presença de BAY 60-2770 1 nM (n=6) podemos observar uma tendência de redução da amplitude de contração nas frequências de 8 e 16 Hz. Diferentemente do observado com a contração induzida pela fenilefrina, a co-incubação de BAY 60-2770 com ODQ (10 µM, n= 4) reduziu em, aproximadamente, 92% (P<0,05) a contração em todas as frequências estudadas (Figura 11) em comparação ao controle e aos anéis incubados somente com BAY 60-2770 (1 nM). A presença do ODQ não interferiu significativamente na amplitude de contração tanto da estimulação elétrica quanto na contração com fenilefrina.



**Figura 11.** Curva frequência resposta na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + ODQ (10 μM) e ODQ (10 μM). A contração foi corrigida em relação ao KCl 80 mM. Os dados representam média ± erro padrão da média, “n” animais.

\*P<0,05 em relação ao controle e ao BAY 60-2770 1 nM

#### **4.5 Efeito do BAY 60-2770 na contração induzida pela estimulação elétrica ou pelo agonista adrenérgico na presença e ausência de NO**

Assim como observado com o inibidor da GCs, a co-incubação de BAY 60-2770 com L-NAME não reduziu significativamente a contração a fenilefrina em comparação aos anéis incubados somente com BAY 60-2770 (1 nM) (Figura 12). A presença de L-NAME sozinho não interferiu nos parâmetros farmacológicos da fenilefrina.

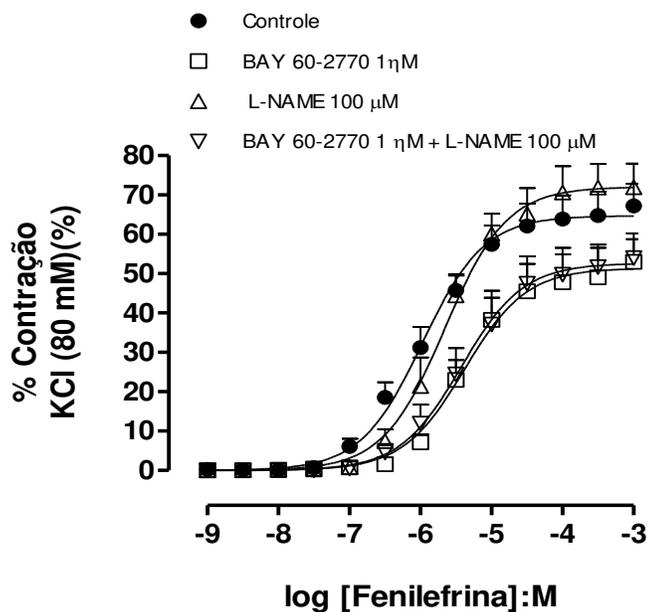


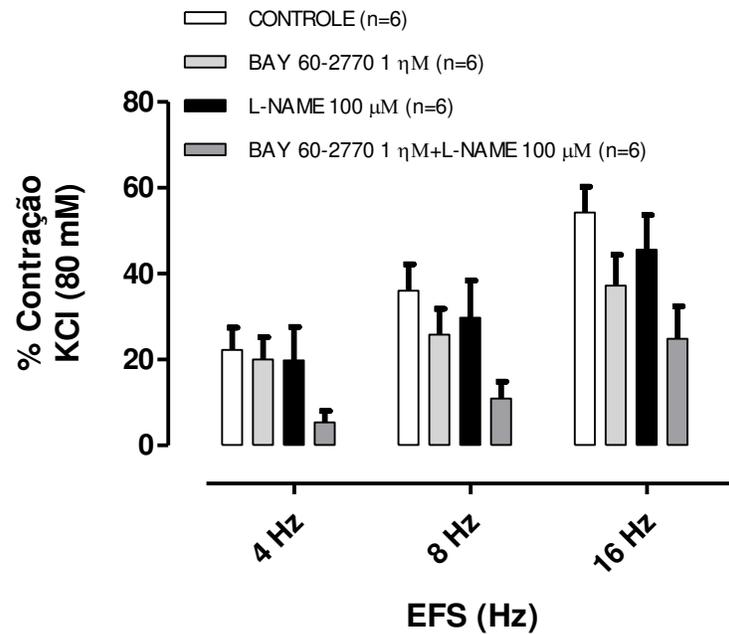
Figura 12. Curva concentração resposta a fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + L-NAME (10 μM) e L-NAME (10 μM). A contração foi corrigida em relação ao KCl 80 mM. Os dados representam média ± erro padrão da média, “n” animais.

Tabela 5. Valores de potência (pEC<sub>50</sub>) e resposta máxima (E<sub>max</sub>) da contração induzida pela fenilefrina na ausência (controle) e na presença de BAY 1 nM, BAY 1nM + L-NAME e L-NAME.

Grupos	E <sub>max</sub>	pEC <sub>50</sub>
Controle (n=6-9)	67,19 ± 5,67	5,97 ± 0,08
BAY 1 nM (n=7)	53,00 ± 7,22 *	5,38 ± 0,13 *
L-NAME 100μM (n=6)	71,95 ± 5,97	5,65 ± 0,07
BAY 1 nM + L-NAME 100μM (n=9)	53,95 ± 4,8	5,42 ± 0,10 *

Os dados representam media ± erro padrão média para 6-9 animais. comparado com os respectivos grupos controles \*. \*P<0,05

A co-incubação de BAY 60-2770 com L-NAME (100  $\mu$ M, n=4) reduziu em, aproximadamente, 74% a contração em todas as frequências estudadas (Figura 13), apesar de não ter sido estatisticamente significativa. A presença do L-NAME não interferiu na amplitude de contração da estimulação elétrica.



**Figura 13.** Curva frequência resposta (4-16 Hz, 80 V, 45 segundos estimulação) na ausência (controle) e na presença de BAY 60-2770 (1 nM), BAY 60-2770 (1 nM) + L-NAME (10  $\mu$ M) e L-NAME (10  $\mu$ M). A contração foi corrigida em relação ao KCl 80 mM. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média, “n” animais.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 foi potencializado na presença do ODQ e tadalafil, sugerindo que a oxidação do grupamento heme e a inibição da PDE5 favoreceram o relaxamento do BAY 60-2770 devido, principalmente, ao maior acúmulo de GMPc. Por outro lado, observamos um discreto deslocamento a esquerda na presença dos inibidores da sintase de óxido nítrico. Na ausência de endotélio, na presença de sequestrador ou doador de NO o relaxamento do BAY 60-2770 não foi alterado. Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, a contração induzida pela estimulação elétrica teve uma tendência de redução quando o BAY 60-2770 foi co-incubado com o inibidor da GCs ou da sintase de óxido nítrico

Em experimentos de alto rendimento utilizando células de ovário de hamster chinês que expressavam GCs mais de 250,000 moléculas foram avaliadas, sendo os compostos amino dicarboxílico, dentre eles o BAY 58-2667 e BAY 60-2770 os mais potentes. Diferentemente do observado com NO, YC-1 e BAY 41-2272, a atividade da GCs foi aumentada pelo BAY 58-2667 (Stasch et al., 2002c) ou BAY 60-2770 (Kumar et al., 2013) mesmo na presença do ODQ. No primeiro trabalho os autores mostraram que o BAY 58-2667 induziu relaxamento da artéria safena de ratos, inibiu a atividade plaquetária e reduziu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (Stasch et al., 2002c).

Até o presente momento, a maior parte dos trabalhos em pesquisa básica e clínica com os ativadores envolve a molécula BAY 58-2667 (cinaciguat) em modelos insuficiência cardíaca (Boerrigter et al., 2007; Erdmann et al., 2013),

fibrose hepática (Frey et al., 2012) e diabetes (Stasch et al., 2006). Os estudos clínicos com o BAY 58-2667 estão sendo conduzidos principalmente em voluntários sadios e em pacientes com hipertensão pulmonar ou fibrose hepática para avaliar a eficácia e os parâmetros farmacocinéticos nestes sujeitos de pesquisa.

Nossos dados funcionais *in vitro* mostraram que o BAY 60-2770 relaxou a artéria pulmonar de coelhos sadios, sendo este efeito potencializado na presença do inibidor da GCs e pelo tadalafil. Como o relaxamento do BAY 60-2770 é afetado positivamente na presença do ODQ fica difícil afirmar se esta resposta se dá, exclusivamente, pelo acúmulo de GMPc. Em tecido vascular (Stasch et al., 2006) e não vascular (Knorr et al., 2008), em plaquetas (Mendes-Silvério et al., 2012) a adição de BAY 58-2667 ou BAY 60-2770 levou ao aumento dos níveis GMPc. Devido a existência da quantificação de GMPc na literatura, achamos desnecessária a quantificação no presente trabalho.

Este é o primeiro trabalho *in vitro* mostrando que a ausência de NO não interfere negativamente no relaxamento induzido pelo ativador BAY 60-2770. Nossos dados corroboram estudos *in vivo*, em que a administração endovenosa de BAY 60-2770 (10-100 µg/Kg) produziu queda da pressão pulmonar e sistêmica, sendo este efeito potencializado em animais tratados previamente com L-NAME (50 mg/Kg). A pressão arterial sistêmica e pulmonar aumentaram após administração de L-NAME sozinho (Pankey et al., 2011). Mais recentemente, a infusão de oxihemoglobina em ratos levou a aumentos significativos na pressão arterial média (PAM: de  $97 \pm 4$  para  $155 \pm 4$  mmHg),

devido, principalmente, ao sequestro de NO. A infusão prévia de nitroprussiato de sódio (0.4 µg/Kg/min) e sildenafil (10 µg/Kg/min) ou bôlus de BAY 41-8543 (10 µg/Kg) ou BAY 60-2770 (1 µg/Kg) reduziu em, aproximadamente, 13-17%, a PAM, porém, somente o BAY 60-2770 foi capaz de evitar o aumento da pressão induzida pela infusão de oxihemoglobina (Raaf et al., 2013). Nestes trabalhos os autores não discutem de maneira detalhada o porquê da resposta do BAY 60-2770 ser mais eficaz na ausência de NO. Uma vez que estudos cristalográficos mostraram que as conformações adquiridas pelo BAY 58-2667 ou BAY 60-2770 na GCs se assemelham a do grupamento heme e, sabendo que o NO liga-se avidamente no sítio ativo da GCs, uma possível hipótese é que o NO estaria impedindo a ligação do ativador no sítio ativo da enzima, atuando assim como um agonista parcial. Por outro lado, estudo bioquímico mostrou que a co-incubação do BAY 58-2667 com o doador de NO, DEA/NO (100 nM) aumenta a atividade da GCs em comparação as células incubadas somente com BAY 58-2667 (Schmidt et al., 2003). Os dados da literatura são claros quanto ao papel do NO frente aos estimuladores, porém controversos em relação ao ativadores.

Baseado na hipótese acima, procuramos utilizar de outras ferramentas farmacológicas que sabidamente interferem na biodisponibilidade do NO. A presença do sequestrador de NO, hidroxicoalamina (Jenkison et al., 1995; Roger et al., 2010), a remoção do endotélio ou a adição do doador de NO, nitroprussiato de sódio (30 nM) não alteraram os parâmetros farmacológicos do BAY 60-2770, sugerindo em um primeiro momento que o NO não atrapalharia a ligação dos ativadores no sítio ativo da GCs. Assim, pelos nossos achados

podemos somente afirmar que em situações onde há menor biodisponibilidade de NO, os ativadores também seriam mais eficazes frente aos estimuladores. Se é a própria molécula do L-NAME, e não a inibição da NOS, que interfere na ação do ativadores novos protocolos experimentais precisariam ser realizados com outros inibidores da NOS. Assim, é plausível especular que em situações onde possa haver aumento da atividade simpática, como hipertensão pulmonar (Mak et al., 2012), insuficiência cardíaca (Wang et al., 2012) e doença renal crônica (Ewen et al., 2013) concomitantemente com a oxidação da GCs e/ou menor biodisponibilidade de NO os ativadores seriam eficazes.

A regulação do tônus vascular se dá, principalmente, pela liberação de substâncias oriundas do endotélio, nervos ou por hormônios. Estudos de imunohistoquímica em artéria pulmonar de ovelha, coelho, cão, humano (Kummer, 2011) mostraram a presença das enzimas tirosina hidroxilase (TH), colina acetil transferase (ChAT), do neuropeptídeo Y. Nossos resultados mostraram que contração induzida pela estimulação elétrica se deu, principalmente, pela liberação neurogênica de catecolaminas uma vez que tanto a TTX, como a fentolamina aboliram esta resposta. Estudo preliminar em anocócigeo de coelho e corpo cavernoso de coelho e humano (Cellek & Moncada, 1997) mostrou que na ausência de NO o início da contração induzida pela estimulação elétrica ocorreu de maneira mais rápida em comparação ao tecido controle, sugerindo que o NO liberado das fibras nitrérgicas pode estimular tanto a musculatura lisa como modular pré-sinápticamente a liberação de noradrenalina. Na co-incubação de BAY 60-2770 (1nM) com L-NAME houve

uma tendência de redução da contração induzida pela estimulação elétrica, porém, os mesmos resultados não foram observados nos protocolos com a fenilefrina. Possivelmente, as concentrações utilizadas de fenilefrina são superiores quanto comparadas à quantidade de noradrenalina liberada após estimulação elétrica.

Em relação aos fatores liberados do endotélio oriundos da via da ciclooxigenase, as principais substâncias vasoativas liberadas são a prostaglandina D<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaglandina F<sub>2α</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Desses, a PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e TXA<sub>2</sub> são os principais agentes contráteis. Em artéria pulmonar principal e intrapulmonar de coelho a ACh induziu contração, devido, principalmente, a liberação de TXA<sub>2</sub>, sendo este efeito mais pronunciado nas artérias intrapulmonares. A indometacina reduziu significativamente a contração induzida pela ACh tanto em endotélio intacto como removido, sugerindo assim que tanto o endotélio como a musculatura lisa são importante fonte de prostanóides (Altiere et al., 1986; Pfister & Campbell, 1996). Por outro lado, estudos preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que o relaxamento induzido pela ACh foi significativamente reduzido na presença de indometacina, mostrando que neste leito e espécie animal os agentes relaxantes oriundos da via da ciclooxigenase modulam a reatividade vascular. Entretanto, o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770 não parece envolver esta via, uma vez que a indometacina não interferiu nesta resposta.

As células musculares lisas podem expressar quatro tipos de canais de potássio a saber: os ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub><sup>2+</sup>), por voltagem (K<sub>v</sub>), por ATP

( $K_{ATP}$ ) e corrente de potássio retificadora tardia (Kir). Estes canais são proteínas transmembrana e tem papel importante na manutenção do tônus vascular (Dick & Tune, 2010), e não vascular (Petkov, 2011; Perez-Zoghbi et al., 2009). Assim como observado com os estimuladores da GCs (Teixeira et al., a,b; Baú et al., 2010) os bloqueador dos canais de potássio ativados por ATP também não interferiram no relaxamento induzido pelo BAY 60-2770.

## 6. Sumário

- O relaxamento induzido pelo ativador da GCs, BAY 60-2770 foi potencializado na presença de ODQ, Tadalafil e discretamente na presença do L-NAME;
- A ausência do endotélio, a presença de doador de NO, o sequestro de NO, a indometacina ou bloqueio dos canais de potássio ativados pelo ATP não alteraram o relaxamento induzido pelo BAY 60-2770;
- A contração induzida estimulação elétrica apresentou redução quando o ativador BAY 60-2770 foi co-incubado com ODQ;
- A contração induzida pela estimulação elétrica apresentou pequena redução quando o ativador BAY 60-2770 foi co-incubado com L-NAME, porém não sendo estatisticamente significativa.

## **7. Conclusão:**

Nossos dados *in vitro* sugerem que em situações onde há oxidação do grupamento heme da GCs e/ou menor biodisponibilidade de NO, o relaxamento do ativador BAY 60-2770 não foi interferido negativamente, diferentemente do que ocorre com a classe de estimuladores da GCs.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Altieri RJ, Kiritsy-Roy JA, Catravas JD. Acetylcholine-induced contractions in isolated rabbit pulmonary arteries: role of thromboxane A<sub>2</sub>. **J Pharmacol Exp Ther.**, 236(2):535-41, 1986.

Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 17;99(19):12097-101, 2002.

Báu FR, Mónica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. **Eur J Pharmacol.**, 10;637(1-3):171-7, 2010.

Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC Jr. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. **Hypertension**, 49(5):1128-33, 2007.

Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. **Am J Cardiol.**, 90(suppl):40L–48L, 2002.

Cellek S, Moncada S. Nitrergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 22;94(15):8226-31, 1997.

Cogolludo A, Moreno L, Villamor E. Mechanisms controlling vascular tone in pulmonary arterial hypertension: implications for vasodilator therapy. **Pharmacology**, 79(2):65-75, 2007.

Craven PA, DeRubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. **J. Biol. Chem.**, 253(23):8433-43, 1978.

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, 15;109(23 Suppl 1):III27-32, 2004.

Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta.**, 1411(2-3):334-50, 1999.

Dick GM, Tune JD. Role of potassium channels in coronary vasodilation. **Exp Biol Med (Maywood)**, 235(1):10-22., 2010.

Erdmann E, Semigran MJ, Nieminen MS, Gheorghide M, Agrawal R, Mitrovic V, Mebazaa A. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. **Eur Heart J.**, 34(1):57-67, 2013.

Ewen S, Ukena C, Linz D, Schmieder RE, Böhm M, Mahfoud F. The Sympathetic Nervous System in Chronic Kidney Disease. **Curr Hypertens Rep.**, 2013.

Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG Jr, Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. **J Clin Invest.** 1999;103(2):291-9.

Frey R, Scheerans C, Blunck M, Mück W, Gnoth MJ, Unger S, Schmidt A, Wensing G. Pharmacokinetics of the soluble guanylate cyclase activator cinaciguat in individuals with hepatic impairment. **J Clin Pharmacol.** 2012 Nov; 52(11):1714-24.

Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G, Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper, **FEBS Lett.**, 132, 71-74, 1981.

Gerzer R, Hofmann F, Schultz G, Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung, **Eur. J. Biochem.**, 116, 479-486, 1981.

Gupta G, Azam M, Yang L, Danziger RS. The L2 subunit inhibits stimulation of the K1/L1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. **J. Clin. Invest.**, 100 1488-1492, 2006.

Harteneck C, Wedel B, Koesling D, Malkewitz J, Bohme E, Schultz G, Molecular cloning and expression of a new K-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the K-subunits of the enzyme, **FEBS Lett.**, 292 217-222, 1991.

Han RN, Stewart DJ. Defective lung vascular development in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Trends Cardiovasc Med.** 2006;16(1):29-34.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacol Sci.**, 18(12):484-91, 1997.

Hoffmann LS, Schmidt PM, Keim Y, Hoffmann C, Schmidt HH, Stasch JP. Fluorescence dequenching makes haem-free soluble guanylate cyclase detectable in living cells. **PLoS One**, 6(8):e23596, 2011.

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. 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(1):49-59, 1982.

Jenkinson KM, Reid JJ, Rand MJ. Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in the rat gastric fundus. **Eur J Pharmacol.**, 6;275(2):145-52, 1995.

Jones AW, Durante W, Korthuis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. **J Pharmacol Exp Ther.**, 335(1):85-91, 2010.

Karow DS, Pan D, Davis JH, Behrends S, Mathies RA, Marletta MA. Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. **Biochemistry**, 13;44(49):16266-74, 2005.

Knorr A, Hirth-Dietrich C, Alonso-Alija C, Härter M, Hahn M, Keim Y, Wunder F, Stasch JP. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylate cyclase by BAY 60-2770 in experimental liver fibrosis. **Arzneimittelforschung**, 58(2):71-80, 2008.

Kumar V, Martin F, Hahn MG, Schaefer M, Stamler JS, Stasch JP, van den Akker F. Insights into BAY 60-2770 Activation and S-Nitrosylation-Dependent Desensitization of Soluble Guanylyl Cyclase via Crystal Structures of Homologous Nostoc H-NOX Domain Complexes. **Biochemistry**, 2013.

Kummer W. Pulmonary vascular innervation and its role in responses to hypoxia: size matters! **Proc Am Thorac Soc.**, 8(6):471-6, 2011.

Lasker GF, Pankey EA, Frink TJ, Zeitzer JR, Walter KA, Kadowitz PJ. The sGC activator BAY 60-2770 has potent erectile activity in the rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, ;304(12):H1670-9, 2013.

Lee CW, Li D, Channon KM, Paterson DJ. L-arginine supplementation reduces cardiac noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. **J Mol Cell Cardiol.**, 47(1):149-55, 2009.

Liu Y, Dillon AR, Tillson M, Makarewich C, Nguyen V, Dell'italia L, Sabri AK, Rizzo V, Tsai EJ. Volume overload induces differential spatiotemporal regulation of myocardial soluble guanylyl cyclase in eccentric hypertrophy and heart failure. **J Mol Cell Cardiol.**, 60:72-83, 2013.

Mak S, Witte KK, Al-Hesayen A, Granton JJ, Parker JD. Cardiac sympathetic activation in patients with pulmonary arterial hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 15;302(10):R1153-7, 2012.

Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, Dickhout JG, Lhoták S, Meng QH, Wang R. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. **Circulation**, 25;127(25):2523-34, 2013.

Mendes-Silverio CB, Leiria LO, Morganti RP, Anê GF, Marcondes S, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. **PLoS One**, 7(11):e47223, 2012.

Meurer S, Pioch S, Pabst T, Opitz N, Schmidt PM, Beckhaus T, Wagner K, Matt S, Gegenbauer K, Geschka S, Karas M, Stasch JP, Schmidt HH, Müller-Esterl W. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble

guanylate cyclase from proteasomal degradation. **Circ Res**, 2;105(1):33-41, 2009.

Pankey EA, Bhartiya M, Badejo AM Jr, Haider U, Stasch JP, Murthy SN, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**;300(3):H792-802, 2011.

Perez-Zoghbi JF, Karner C, Ito S, Shepherd M, Alrashdan Y, Sanderson MJ. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulm Pharmacol Ther.**, 22(5):388-97, 2009.

Petkov GV. Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. **Nat Rev Urol.**, 13;9(1):30-40, 2011.

Pfister SL, Campbell WB. Role of endothelium-derived metabolites of arachidonic acid in enhanced pulmonary artery contractions in female rabbits. **Hypertension**, ;27(1):43-8, 1996.

Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2005 Sep;32(9):728-34.

Raat NJ, Tabima DM, Specht PA, Tejero J, Champion HC, Kim-Shapiro D, Baust J, Mik EG, Hildesheim M, Stasch JP, Becker EM, Truebel H, Gladwin MT. Direct sGC activation bypasses NO scavenging reactions of intravascular free oxy-hemoglobin and limits vasoconstriction. **Antioxid Redox Signal.**, 2013.

Roger S, Badier-Commander C, Paysant J, Cordi A, Verbeuren TJ, Féletou M.

The anti-aggregating effect of BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylyl cyclase, requires the presence of nitric oxide. **Br J Pharmacol.**, 161(5):1044-58, 2010.

Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter KD, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosionek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J.**, 32(4):881-91, 2008.

Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. **Handb Exp Pharmacol.**, (191):309-39, 2009.

Schmidt P, Schramm M, Schröder H, Stasch JP. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. **Eur J Pharmacol.**, 468(3):167-74, 2003.

Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol Pharmacol.**, 50(1):1-5, 1996.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol Rev.**,83(4):1325-58, 2003.

Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, Perzborn E, Schramm M, Straub A. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. **Br J Pharmacol.**, 135(2):332-43, 2002a.

Stasch JP, Dembowsky K, Perzborn E, Stahl E, Schramm M. Cardiovascular

actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies. **Br J Pharmacol.**, 135(2):344-55, 2002b.

Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schröder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. **Br J Pharmacol.**, ;136(5):773-83, 2002c.

Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **J Clin Invest.**, 116(9):2552-61, 2006.

Stone JR, Marletta MA. Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. **Biochemistry**, 30;35(4):1093-9, 1996.

Stone, JR and Marletta, MA. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. **Biochemistry** 34, 14668–14674, 1995.

Surmeli NB, Marletta MA. Insight into the rescue of oxidized soluble guanylate cyclase by the activator cinaciguat. **ChemBiochem**, 7;13(7):977-81, 2012.

Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. **Hypertension**, ;47(3):596-602, 2006a.

Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. **J Pharmacol Exp Ther.**, 317(1):258-66, 2006b.

Tsai EJ, Liu Y, Koitabashi N, Bedja D, Danner T, Jasmin JF, Lisanti MP, Friebe A, Takimoto E, Kass DA. Pressure-overload-induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylyl cyclase in the heart modulates enzyme stimulation. **Circ Res.**, 20;110(2):295-303, 2012.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**. 2009 Jun;196(2):193-222.

Wang WZ, Jones AW, Wang M, Durante W, Korthuis RJ. Preconditioning with soluble guanylate cyclase activation prevents postischemic inflammation and reduces nitrate tolerance in heme oxygenase-1 knockout mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2013.

Wang Y, Seto SW, Golledge J. Angiotensin II, sympathetic nerve activity and chronic heart failure. **Heart Fail Rev.**, 2012.

Xie G, Wang X, Wang L, Wang L, Atkinson RD, Kanel GC, Gaarde WA, Deleve LD. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. **Gastroenterology**, 142(4):918-927, 2012.

Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC - Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients

with pulmonary arterial hypertension. **FASEB J.** 2004; 18(14):1746-8.

Yu F, Warburton D, Wellington S, Danziger RS. Assignment of GUCIA2, the gene coding for the K2 subunit of soluble guanylyl cyclase, to position 11q21-q22 on human chromosome 11. **Genomics** 33, 334-336, 1996.

Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Identification of histidine 105 in the L1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand, **Biochemistry**, 37, 4502-4509, 1998.

Zhao Y, Brandish PE, Di Valentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, 5;39(35):10848-54, 2000.