



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR

AÇÃO DO COMPOSTO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO
cis-[Ru(bpy)₂IMn(NO)]⁺3, NA MUSCULATURA LISA
CAVERNOSA DE HUMANOS

FORTALEZA

2013

ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR

**AÇÃO DO COMPOSTO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO *cis*-
[Ru(bpy)₂Mn(NO)]³⁺, NA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA DE
HUMANOS**

Dissertação submetida à coordenação de Pós-graduação *Stricto Censu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

- L548a Leitão Junior, Alexandre Saboia.
Ação do composto do complexo nitrosil-rutênio cis-
[Ru(bpy)2IMn(NO)]+3, na musculatura lisa cavernosa de humanos /
Alexandre Saboia Leitão Junior. – 2013.
76 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Metabolismo e Comportamento Biocelular
no estresse.
Orientação: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva.
Co-Orientação: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
1. Óxido Nítrico. 2. GMP Cíclico. 3. Pênis. 4. Compostos de Rutênio. I.
Título.

CDD: 617

ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR

**AÇÃO DO COMPOSTO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO cis-
[Ru(bpy)₂IMn(NO)]⁺³, NA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA DE
HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo e comportamento biocelular no estresse

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento (Coorientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Ricardo Reges Maia Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha esposa, Jaquellyne,
por ser minha razão de existir
e fonte de inspiração
Aos meus pais, Alexandre e
Fátima, pelo incentivo
E pela base de tudo
Aos meus Sogros, Alzir
e Maria José que
me receberam como filho,
À minha irmã Érica pela torcida
Aos meus cunhados e cunhadas,
Por fazerem uma família tão linda e unida
Ao doador de órgãos,
pelo exemplo de doação máximo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Leitão de Vasconcelos pela oportunidade de realizar esse trabalho na pós-graduação de Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva, orientador e mestre, pelas oportunidades, ensinamentos e exemplos de ética e moral

Ao Prof. Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira, pelos inúmeros momentos de desprendimento, horas de paciência para ensinar tudo.

Ao Prof. Dr Ricardo Reges Maia Oliveira pela participação na banca e pelo incentivo à ciência

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, que pela capacidade me incentivou e estabeleceu o norte desse trabalho, não me deixando desanimar com as adversidades, e pela oportunidade de realizar esse trabalho no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará.

À Profa. Cláudia Ferreira Santos, pelo apoio do dia-a-dia, em todas as etapas desse trabalho.

Ao Colega Mestrando Rafael Campos pela parceria, e enorme ajuda em todas as etapas desse trabalho, tornando-se indispensável para a realização deste.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga França Lopes, por confiar e produzir o RUT-BPY-IMI, tornando esse trabalho possível.

Às Enfermeiras Aline e Lisiane, e a todos que fazem parte da equipe de captação de órgãos, que mesmo apesar de todas as dificuldades, tornaram possível a captação de corpos cavernosos para realização do trabalho.

Às famílias dos doadores, que mesmo no momento de maior dor puderam realizar um ato de amor e solidariedade ao próximo.

Aos colegas urologistas: Dr. Rômulo Silveira, Dr. Paulo Henrique de Moura Reis, Dr. Leocácio Vinícius Barroso, Dr. Rommel Prata Regadas, Dr. Samuel Moreno e Dr. Raphael Farias pelo incentivo para a ciência.

Às funcionárias da Pós-Graduação Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, pela disponibilidade a ajudar em todas as dificuldades.

RESUMO

A deficiência de óxido nítrico (NO) tem sido implicada como um dos principais mecanismos de disfunção endotelial e de Disfunção erétil. A busca de novas medicações deve ser importante para diminuir a peso dessa doença. O estudo avaliou o relaxamento, in vitro, induzido por um novo fármaco doador de NO do complexo Nitrosil-Rutênio (RUT-BPY-IMI) em tiras de corpos cavernosos de humanos, retirados de doadores de órgãos para transplante não-vivos. Os tecidos, imersos em sistemas de banhos isolados em solução de Krebs (pH7,4, 37°C), foram contraídos em solução de K^+ 80mM, e posteriormente novamente pré-contraídos com Fenilefrina (PHE 10 μ M) e curvas de concentração-resposta (10^{-12} a 10^{-4}) foram obtidas. Inicialmente o fármaco era comparado com o Veículo (DMSO) e com substâncias já utilizadas em outros estudos, que demonstraram bons efeitos relaxantes (SNP, BAY 41-2272 e Vardenafila). Para esclarecer o mecanismo pela qual esse fármaco promove seu relaxamento, foram realizados os seguintes experimentos: avaliação do relaxamento alcançado com a contração com K^+ 80mM, adição de um inibidos da Óxido Nítrico sintase (NOS), L-NAME (100 μ M); adição de ODQ (30 μ M), um inibidor da Guanilato Ciclase solúvel; um removedor de NO extracelular, Hemoglobina bovina (30 μ M); Glibenclamida (10 μ M), um bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K_{ATP}). Os tecidos expostos ao RUT-BPY-IMI, SNP e DMSO foram congelados em nitrogênio líquido para mensurar a quantidade de GMPc. A substância provocou um relaxamento máximo (E_{MAX}) na musculatura lisa de corpo cavernoso importante ($E_{MAX} = 112,92\% \pm 10,03\%$ e $pEC50 = 4,991 \pm 0,1916$), 60% a mais que o veículo. Comparando RUT-BPY-IMI com o SNP, a droga estudada mostrou tão eficiente como o SNP, não mostrando diferença entre os dois E_{MAX} ($p = 0,3437$). Já com o BAY 41-2272, não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros estudados (E_{MAX} e $pEC50$). O E_{MAX} alcançado na curva concentração- resposta com K^+ 80mM foi cerca de 20% menor que a curva com PHE (10 μ M) ($p = 0,0208$). Não houve inibição do efeito relaxante máximo da droga com L-NAME ($p > 0,05$), ou desvio da curva para a direita. A adição ODQ (30 μ M) ao banho diminuiu em cerca de 50% o E_{MAX} da substância ($p < 0,05$). Já a adição da hemoglobina bovina (30 μ M) não alterou a capacidade relaxante máxima da substância ($p < 0,05$). Não houve bloqueio de efeito máximo do fármaco com a Glibenclamida (10 μ M) ($p > 0,05$). O RUT-BPY produziu uma concentração intracelular de GMPc 74% maior que o veículo,

e menor que o SNP. O RUT-BPY-IMI é uma substância doadora NO, potente relaxadora da musculatura lisa do corpo cavernoso humano. A substância possivelmente não induz NOS, atua, provavelmente ativando a guanilato ciclase solúvel, produzindo GMPc, liberando NO intracelular. Não parece atuar nos canais de potássio, e não atuam no K_{ATP} .

Palavras chave: Óxido nítrico-antagonistas e inibidores. GMP Cíclico- antagonistas e inibidores. Pênis- Irrigação sanguínea e Efeitos de Drogas; Compostos de Rutênio-metabolismo.

ABSTRACT

Deficiency of nitric oxide (NO) has been implicated as one of the main mechanisms of Endothelial dysfunction and erectile dysfunction. The search for new medications must be important to lessen the burden of this disease. The study evaluated the relaxation, in vitro, induced by a new drug of the Nitrosyl-Ruthenium complex (RUT-BPY-IMI) into strips of corpora cavernosa, taken from non-living human organ donor for transplantation. The strips were immersed in tissue baths in Krebs solution (pH 7.4, 37°C). They were contracted in 80 mm K⁺ solution, and later again with Phenylephrine (PHE 10 μm) and concentration-response curves (10⁻¹² to 10⁻⁴ μM) were obtained. Initially the drug was compared with the vehicle (DMSO) and then with substances which have already been used in other studies. These drugs showed very good relaxing effects (SNP, BAY 41-2272 and Vardenafil). To clarify the mechanism by which this drug promotes relaxation, the following experiments were carried out: evaluation of relaxation achieved with the contraction with 80 mm K⁺, effect of an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), L-NAME (100 μm); addition of ODQ (30 μm), an inhibitor of the soluble GuanylateCyclase; a remover of the extracellular NO, bovine Hemoglobin (30 μm); Glibenclamide (10 μm), a potassium ion channel blocker ATP-dependent (K_{ATP}). The tissues exposed to the RUT-BPY-IMI, SNP and DMSO were frozen in liquid nitrogen to measure the amount of GMPc. The substance caused an E_{MAX} relaxation in smooth muscle of the corpus cavernosum (E_{MAX} = 112.92% ± 10.03% and pEC50 = 4.991 ± 0.1916), 70% more than the vehicle. Comparing RUT-BPY-IMI with the SNP, the drug studied showed as efficient as the SNP, there were no difference between both E_{MAX} (p = 0,3437). Compared with the BAY 41-2272, there was no statistical difference in any of the parameters studied (pEC50 and E_{MAX}). The E_{MAX} achieved in concentration-response curve with 80 mm K⁺ was about 20% lower than the curve with PHE (10 μm) (p = 0.0208). There was no inhibition of the relaxing effect of drug with L-NAME (p 0.05 >), or deviation from the curve to the right. The addition of ODQ (30 μm) to the bath, decreased 50% of the E_{MAX} of the substance (p<0,05). The addition of bovine hemoglobin (30 μm) did not alter the capacity maximum relaxing substance (p<0,05). There was no inhibition or blockade of the maximum effect of the drug with Glibenclamide (10 μm) (p 0.05 >). The RUT-BPY-IMI tissue concentration of cGMP produced was 74% over the vehicle, and less than the SNP

($p < 0,05$). RUT-BPY-IMI is a NO-donor, it produces a powerful relaxation of the smooth muscle of the corpus cavernosum. Probably, the substance does not induce NOS, acts by activating the soluble guanylate Cyclase, which produces cGMP, releasing the intracellular NO. It seems that it does not activate potassium channels, and not act through K_{ATP} .

Keywords-nitric: oxide-antagonists and inhibitors. Cyclic GMP-antagonists and inhibitors. Penis-blood supply and drug effects; Ruthenium compounds-metabolism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e DMSO em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contracção com fenilefrina.....	44
Tabela 2	Comparação entre os E_{MAX} das curvas dose resposta do RUT-BPY-IMI e SNP.....	45
Tabela 3	Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e BAY 41-2272 em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contracção com fenilefrina.....	45
Tabela 4	Comparação entre o E_{MAX} e $pEC50$ das curvas dose resposta do RUT-BPY-IMI na contracção com PHE e K^+ 80Mm.....	48
Tabela 5	Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e RUT-BPY-IMI + ODQ (30 μ M) em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contracção com fenilefrina.....	50
Tabela 6	Determinação dos parâmetros $pEC50$ e E_{MAX} nos grupos RUT-BPY-IMI e RUT-BPY-IMI + Hemoglobina em tira de corpo cavernoso de humano.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do corpo pênis.....	19
Figura 2 -	Suprimento arterial e drenagem venosa dos corpos cavernosos	20
Figura 3 -	Estado flácido onde não há compressão do plexo venoso.....	21
Figura 4 -	Compressão do plexo venoso com diminuição do efluxo sanguíneo	22
Figura 5 -	Esquema representativo da via do Óxido nítrico.....	24
Figura 6 -	Farmacologia da ereção peniana. Vias de relaxamento do corpo Cavernoso.....	26
Figura 7 -	Estrutura química do fármaco cis-[Ru(bpy) ₂ IMn(NO)] ⁺³ (RUT-BPY-IMI).....	33
Figura 8 -	Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos.....	35
Figura 9 -	Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo.....	35
Figura 10 -	Fragmento de corpo cavernoso humano banhado em Krebs.....	36
Figura 11 -	Fragmento de corpo cavernoso montado no banho de tecidos...	37
Figura 12 -	Sistema de banhos isolados.....	37
Gráfico 1 -	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT- BPY-IMI com o veículo (DMSO) em tiras de corpo cavernoso humano.....	43
Gráfico 2 -	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT- BPY-IMI com o BAY 41-2272 e SNP em tiras de corpo cavernoso humano.....	45
Gráfico 3 -	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT- BPY-IMI com a vardenafila em tiras de corpo cavernoso humano.....	46
Gráfico 4 -	Gráfico em barras comparando o E _{MAX} das duas substâncias (Vardenafila X RUT-BPY-IMI).....	47
Gráfico 5 -	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT- BPY-IMI na contração realizada por Fenilefrina com K ⁺ 80mM em tiras de corpo cavernoso humano.....	48
Gráfico 6 -	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT- BPY-IMI com o fármaco acrescentado ao L-NAME em tiras de	

	corpo cavernoso humano.....	49
Gráfico 7 –	Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada ao ODQ (30µM) em tiras de corpo cavernoso humano.....	50
Gráfico 8 –	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada à Hemoglobina em tiras de corpo cavernoso humano.....	51
Gráfico 9 –	Comparação do relaxamento máximo alcançado pela droga isolada e quando associada à hemoglobina.....	52
Gráfico 10 –	Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada à glibenclamida em tiras de corpo cavernoso humano.....	53
Gráfico 11 –	Concentração de GMPc medido nos grupos expostos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância one-way
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
CCH	Corpos Cavernosos de Humano
CNP	Peptídeo Natriurético do tipo C
CONEP	Conselho Nacional de Saúde
DE	Disfunção Erétil
DMSO	Dimetil Sulfóxido
E _{MAX}	Percentual Máximo de relaxamento induzido pela substância
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase endotelial
GCp	Enzima Guanilato ciclase particulada
GCs	Enzima Guanilato ciclase solúvel
Glib	Glibenclamida
GMPc	Monofosfato de Guanosina Cíclico
GNSO	S-nitroso-glutationa
GTP	Guanosina Trifosfato
HCC	Corpo cavernoso de humano
IBMX	1-methyl-3-(2-methylpropyl)-7H-purine-2,6-dione
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
IP3	inositol trifosfato
iPDE5	Inibidores da Fosfodiesterase do tipo 5
K _{ATP}	canais de íons potássio metabolicamente ativos dependentes de
ATP	Trifosfato de Adenosina
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
MMAS	Massachussets Male Aging Study
M	Molar
MS	Ministério da Saúde
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOSn	óxido nítrico síntase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

ODQ	guanilato ciclase solúvel
PDE	Fosfodiesterase específica do GMPc
pEC50	Cologaritmo da concentração da substância que provoca 50% do
efeito máximo	
PHE	Fenilefrina
PKG	Proteínoquinase
RUT-BPY-IMI	Ru(bpy) ₂ IMn(NO)] ⁺³
SNACET	S-nitroso-N acetilcisteína
SNP	Nitroprussiato de Sódio
TCA	tecido ácido tricloroacético
TXA2	Tromboxano A2
UFC	Universidade Federal do Ceará
μM	micro molar
USA	Estados Unidos da América
YC-1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Definição.....	17
1.2	Histórico.....	17
1.3	1.3 Bases anatômicas e fisiofarmacológicas da ereção	18
1.4	O papel do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso.....	22
1.5	Complexo Nitrosil-Rutênio	28
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	Geral.....	31
2.2	Específicos.....	31
3	MÉTODOS.....	32
3.1	Aspectos Éticos	32
3.2	Local do Estudo	32
3.3	Fármacos e substâncias.....	32
3.4	Material cirúrgico e laboratorial.....	34
3.5	Preparação dos corpos cavernosos.....	34
3.6	Protocolos experimentais.....	36
3.6.1	<i>Avaliação do efeito relaxante da substância RUT-BPY-IMI na musculatura lisa cavernosa de humanos.....</i>	37
3.6.2	<i>Avaliação dos efeitos relaxantes das substâncias SNP, BAY 41-2272 e Vardenafila, que já demonstraram bom efeito relaxante da musculatura cavernosa de humanos.....</i>	38
3.6.3	<i>Avaliação do fármaco RUT-BPY-IMI na contração com K^+ 80mM.....</i>	38
3.6.4	<i>Avaliação do efeito do inibidor da NO sintase sobre o relaxamento produzido e a substância RUT-BPY-IMI.....</i>	39
3.6.5	<i>Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido e pela substância do grupo nitrosil-rutênio.....</i>	39
3.6.6	<i>Avaliação do efeito inibitório da hemoglobina bovina sobre o relaxamento produzido e a substância RUT-BPY-IMI.....</i>	39
3.6.7	<i>Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K_{ATP}), glibenclamida no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI no</i>	39

	<i>tecido estudado</i>	
3.6.8	Dosagem de GMPc tecidual	40
3.7	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	43
4.1	Comparação do efeito do RUT-BPY-IMI em com o placebo (veículo) DMSO	43
4.2	Efeito relaxante do RUT-BPY-IMI, BAY 41-2272 e SNP após pré- contração com PHE (10µM) em corpo cavernoso de humano	44
4.3	Comparação da substância estudada com a Vardenafila, droga inibidora da PDE 5, e droga já utilizada no tratamento de Disfunção Erétil	46
4.4	Efeito do RUT-BPY-IMI na contração realizada com K⁺ 80mM, comparando com a ação na contração realizada por fenilefrina	47
4.5	Efeito do L-NAME (100µM) um importante inibidor da NOs no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado	48
4.6	Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel por um inibidor específico do grupo heme da enzima (ODQ;30µM) e no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado	49
4.7	Efeito do removedor extracelular de NO (hemoglobina bovina) no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI em corpos cavernosos de humano	50
4.8	Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K_{ATP}), glibenclamida (10µM) no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI no tecido estudado	52
4.9	Medição do GMPc após a exposição às substâncias estudadas	53
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE – Termo de Consentimento	72
	ANEXO – Material cirúrgico utilizado nos experimentos	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A Disfunção Erétil (DE) é um problema que afeta os homens desde a antiguidade. Até meados de 1990, era denominada por impotência sexual, porém, em 1993 após o consenso do Instituto de Saúde dos Estados Unidos da América definiu-se disfunção erétil como a incapacidade persistente de obter ou manter uma ereção peniana que possibilite a penetração vaginal e uma atividade sexual satisfatória para o casal (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT, 1993).

1.2 Histórico

Apesar de muitos acreditarem que a disfunção erétil é uma doença do homem moderno (SKETEL, 1927), os primeiros relatos de impotência datam de 2000 a.C., descrito em papiros egípcios. Na Grécia Antiga, Hipócrates descreveu muitos casos de impotência entre os habitantes ricos da província de Scythia, provavelmente devido ao hábito dos mesmos de locomoverem-se a cavalo. Os pobres não apresentavam impotência porque andavam a pé. Aristóteles descreveu três nervos que proporcionavam espírito e energia para o pênis e propôs que o mecanismo de ereção envolvia o influxo de ar para o pênis (BRENOT, 1994). Os Hindus também descreveram em 800 a.C. a disfunção erétil e já colocavam a DE como uma possível doença de cunho psicológico (HERMAN, 1973).

A fisiologia da ereção permaneceu por muito tempo obscura, sendo descrita pela primeira vez por Aristóteles que afirmava que quando o homem se inflamava de desejo o fluxo de ar deixava o pênis erétil, porém com os estudos de anatomia de Leonardo Da Vinci, foi evidenciada a presença de sangue nos corpos cavernosos de cadáveres humanos em ereção, mortos por enforcamento (BRENOT, 1994).

Em 1573, Varolio descreveu a base da fisiologia da ereção, estabelecendo que dois músculos, o isquicavernoso e o bulbocavernoso, comprimiam o bulbo do pênis, impedindo o retorno venoso do pênis (SHAH, 2002). O alemão Regnier de Graaf desenvolveu essa teoria e em 1668 ele injetou fluido dentro dos cadáveres. Quando

colocava líquido dentro da hipogástrica, o pênis imediatamente ficava ereto (SHAH, 2002).

A primeira descrição detalhada da anatomia peniana foi descrita somente em 1585, por Ambroise Pare, no livro intitulado “Livro da reprodução”. Foi também Paré que realizou a primeira descrição da fisiologia da ereção: “Quando o homem se inflama de desejo o sangue invade seu pênis e o torna ereto” (BRENOT, 1994).

Já em 1948, Kinsey, Pomeroy e Mortin mostravam a relação da idade com a DE, quando descreveu que na idade abaixo de 40 anos, apenas 1 em 40 homens apresentava algum grau de DE, enquanto 1 em cada 4 acima de 60 anos padecia do problema.

Dados modernos estimam que 55% dos homens apresentam DE na idade de 75 anos (MELMAN; GINGELL, 1999; JOHANNES; ARAÚJO; FELDMAN, 2000). Outro estudo, realizado na Massachussets Male Aging Study (MMAS), encontrou que a probabilidade do homem apresentar disfunção erétil grave aumenta de 5,1% para 15% quando a idade varia de 40 para 70 anos (JOHANNES; ARAÚJO; FELDMAN, 2000).

No Brasil, as estimativas apontam que mais de 40% dos brasileiros entre 40 e 70 anos sofram desta condição (MOREIRA, 2001) e que pelo menos um milhão de novos casos surjam por ano nesta mesma faixa etária (MOREIRA, 2002a, b).

Devido ao grande peso que essa doença representa no homem, e essa grande incidência, muitos pesquisadores tem buscado entender a fisiopatologia da doença, estudando novas modalidades terapêuticas e fármacos eficazes para o tratamento da disfunção erétil.

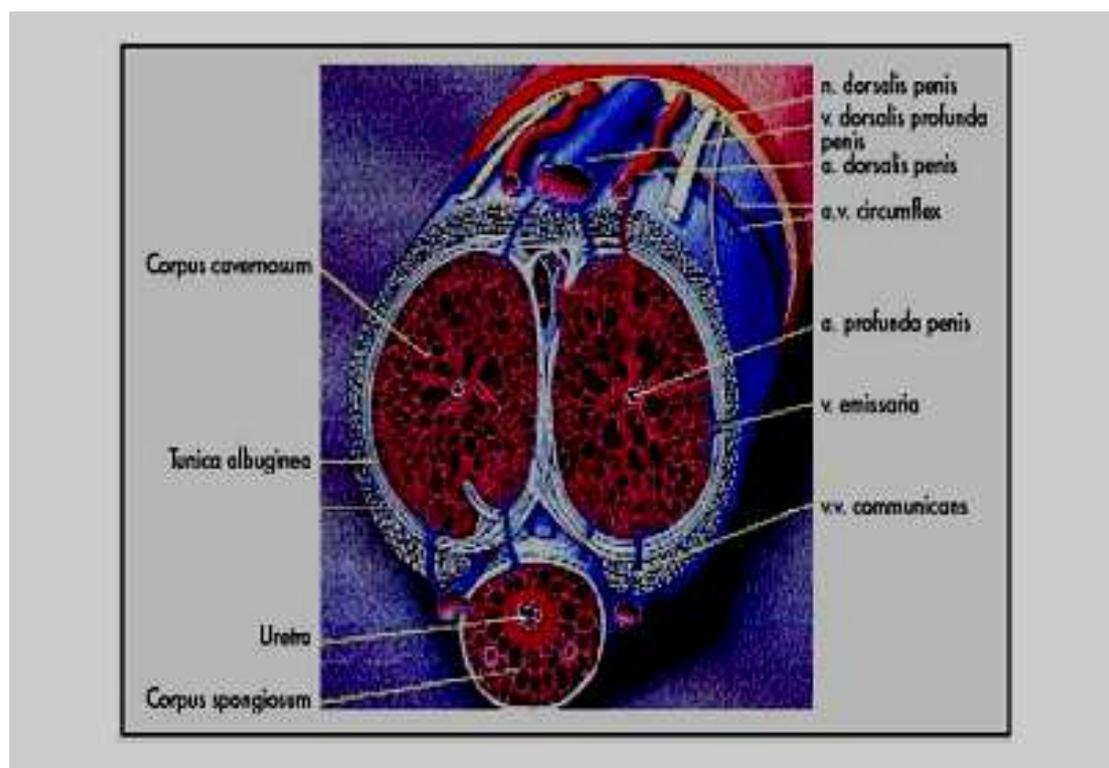
1.3 Bases anatômicas e fisiofarmacológicas da ereção

O pênis, de maneira grosseira, é composto de três corpos separados por septos de tecido conjuntivo. Um corpo esponjoso único que sustenta e protege a uretra ao longo da superfície ventral do pênis e forma a glândula distalmente. Dois corpos cavernosos paralelos, que se estendem ao longo da superfície dorsal do pênis, que além de prover estrutura para o pênis funciona como um reservatório de sangue no estado erétil (Figura 1). Os corpos cavernosos são envoltos por uma camada fibrosa, túnica albugínea (ANDERSSON; WAGNER, 1995). Compreendem uma rede de sinusóides supridos pelas artérias helicinais, que são ramos terminais das artérias cavernosas. No estado flácido, as trabéculas do

músculo liso dos corpos cavernosos, os quais sustentam os sinusóides vasculares, estão tonicamente contraídos e permitem apenas uma pequena quantidade de influxo arterial (BURNETT *et al*, 1992). A liberação de neurotransmissores de terminais dos nervos cavernosos e do endotélio em resposta a estimulação sexual resulta em relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e ereção peniana.

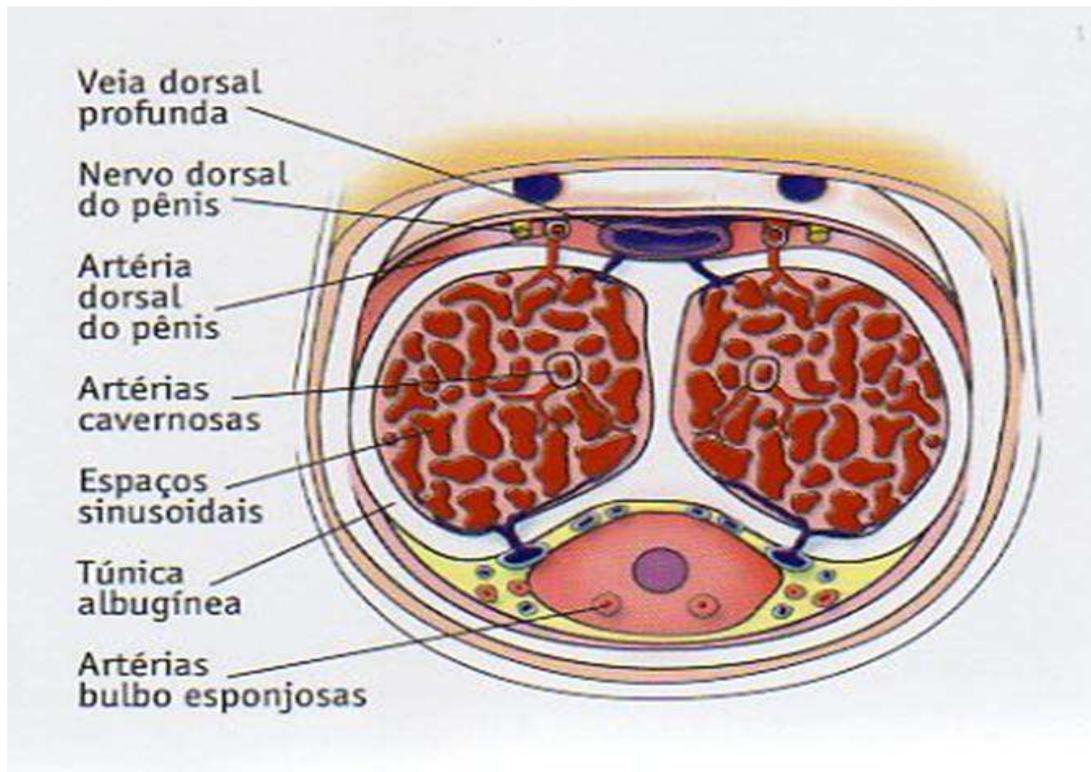
O suprimento arterial é dado pelos ramos terminais das artérias cavernosas (artérias helicinais) que são ramos da artéria pudenda interna, após se bifurcarem em artéria peniana comum (BURNETT *et al*, 1992). Já a drenagem venosa é realizada por pequenas veias formadas dentro do corpo cavernoso, abaixo da túnica albugínea, elas se unem para formar a veia dorsal profunda que em última instancia forma a veia pudenda interna (LUE, 2002)(Figura 2).Essa distribuição é importante para a manutenção da ereção.

Figura 1 – Estrutura do corpo pênis



Fonte: Lue et al. (2002).

Figura 2 – Suprimento arterial e drenagem venosa dos corpos cavernosos



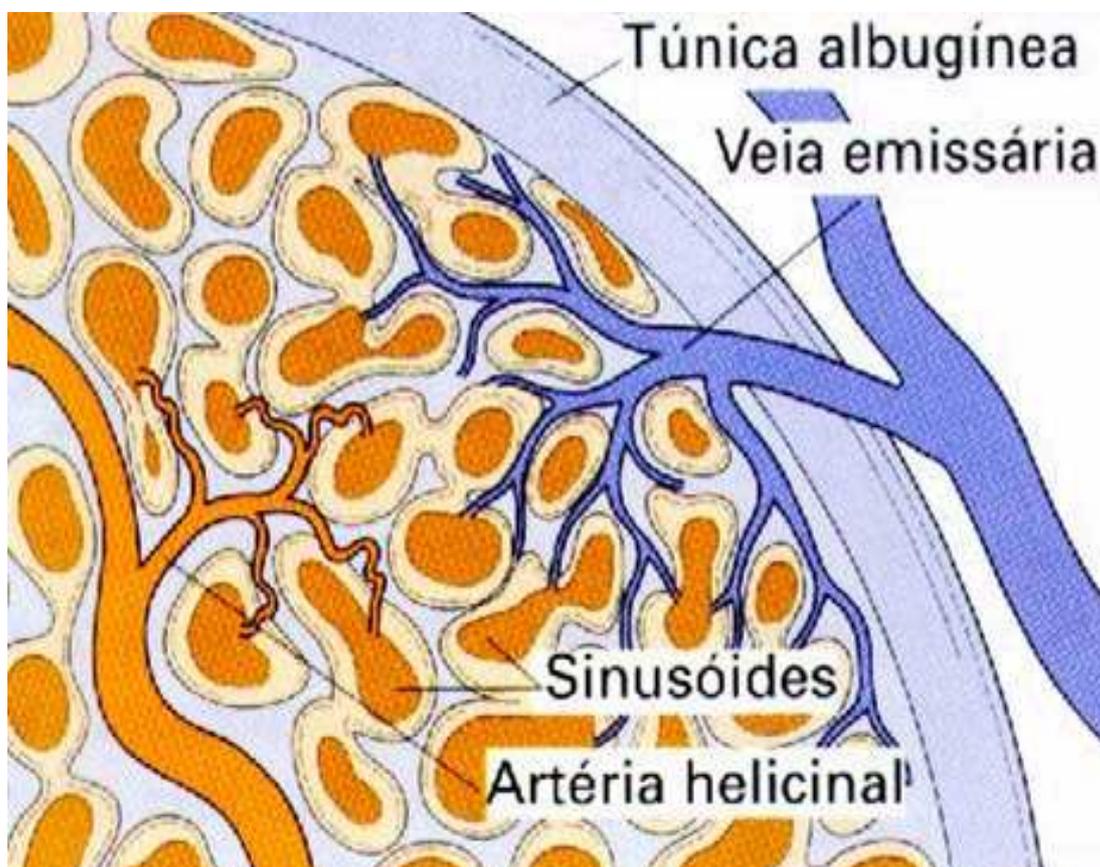
Fonte: Glina *et al.* (2002)

A inervação peniana pode ser dividida em autonômica (simpática e parassimpática) e somática (sensitiva e motora) (LUE,2002). A inervação sensitiva inicia em receptores da pele, principalmente na glândula, mas também no pênis, uretra e corpo cavernoso, o nervo sensitivo principal é o nervo dorsal do pênis que se une a outros nervos pélvicos, formando o nervo pudendo interno. Esses feixes nervosos entram na região sacral e sobem pelo feixe espino-talâmico até o tálamo e córtex sensitivo. A inervação simpática advém do plexo hipogástrico, seus neurônios liberam noradrenalina e mantêm a fase de flacidez peniana. A inervação parassimpática inicia-se na medula sacral, liberam acetilcolina, e em última instância, liberam Óxido Nítrico (NO) e GMPc, responsáveis pela fase erétil (LUE, 2002).

A função erétil normal envolve três processos sinérgicos e simultâneos: um aumento no influxo arterial no pênis, o qual é mediado neurologicamente, relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos e restrição do retorno venoso a partir do pênis (BIVALACQUA *et al.*, 2000). Mais especificamente, 6 mecanismos são implicados em uma ereção eficaz: 1- Inicialmente ocorre uma dilatação das artérias cavernosas e

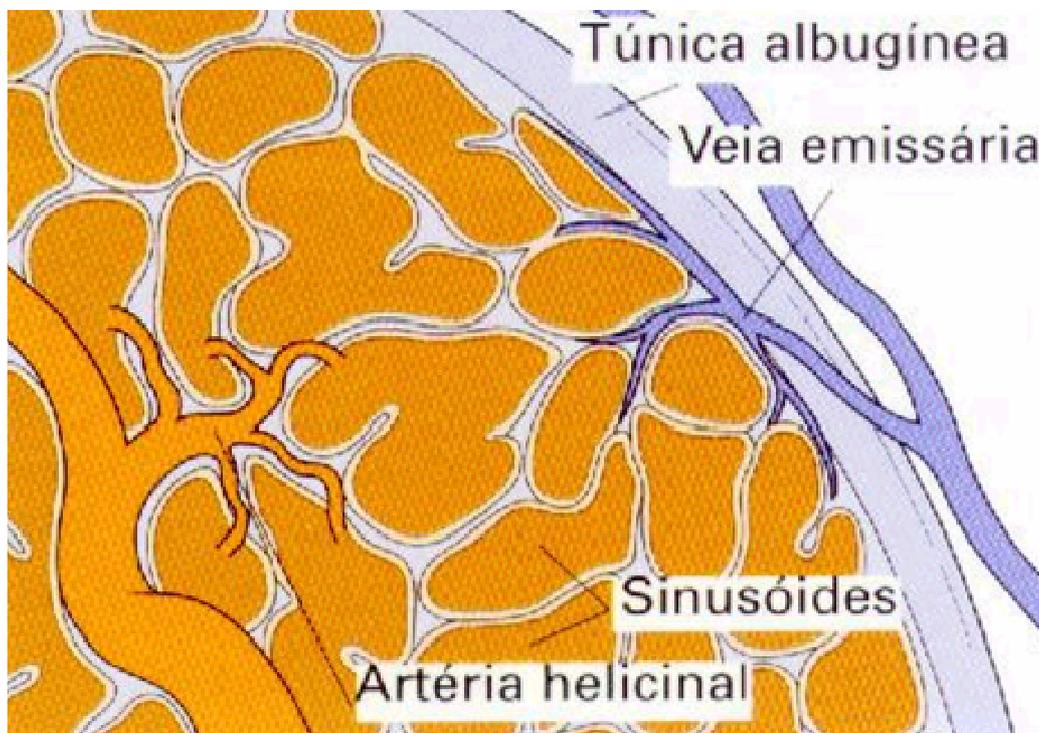
arteríolas, com aumento do fluxo sanguíneo na fase sistólica e diastólica; 2- a seguir ocorre um represamento do sangue dentro dos sinusóides do corpo cavernoso; 3- contração do plexo venoso sobre a túnica albugínea, reduzindo o efluxo venoso (Figuras 3 e 4); 4- estiramento da túnica albugínea até a sua capacidade máxima, reduzindo ao mínimo a saída de retorno venoso ao mínimo; 5- Aumento da pressão intracavernosa para 100mmHg (alcançando a ereção plena); 6- Contração do músculo ísquio-cavernoso (LUE, 2002).

Figura 3 – Estado flácido onde não há compressão do plexo venoso



Fonte: Glina *et al.* (2002)

Figura 4 – Compressão do plexo venoso com diminuição do efluxo sanguíneo



Fonte: Glina *et al.* (2002)

1.4 O papel do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso

A fisiofarmacologia da ereção ficou muito tempo desconhecida e o papel do relaxamento do corpo cavernoso era atribuído à acetilcolina. Em 1980, Furchgott e Zawadzki mostraram em um trabalho muito bem desenhado, em tiras de aorta de coelho, que a acetilcolina só causava relaxamento da musculatura lisa na presença de células endoteliais, que quando as tiras eram tratadas para a retirada das células endoteliais não relaxavam na presença de acetilcolina. Nesse trabalho, foi sugerida a presença de um fator de relaxamento de origem endotelial.

Em 1987, já estava bem estabelecida a presença de um Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio, porém, ainda, não se sabia que molécula era responsável por esse efeito. Havia sido sugerido por Furgott que esse fator de

relaxamento poderia ser o óxido nítrico. Palmer *et al* (1987), em um trabalho utilizando, em um sistema de perfusão em cascata, cultura de células endoteliais de suínos como doadores e tiras de aorta de coelho montadas em espiral (retiradas o endotélio) como receptor, demonstrou que a atividade biológica do óxido nítrico e do Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio são idênticas e sugere que a natureza química do Fator de Relaxamento era mesmo óxido nítrico como sugerido anteriormente por Fuchgott (PALMER *et al*, 1987).

A descoberta do óxido nítrico como fator de relaxamento, e neurotransmissor de fibras não-adrenérgicas não colinérgicas, torna este mediador um candidato potencial a principal neurotransmissor envolvido na ereção peniana (IGNARRO *et al*, 1992). Estudando corpos cavernosos de coelho, Ignarro *et al*, em 1990, descobriram que o óxido nítrico via ativação da guanilato ciclase solúvel era responsável pelo relaxamento da musculatura lisa cavernosa. Em 1992, esse mesmo autor estudando tecidos humanos retirados em cirurgias de prótese peniana, colocados em banhos para estudo de tecidos *in vitro*, conseguiu definir, em corpos cavernosos estimulados eletricamente, que o óxido nítrico é o principal mediador da ereção também em humanos. A ativação da guanilato ciclase solúvel pelo óxido nítrico e nitrovasodilatadores já havia sido provada em 1977 pelo grupo do professor Ferid Murad na época trabalhando no Departamento de Farmacologia da Universidade da Virginia em Charlottesville, VA, USA (ARNOLD *et al*, 1977).

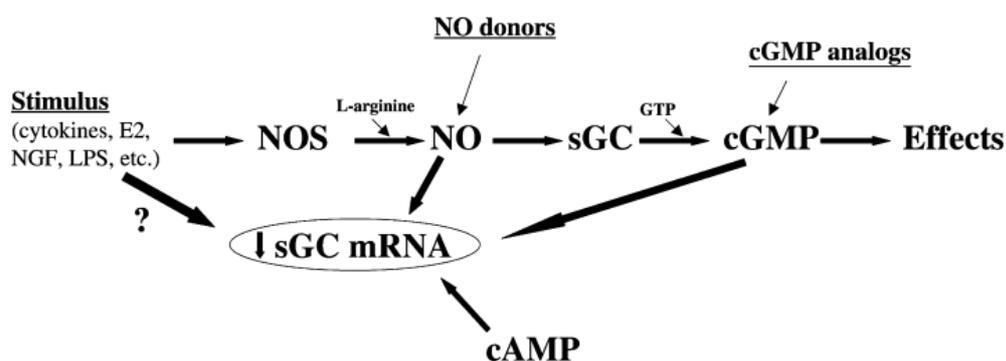
Ainda em 1992, Burnett *et al* demonstraram através de estudos com imunohistoquímica a presença de Óxido Nítrico Sintase (NOS) em corpos cavernosos de ratos, demonstrando e definindo a via da NOS como a principal via no relaxamento do corpo cavernoso.

Atualmente, os pesquisadores concordam que o óxido nítrico, liberado através das fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas, é o principal neurotransmissor responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, aumentando a produção do GMPc (IGNARRO *et al*, 1990; BURNETT *et al*, 1992).

A produção de óxido nítrico é realizada por uma enzima chamada Óxido Nítrico Sintase (NOS). Existem pelo menos 3 isoformas da NOS. A primeira é a NOS1(nNOS), produzido nos neurônios e tem como papel principal o neurotransmissor. A segunda isoforma é a NOS 2 (iNOS) produzida por células como macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas, e é induzida por processo inflamatório, como

resposta citotóxica, sendo ativada independente do cálcio. A terceira forma é a NOS 3 (eNOS), essa forma é a enzima que produz o fator de relaxamento endotelial (NO), (BURNETT *et al*, 1992; MURAD, 2004), (Figura 5). A síntese de óxido nítrico, com estímulo neuronal, a partir da arginina sob a ação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) e sua ligação com a enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) constitui passo essencial para o início e manutenção do processo erétil (HEDLUND *et al*, 2000).

Figura 5 – Esquema representativo da via do Óxido nítrico

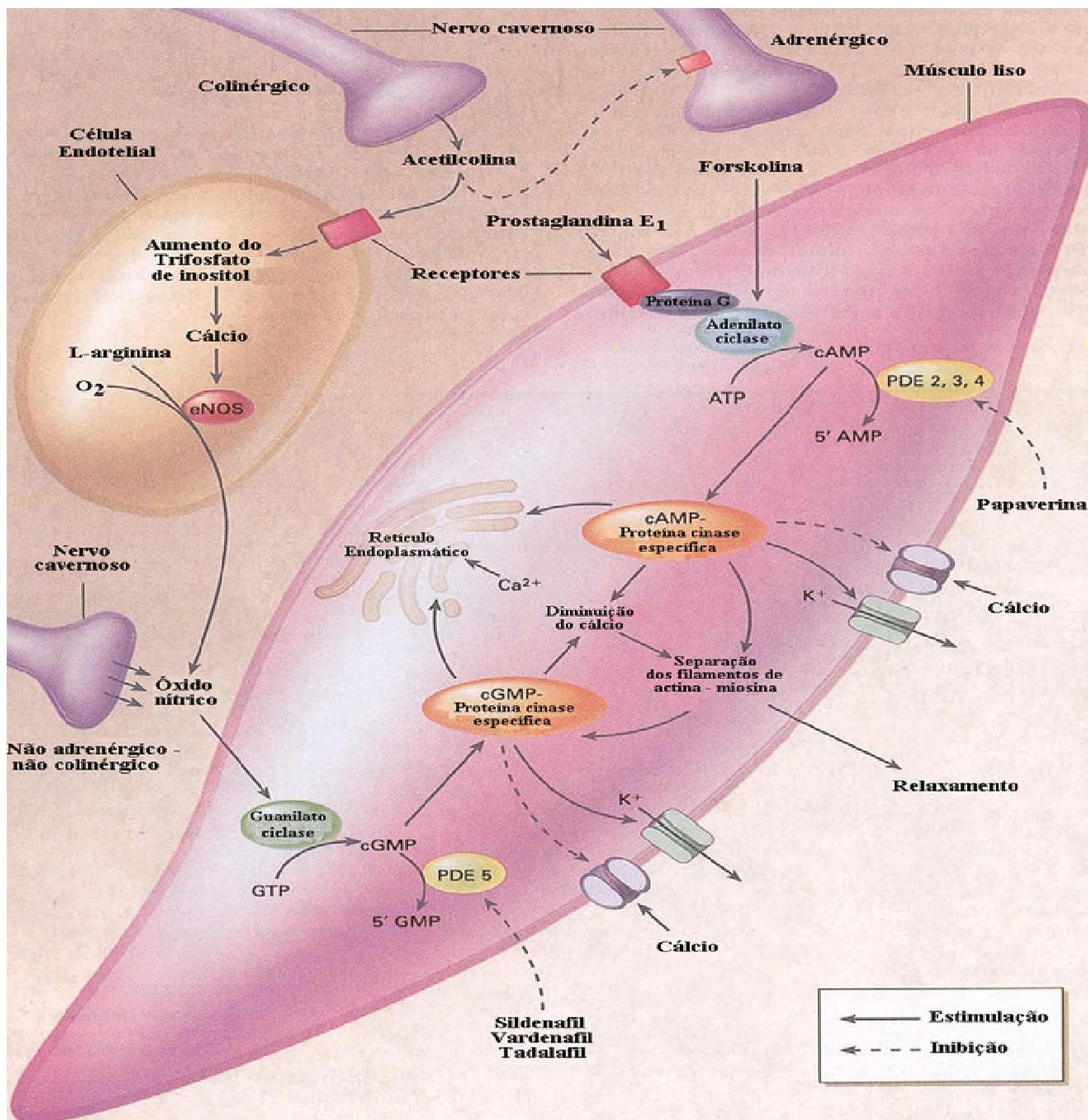


Fonte: Murad (2004).

O relaxamento da musculatura lisa cavernosa é realizado através do sistema nucleotídeo cíclico intracelular/proteinoquinase mensageiro. Dois sistemas são implicados no relaxamento: o sistema do AMPc e do GMPc, esse último ativado pela guanilato ciclase solúvel, e a principal via de relaxamento do corpo cavernoso. Esta enzima atua em alvos intracelulares, fosforilando receptores de inositol trifosfato (IP3), ativando canais de íon potássio, causando hiperpolarização celular e diminuindo o transporte de íons cálcio para o citosol. Estes eventos provocam inativação da enzima miosina quinase de cadeia leve levando à dissociação das fibras de actina e miosina o que apresenta como resultado final o relaxamento da musculatura lisa cavernosa, aumento do influxo sanguíneo e ereção (CORBIN; FRANCIS, 1999; ANDERSON, 2011), (Figura 5).

Os principais mecanismos de relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano são o balanço da concentração do GMPc, tanto para o aumento da sua produção, quanto a diminuição da sua degradação. O primeiro mecanismo será descrito adiante, com o uso de drogas doadoras de óxido nítrico, ou por ativação direta da Guanilato-ciclase solúvel. A degradação de GMPc e AMPc é realizada por uma enzima chamada de Fosfodiesterase, que realiza uma reação de hidrólise desses sinalizadores, diminuindo sua concentração intracitoplasmática. Essa enzima foi inicialmente descoberta por Berthet, Sutherland e Rallem 1957. Existem mais de 11 famílias e mais de 50 isoformas da fosfodiesterase, e elas estão presentes em muitas células do corpo humano (ANDERSSON, 2011). No corpo cavernoso humano já foram descobertas pelo menos 13 isoformas, porém a PDE5 é mais estudada, e encontra-se em altas concentrações citoplasmáticas (KÜTHE, 1999; ANDERSSON, 2011).

Figura 6 –Farmacologia da ereção peniana. Vias de relaxamento do corpo Caveroso



Fonte: Lue (2002).

A PDE5 é a fosfodiesterase de maior interesse, e a mais utilizada terapeuticamente. É uma enzima formada por duas subunidades idênticas, com cerca de 100000 Da cada uma, com um sítio catalítico em cada subunidade (CORBIN 2004;

FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010). Os inibidores de PDE5, como o Sildenafil, agem competindo com o GMPc por esses sítios, sendo que essas drogas possuem até 1000 vezes mais afinidade pelo sítio que o GMPc. Na ausência da via do NO, essas drogas são ineficazes *in vivo* nas doses terapêuticas convencionais, e em tiras de corpo cavernoso *in vitro*, em concentrações nanomolares estas drogas potenciam tanto o efeito de NO endógeno (liberado do endotélio por ação da acetilcolina por exemplo ou dos nervos por estimulação elétrica transmural) como exógeno (nitrovasodilatadores, por exemplo). No entanto, os mesmos só provocam relaxamento direto em concentrações micromolares a milimolares o que confirma presença de um tônus nitrérgico basal em tiras pré-contraídas com estímulo adrenérgico (CORBIN, 2004).

A ativação da GCs é uma forma de estimular o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano, sendo essa enzima expressada por todo tipo de células (LUCAS *et al*, 2000). Existem dois tipos de guanilato ciclases: a solúvel e particulada. A guanilato ciclase particulada (GCp) é um subgrupo de enzimas de membranas responsáveis pela sinalização da célula, e baseado nos seus ligantes pode ser classificada em: Receptores Peptídeo Natriurético, receptores ligadores do peptídeo intestinal, e receptores “Orphan” (LUCAS *et al*, 2000). Já a GCs é uma enzima que é encontrada no citosol da célula, e seus ligantes são: NO/CO, protoporfirina IX, mecanismo catalítico, e cátions divalentes (LUCAS *et al*, 2000). O principal ligante endógeno da GCs é o NO de origem endotelial e neuronal e compostos exógenos como o CO. A guanilato ciclase de membrana é ativada por peptídeos natriuréticos (SOUSA *et al.*, 2010; ANDERSSON, 2011). Dois tipos de Peptídeos Natriuréticos se mostraram importantes no relaxamento do corpo cavernoso de humanos: o Peptídeo Natriurético do tipo C (PNC) e o Peptídeo Natriurético Atrial (PNA). Em um estudo realizado em CCH, foi demonstrado que tanto o PNA como a uroguanilina tiveram um efeito relaxante em tiras de CCH, relacionados a mecanismos tanto da GC como canal de Kca dependente, sugerindo que os receptores natriuréticos podem ser novos alvos para drogas para DE (SOUSA *et al.*, 2010).

Outras duas drogas que agem diretamente na ativação da GCs foram implicadas no relaxamento do CCH. A YC-1 age aumentando alostericamente a afinidade do GTP no seu sítio, com aumento da concentração do GMPc (MÜLSCH *et al*, 1997; FRIEBE; KOESLING, 1998). Essa droga demonstrou *in vitro* um aumento de 2200 vezes da GCs, na presença de SNP (doador de NO) (LEE; MARTIN; MURAD,

2000), e *in vivo*, quando administrada intracavernosa, demonstrou efeitos eréteis, além de aumento do estímulo do nervo cavernoso (MISUZAWA *et al*, 2002). Um derivado da pirazolopiridina, BAY41-2272, também estimula diretamente a GCs de forma independente do NO, causando relaxamento de tiras de corpo cavernoso (KALSI *et al*, 2003). Esse efeito é maior na presença de um doador de óxido nítrico principalmente após a administração intravenosa e oral em coelhos conscientes (BISCHOFF *et al*, 2003).

Outros fármacos que promovem relaxamento do corpo cavernoso são os doadores de óxido nítrico. Estudos iniciais realizados em hipocampo de ratos, Wieraszko *et al* (2001) avaliaram a geração de potenciais de ação provocados por doadores de NO nesta região anatômica. Os autores demonstraram que a ação destas substâncias depende da liberação de óxido nítrico pela ação de um agente redutor e que a incubação de tecidos com oxihemoglobina, um removedor extracelular de NO, elimina os efeitos neurofisiológicos destas substâncias (WIERASZKO *et al*, 2001). Por causa da meia vida excessivamente curta, a ação de NO em sistemas biológicos é de duração muito limitada, além do que, sua degradação fotoquímica e liberação de cianeto com efeitos tóxicos importantes limita seu uso clínico, além de serem menos efetivos quando dados intracorpóreo (MARTINEZ-PINEIRO; LOPEZ TELLO *et al*, 1995; MARTINEZ-PIÑEIRO; CORTE *et al*, 1998).

Recentemente, novos compostos doadores de NO que apresentam maior estabilidade química e menor toxicidade tem sido objeto de pesquisa. Um grupo destas substâncias, S-nitroso-glutationa (GNSO) e S-nitroso-N acetilcisteína (SNACET), foi utilizada em estudos com tiras de corpos cavernosos humanos montados em sistemas de banhos isolados e apresentaram um promissor potencial de relaxamento tecidual (SEIDLER *et al*, 2002).

1.5 Complexo Nitrosil-Rutênio

Outro grupo de doadores de NO, que têm como metal o rutênio, são solúveis em água e liberam NO principalmente sob a ação de agentes redutores, foi utilizado para avaliar seu potencial de relaxamento no endotélio vascular. Estas substâncias são quimicamente estáveis e solúveis em água, o que favorece sua utilização em sistemas biológicos animais (BONAVENTURA *et al*, 2007; LUNARDI, 2009).

Comparados com outros compostos doadores de NO, essas substâncias tem a vantagem de agirem especificamente nos seus alvos. (LUNARD, 2009). Utilizando aorta de rato estes pesquisadores demonstraram potente efeito relaxante do endotélio vascular por parte deste grupo de doadores de NO. Utilizando anéis de aorta de camundongo estes autores demonstraram que essas substâncias promoviam um relaxamento vascular semelhante ao relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio. A pesquisa demonstrou também que as substâncias promoviam liberação de NO intracelular, ativava a enzima guanilato ciclase solúvel e ao contrário do nitroprussiato sódico que atua apenas através da liberação de óxido nítrico livre, estas substâncias também promovem liberação do ânion nitroxil o que pode potencializar um efeito relaxante adicional. Um mecanismo de ação adicional, utilizado por estas substâncias, consiste na ativação de canais de potássio. Em estudo realizado por Christ (2000), este autor identificou, em corpos cavernosos humanos, a importância da ativação de canais de potássio no relaxamento daquela estrutura tecidual. Este autor demonstrou que os principais tipos de canais de K^+ envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa eram canais sensíveis ao cálcio (K^+_{ca}) e canais de potássio ativados metabolicamente (K_{ATP}). Em estudos realizados por Venkateswarlu *et al* (2002), demonstrou-se que o relaxamento da musculatura lisa de corpos cavernosos humanos poderia ser potencializado, por ativadores de canais de potássio sensíveis ao movimento transmembrana de cálcio (K_{Ca}). Em outro estudo desenvolvido por Prieto *et al* (2006), os autores demonstraram que o bloqueio de canais de potássio ativados metabolicamente (K_{ATP}) por um inibidor específico, glibenclamida, reduzia significativamente o relaxamento produzido em artérias de resistência peniana pelo inibidor específico da PDE-5, citrato de sildenafil. Vários estudos tem documentado que moduladores dos canais de K^+ e ativadores dos canais de K_{ATP} , produzem o relaxamento de musculatura lisa de CCH (ANDERSSON, 2001). Apesar da ativação de K_{ATP} estarem envolvidos na ação da Iombina (FREITAS *et al*, 2009) e Fentolamina (GONZAGA-SILVA *et al*, 2005) no corpo cavernoso, a importância da contribuição desses canais ainda não foram definidas. (ANDERSSON, 2011). No estudo com anéis de aorta de coelho, de Bonaventura *et al*. (2007), a incubação dos tecidos com um bloqueador inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio, reduziu significativamente o relaxamento induzido pelas substâncias do complexo nitrosil-rutênio. Em outro estudo, utilizando aorta de coelhos. Bonaventura *et al* (2007)

demonstraram que um novo doador de óxido nítrico do complexo age doando tanto NO, como NO-(ânion nitrosil), enquanto o SNP age somente NO⁰, além disso, esse mecanismo não envolve a ativação retículo sarcoplasmático. Novas drogas, com composições químicas semelhantes, tem sido implicadas em relaxamento de músculo liso de corpo cavernoso. Cerqueira *et al* (2008), em um estudo com corpo cavernoso de coelho e tiras de aorta, demonstrou que dois novos compostos do complexo nitrosil rutênio são potentes drogas vasodilatadores, e uma das duas drogas produziam um importante relaxamento no corpo cavernoso, comparável ao SNP. Um efeito adicional dessas substâncias foi que, quando adicionada a glibenclamida, este produziu um efeito redutor e potencializou relaxamento máximo da substância (Cerqueira *et al*, dados não publicados). Várias moléculas são produzidas adicionando radicais a esse núcleo de rutênio.

Esses achados demonstram a variedade de mecanismos envolvidos na ação destas substâncias e justifica a realização de estudos adicionais para avaliar seu potencial terapêutico. A realização de novos experimentos, com a adição de outros radicais ao núcleo de rutênio, pode trazer melhora na potência e no relaxamento máximo alcançado por essas substâncias. Além disso, a realização de experimentos em corpos cavernosos humanos pode aproximar esses resultados ao efeito alcançado *in vivo*. Esses compostos podem produzir no futuro fármacos importantes para o tratamento da DE. Portanto, a determinação do mecanismo de ação desse composto pode facilitar os futuros estudos *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a capacidade de relaxamento do composto cis-[Ru(bpy)₂IMn(NO)]⁺³ (RUT-BPY-IMI), na musculatura lisa de corpo cavernoso de humano.

2.2 Específicos

- Identificar os mecanismos envolvidos no relaxamento produzido pelo fármaco cis-[Ru(bpy)₂IMn(NO)]⁺³ (RUT-BPY-IMI);
- Caracterizar a atuação desse composto no sistema de sinalização celular L-arginina/NO/GMPc;
- Comparar o efeito do RUT-BPY-IMI com outros compostos de capacidade de relaxamento de corpo cavernoso já conhecido;
- Determinar a quantidade de GMPc tecidual produzido pela ação do fármaco no processo de relaxamento;
- Avaliar a ação do RUT-BPY-IMI em canais de potássio dependentes de ATP.

3 MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa, antes de sua execução foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), credenciado pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP)/ Ministério da Saúde (MS), e foi aprovado sob o Protocolo 38/10 e na reunião do Comitê de Ética do dia 31 de agosto de 2006, sob o registro 186/06, em continuação ao projeto anterior e só foi executado após sua aprovação. Foram seguidas as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos da resolução 196-96 de 10 de outubro de 1996 do CONEP/MS. Os corpos cavernosos foram retirados de doadores não-vivos, vítimas de traumatismo crânio-encefálico, já doadores de outros órgãos para transplante. Durante a abordagem do candidato a doador, a família foi abordada para a possibilidade de doação do corpo cavernoso, através de termo de consentimento livre e esclarecido específico.

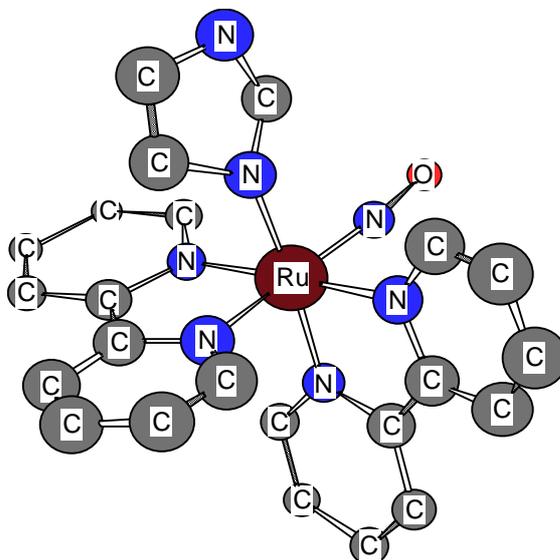
3.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado nas instalações do instituto de ciências biomédicas da Universidade Estadual do Ceará- UECE.

3.3 Fármacos e substâncias

A substância a ser testada é um derivado do complexo rutênio e sua fórmula química é $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{IMn(NO)]}^+3(\text{RUT-BPY-IMI})$.

Figura 7 – Estrutura química do fármaco cis-[Ru(bpy)2IMn(NO)]⁺3 (RUT-BPY-IMI)



A substância foi sintetizada no laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará conforme técnica descrita por Lopes, Wieroszko e El-Sherif (2001).

A solução de Krebs-Henseleit, com pH ajustado para 7,4, é utilizada na seguinte composição (em mM): NaCl 118,00; NaHCO₃ 25,00; KCl 4,70; KH₂PO₄ 1,20; MgSO₄.7H₂O 1,17; CaCl₂.2H₂O 2,50; e glicose 5,60. A solução foi preparada 24 horas antes dos procedimentos sem Ca⁺⁺ e glicose que eram adicionados à solução momentos antes dos experimentos.

Outras substâncias utilizadas foram KCl 100M (Cristália BRA) Fenilefrina (PHE) (Sigma EUA), Nitroprussiato de Sódio (SNP, Sigma EUA), L-NAME (Sigma EUA), ODQ (Sigma EUA), Hemoglobina Bovina (Sigma EUA), Glibenclamida (Glib) (Sigma EUA), BAY 41-22 (Sigma EUA), Vardenafila e Kit Elisa cGMP (Cayman EUA).

3.4 Material cirúrgico e laboratorial

O material cirúrgico e laboratorial utilizados são discriminados no apêndice 2

3.5 Preparação dos corpos cavernosos

Trata-se de pesquisa *in vitro* utilizando-se corpo cavernoso de doador cadáver obtido no momento da captação de órgãos para transplante, obedecendo-se os rigores das leis específicas.

Corpo Cavernoso Humano– segmentos de 1 – 2cm de corpos cavernosos foram retirados do doador cadáver de Múltiplos órgãos através da mesma incisão xifopubiana ao fim da cirurgia, após consentimento da família e liberação através termo próprio, como descrito por Regadas *et al* (2010). O fragmento do corpo do corpo cavernoso foi colocado em solução preservadora de Collins e resfriado a 4°C. Os experimentos foram realizados em duas etapas: com 12 horas e após 36 horas. Esse intervalo de tempos era dado devido à capacidade limitada pelo número de banhos. As tiras de corpo cavernoso foram preparadas no dia do experimento, com dissecação e retirada dos tecidos adjacentes, como túnica albugínea e vasos. Havia sempre o cuidado de banhar constantemente o tecido com a solução Krebs. O tamanho dos fragmentos eram de 1,0cmx0,3cmx0,3cm.

No total, foram captados os corpos cavernosos de 18 doadores. Cada fragmento retirado do doador produzia cerca de 10 fragmentos. Os doadores tinham entre 18 e 55 anos, e geralmente foram vítima de traumatismo crânio-encefálico (somente 1 paciente foi vítima de hemorragia subaracnóidea).

Figura 8 – Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos



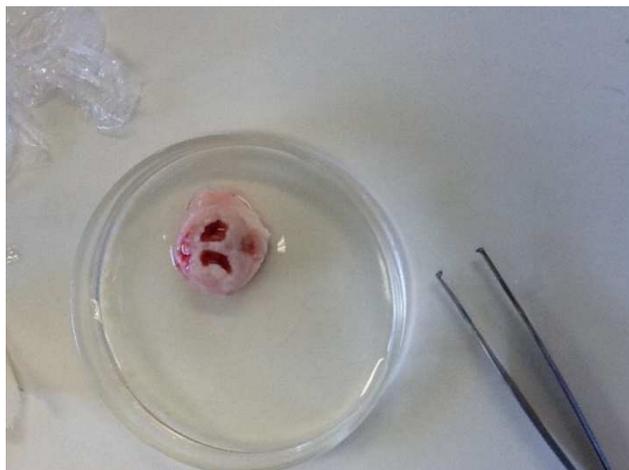
Fonte: Cedida por Regadas *et al* (2010).

Figura 9 – Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo



Fonte: Cedida por Regadas *et al* (2010).

Figura 10 – Fragmento de corpo cavernoso humano banhado em Krebs



3.6 Protocolos experimentais

Os tecidos eram suspensos em uma haste metálica, fixos em uma das extremidades do tecido. A outra extremidade era fixada com fio de algodão, e este era fixado no transdutor de força isométrica, sendo móvel e ajustado de acordo com a tensão desejada. A tensão passiva aplicada aos tecidos era de 10mN ou um grama. Os tecidos eram deixados em repouso por uma hora e a tensão era periodicamente ajustada, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. As alterações de tensão eram medidas usando-se transdutores isométricos (Panlab, Barcelona, Espanha) e registradas em sistema Protowin de aquisição de dados (Software versão 1.0.2, Panlab S.L.U). cada cuba do banho possuía 5ml, e a aeração era realizada com carbogênio (95% CO₂ + 5% O₂).

Figura 11 – Fragmento de corpo cavernoso montado no banho de tecidos

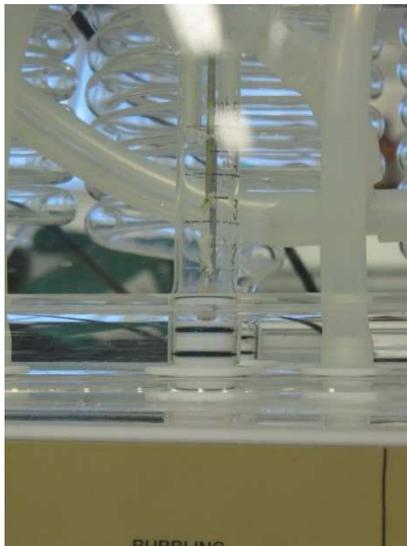


Figura 12 – Sistema de banhos isolados



3.6.1 Avaliação do efeito relaxante da substância RUT-BPY-IMI na musculatura lisa cavernosa de humanos

Após 60 minutos de estabilização os tecidos eram contraídos com K^+ e após 15 min eram trocadas a substância nutritiva. Após um período de estabilização de mais 15 min, o fragmento de corpo cavernoso era novamente contraído, agora com fenilefrina (PHE, $10\mu M$). Os experimentos com a substância eram iniciados após a estabilização do período de contração que variava de 15 a 20 minutos. Para avaliar o relaxamento induzido pela substância estudada, eram realizadas curvas de relaxamento com concentrações crescentes da substância (10^{-9} a $10^{-4}M$) $cis-[Ru(bpy)_2IMn(NO)]^{+3}$. A

concentração do DMSO era a mesma encontrada suas respectivas concentrações do RUT-BPY-IMI.

3.6.2 Avaliação dos efeitos relaxantes das substâncias SNP, BAY 41-2272 e Vardenafila, que já demonstraram bom efeito relaxante da musculatura cavernosa de humanos

Após 60 minutos de estabilização os tecidos eram contraídos com K^+ 80mM e após 15 min eram trocadas a substância nutritiva. Após um período de estabilização de mais 15 min, o tecido era novamente contraído, agora com fenilefrina (PHE, 10 μ M). Os experimentos com a substância eram iniciados após a estabilização do período de contração que variava de 15 a 20 minutos. Para avaliar o relaxamento induzido pelos fármacos estudados, eram realizadas curvas de relaxamento com concentrações crescentes das substâncias: SNP (10^{-12} M a 10^{-6} M); BAY 41-2272 (10^{-9} a 10^{-4} M); e Vardenafila (10^{-12} a 10^{-6} M).

3.6.3 Avaliação do fármaco RUT-BPY-IMI na contração com K^+ 80mM

Após 60 minutos de estabilização os tecidos eram contraídos com uma solução de KCl com 80mM e após 15 min era trocada a substância nutritiva. Nesse experimento, o objetivo era observar o efeito da substância na contração com a substância despolarizante. Os experimentos com a substância eram iniciados após a estabilização do período de contração que variava de 15 a 20 minutos.

3.6.4 Avaliação do efeito do inibidor da NO sintase sobre o relaxamento produzido e as substância RUT-BPY-IMI

Após a contração com K^+ , eram esperados 15min após a lavagem do banho com a solução de Krebs para que os tecidos retornassem à tração de repouso. Neste ensaio o L-NAME (100 μ M), um inibidor da NOS, foi adicionado aos banhos 30 minutos antes da adição de fenilefrina (10 μ M). Após a estabilização do período de contração, curvas-resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância eram obtidas.

3.6.5 Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido e pela substância do grupo nitrosil-rutênio

Após a contração com K^+ para estabilização do tecido e lavagem com solução de Krebs, adicionou-se o inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ) na concentração de 30 μ M aos banhos, trinta minutos antes da pré-contração com fenilefrina (10 μ M). Subsequentemente foram obtidas curvas resposta de relaxamento com concentrações crescentes das substâncias.

3.6.6 Avaliação do efeito inibitório da hemoglobina bovina sobre o relaxamento produzido e a substância RUT-BPY-IMI

Após a contração com K^+ eram esperados 15min após a lavagem do banho com a solução de Krebs os tecidos retornarão à tração de repouso. Neste experimento a hemoglobina bovina (30 μ M), um removedor extracelular do NO, foi adicionado aos banhos 30 minutos antes da adição de fenilefrina (10 μ M). Após a estabilização do período de contração, curvas-resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância eram obtidas.

3.6.7 Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K_{ATP}), glibenclamida no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI no tecido estudado

Após a contração com K^+ 80mM eram aguardados 15min após a lavagem do banho com a solução de Krebs os tecidos retornarão à tração de repouso. Nesse experimento a glibenclamida ($10\mu M$), foi adicionada aos banhos 30 minutos antes da adição de fenilefrina ($10\mu M$). Após a estabilização do período de contração, curvas-resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância eram obtidas.

3.6.8-Dosagem de GMPc tecidual

Em presença de IBMX ($100\mu M$), inibidor inespecífico da fosfodiesterase, responsável pela degradação de GMPc, foram realizados os seguintes protocolos.

1. Medida de GMPc basal

Após o período de estabilização, aproximadamente 1 hora, as tiras de corpos cavernosos submetidos à exposição por DMSO foram congelados em nitrogênio líquido.

2. Medida de GMPc após a exposição aos doadores de NO

Após o período de realização dos experimentos com os fármacos RUT-BPY-IMI e SNP, e alcançados o E_{MAX} das substâncias, e após um período de estabilização de cerca de 20min, os tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram mantidas a $-20^{\circ}C$ até o dia do experimento.

3. Homogeneização do tecido e dosagem de proteínas

O tecido congelado foi homogeneizado em solução de Krebs gelado e adicionado ao IBMX ($100\mu M$). Após completa maceração do tecido, alíquotas de todas as amostras foram separadas para dosagem de proteínas pelo método de Folin Ciocalteau.

4. Preparação da amostra

Foi adicionado ao macerado de tecido ácido tricloroacético (TCA) (resultando em uma concentração final do TCA de 10%). O TCA foi utilizado para precipitar proteínas e após a adição do TCA, as amostras foram agitadas e posteriormente centrifugadas a 2000 xg por 15 minutos a $4^{\circ}C$. Removemos o

sobrenadante e descartamos o precipitado. O sobrenadante foi lavado com éter dietílico saturado de água (em um volume 4 vezes maior que o volume da amostra) e a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens secamos as amostras em atmosfera de nitrogênio a 60°C e as ressuspendemos no tampão de ensaio do “kit” imunoenzimático para dosagem de GMPc. Utilizamos o método de acetilação da amostra para dosagem de GMPc, em femtomoles de GMPc por poço. Posteriormente, calculamos a concentração de GMPc por mg de tecido.

3.7 Análise estatística

O efeito relaxante das substâncias foi medido a partir do plateau de contração máxima induzida pela fenilefrina (10µM) e expresso como percentual de diminuição da contração provocada pela fenilefrina. Para construir as curvas de concentração-resposta, inicialmente fez a transformação logarítmica (base 10) das concentrações molares. As curvas foram obtidas por regressão não linear a partir dos valores médios do percentual de relaxamentos calculados para as seguintes concentrações: 10⁻¹² até 10⁻⁴M. Nesse intuito, foi utilizada a função sigmoide:

$$y = a + \frac{b - a}{1 + 10^{-(\log EC_{50} - x)}}$$

, onde a corresponde ao valor mínimo (resposta mínima), b ao valor máximo (resposta máxima). Era utilizado o fator de angulação. O efeito máximo de relaxamento (E_{MAX}) foi considerada a média de todos os experimentos, na concentração que mais causava relaxamento, induzido pelos agentes relaxantes nas curvas de concentração-resposta, descrito na seguinte expressão:

$$R = \frac{T_F - T_S}{T_F} \times 100, \text{ onde } T_F \text{ e } T_S \text{ são as tensões decorrentes da ação da fenilefrina e de uma dada substância.}$$

As concentrações dos fármacos que induziram 50% de relaxamento máximo (EC50) foram determinadas, a partir das curvas de regressão, após transformação logarítmica das curvas normais de concentração-resposta e expressas em logaritmo negativo (pEC50) dos valores de cada tecido (3-7 experimentos), utilizando regressão não-linear. Para comparar os dois grupos em relação às variáveis E_{MAX} e pEC50, utilizou-se o teste t de *Student* para variáveis não pareadas, com correção de Welch. Foi

utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 (GRAPH PAD SOFTWARE CORPORATION SAN DIEGO, CA-USA, 2007).

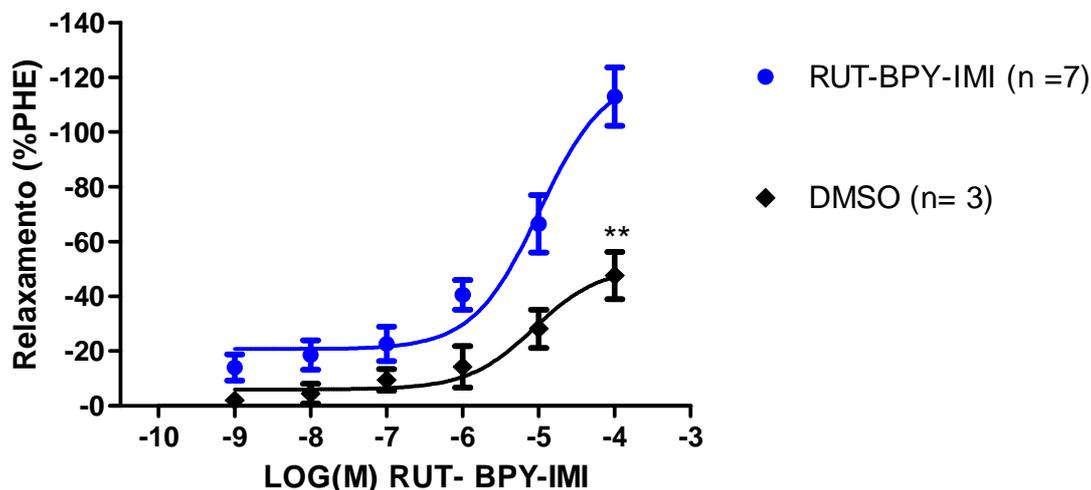
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Em cada grupo de experimentos, n significa o número de tecidos de cada doador. Diferenças entre os valores médios foram avaliados através de análise de variância one-way (ANOVA), seguida pelo teste Bonferroni's Multiple Comparison Test, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação do efeito do RUT-BPY-IMI em com o placebo (veículo) DMSO

Após a contração com PHE (10 μ M), era aguardada a estabilização da curva de contração, que se dava em cerca de 20 min. Então, eram adicionadas as drogas: DMSO, concentração inicial de 100%, e correspondente a cada concentração do RUT-BPY-IMI, e RUT-BPY-IMI em concentrações crescentes de 10⁻⁹M a 10⁻⁴M. O relaxamento máximo alcançado pelo DMSO foi de 47.60 % \pm 8.67% do platô de contração induzido pela Fenilefrina. A substância estudada alcançou um relaxamento máximo de 112,92% \pm 10,63%. A sua respectiva pEC50 (-logEC50) foi de 4,991 +/- 0,1916. Ao comparar as duas curvas, principalmente na concentração de 10⁻⁴M, viu-se uma diferença estatisticamente significativa (p<0,01) (utilizando o teste ANOVA), mostrando que a droga possui um efeito relaxante, superando em 70% o efeito máximo do veículo (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Curva Concentração-Resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com o veículo (DMSO) em tiras de corpo cavernoso humano. Média \pm EPM



***p<0,01 (RUT-BPY-IMI vs DMSO) (ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test").

Tabela 1 –Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e DMSO em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contracção com fenilefrina

log [RUT-BPY-IMI]	RUT-BPY-IMI		DMSO		valor p
	Média	EPM	Média	EPM	
-9	14,000	4,740	1,930	1,930	P=0,0564
-8	18,540	5,290	4,450	3,590	P=0,0697
-7	22,590	6,260	9,460	3,940	P=0,1262
-6	40,540	5,470	14,250	7,630	P=0,048*
-5	66,480	10,510	28,170	6,980	P= 0,022*
-4	112,920	10,630	47,600	8,670	P=0,0045**

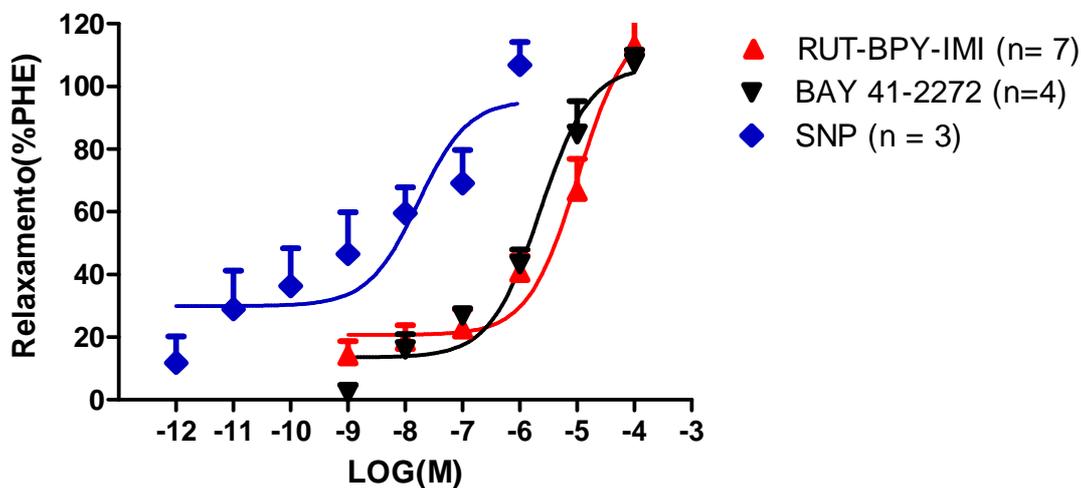
Teste *t* de *Student* não-pareado com correção de Welch. Valores em % de efeito relaxante em relação ao platô de Fenilefrina

4.2 Efeito relaxante do RUT-BPY-IMI, BAY 41-2272 e SNP após pré-contracção com PHE (10µM) em corpo cavernoso de humano

Após a contracção com PHE (10µM), era aguardada a estabilização da curva de contracção, que se dava em cerca de 20 min. Então eram adicionadas as drogas: SNP; BAY 41-2272 e RUT-BPY-IMI, em concentrações crescentes: 10^{-12} M a 10^{-6} M do SNP e 10^{-9} a 10^{-4} M das outras drogas. A maior potência in vitro do SNP já foi descrita em outros trabalhos e as concentrações foram escolhidas de acordo com outros protocolos.

O relaxamento máximo produzido pelo SNP foi de $106,82\% \pm 7,33\%$. A potência de relaxamento ($pEC_{50}=-\log EC_{50}$) foi de $7,775 \pm 0,5107$. O relaxamento máximo produzido pelo BAY 41-2272 foi de $107,64\% \pm 4,13\%$, semelhante ao SNP. Já a potência de relaxamento foi de $5,648 \pm 0,22$. Não houve diferença significativa entre o relaxamento máximo das três drogas (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Curva Concentração-resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com o BAY 41-2272 e SNP em tiras de corpo cavernoso humano



(ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test")

Tabela 2 – Comparação entre os E_{MAX} das curvas dose resposta do RUT-BPY-IMI e SNP

Parâmetro	RUT-BPY-IMI	SNP	valor p
E_{MAX}	112,92% ± 10,63%	106,82% ± 7,33%	0,3437

* $p > 0,05$ Teste *t* de Student não-pareado com correção de Welch.

Tabela 3 – Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e BAY 41-2272 em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contracção com fenilefrina

log [RUT-BPY-IMI]	RUT-BPY-IMI		BAY 412272		valor p
	Média	EPM	Média	EPM	
-9	14,000	4,740	2,367942	2,367942	P= 0,0706
-8	18,540	5,290	16,14664	4,830513	P=0,7497
-7	22,590	6,260	26,93209	1,561931	P=0,0706
-6	40,540	5,470	43,32119	4,644282	P=0,7117
-5	66,480	10,510	84,83863	10,54735	P=0,2724
-4	112,920	10,630	107,6459	4,137068	P= 0,6601

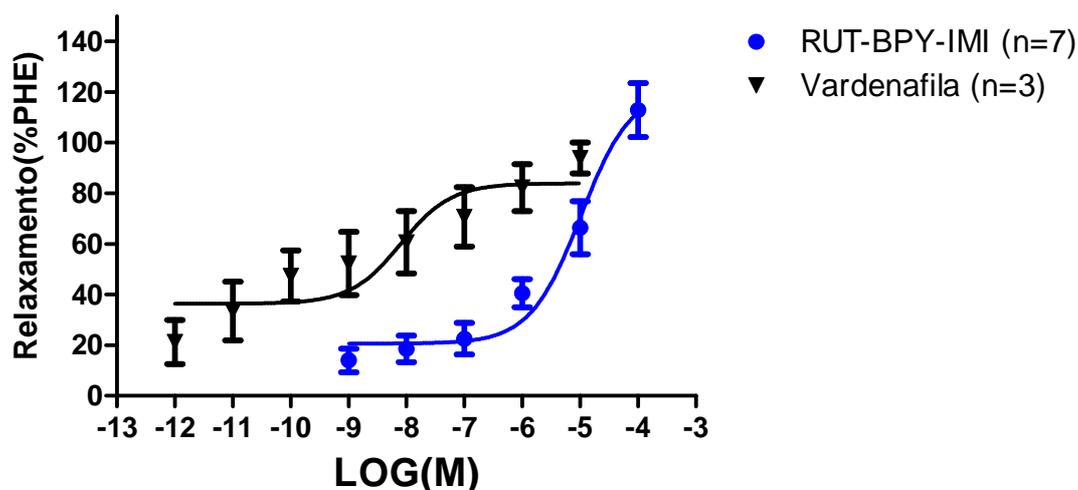
Teste *t* de Student não-pareado com correção de Welch.

4.3 Comparação da substância estudada com a Vardenafila, droga inibidora da PDE 5, e droga já utilizada no tratamento de Disfunção Erétil

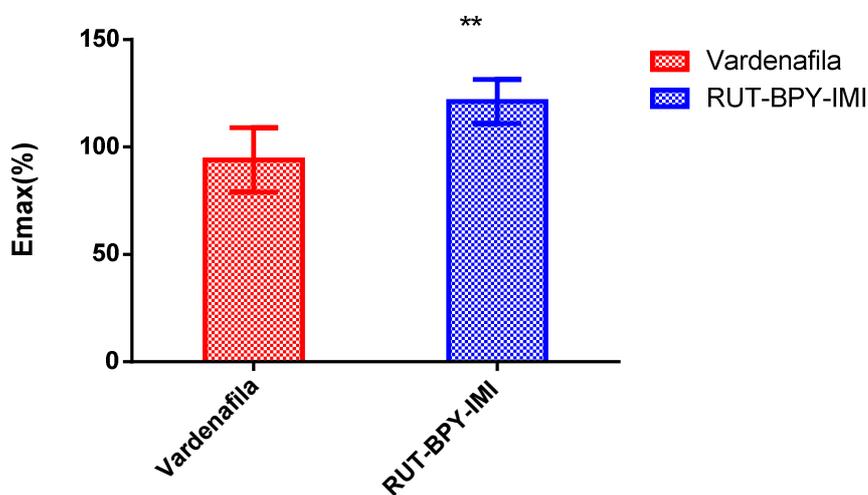
Após a contração com PHE (10 μ M), era aguardada a estabilização do tecido, sendo adicionada a vardenafila em concentrações crescentes de 10⁻¹² até 10⁻⁶M, a cada 10 min. O grau de relaxamento de cada concentração era ao final dos 10min.

O Relaxamento Máximo (E_{MAX}) alcançado pela vardenafila foi de 93,940 \pm 6,060%, e a pEC₅₀ foi 8,089 \pm 0,4628. Comparando os dados da vardenafila com a droga estudada, houve uma diferença estatística entre a E_{MAX} do RUT-BPY-IMI e a Vardenafila, a favor da substância estudada. Como o experimento não utilizou concentrações semelhantes, não foi possível comparar a potência das duas substâncias.

Gráfico 3 – Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com a vardenafila em tiras de corpo cavernoso humano.



ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test"

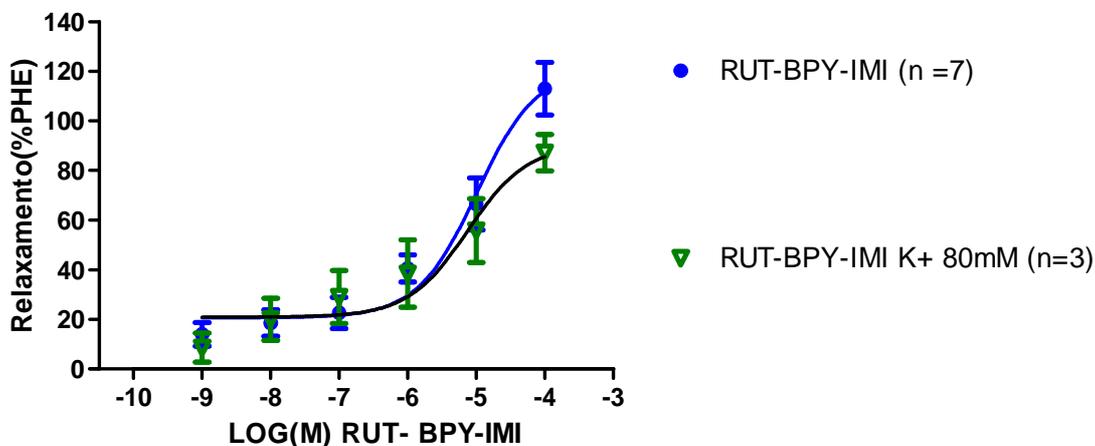
Gráfico 4 – Gráfico em barras comparando o E_{MAX} das duas substâncias

**p<0,01 Teste *t* de Student não-pareado com correção de Welch.

4.4 Efeito do RUT-BPY-IMI na contração realizada com K⁺ 80mM, comparando com a ação na contração realizada por fenilefrina

Para estudar o efeito dos canais de potássio, e o papel dos canais que permitem o influxo de cálcio iônico para o meio intracelular, as tiras de corpo cavernoso foram contraídas com K⁺ 80mM, as curvas de relaxamento foram avaliadas com as mesmas concentrações (10⁻⁹ a 10⁻⁴M). O Relaxamento Máximo (E_{MAX}) da substância na contração com K⁺ foi 87,15 ± 7,34%. A pEC₅₀ foi de 5,124 ± 0,3570. Não houve diferença entre os E_{MAX} calculados através das curvas produzidas. Porém, quando comparamos os E_{MAX} das médias alcançadas nos experimentos, conseguimos uma diferença estatística num teste *t* não pareado com correção de Welch. (tabela 4)

Gráfico 5 – Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI na contração realizada por Fenilefrina com K^+ 80mM em tiras de corpo cavernoso humano



ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test"

**p>0,01

Tabela 4 – Comparação entre o E_{MAX} e pEC_{50} das curvas dose resposta do RUT-BPY-IMI na contração com PHE e K^+ 80mM

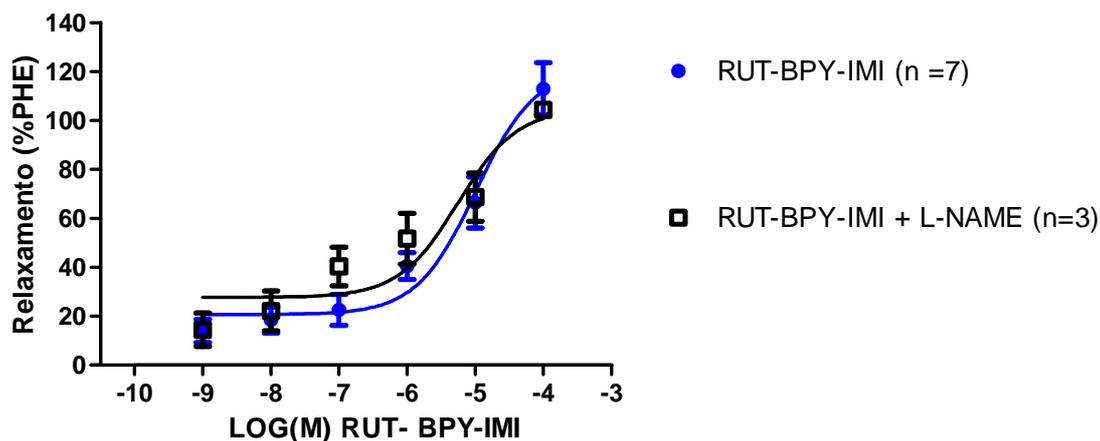
Parâmetro	RUT-BPY-IMI	RUT-BPY-IMI + K ⁺ 80mM	valor p
pEC_{50}	4,991 ± 0,1916	5,542 ± 0,3271	p= 0,1125
E_{MAX}	112,92% ± 10,63%	87,15 ± 7,34%	p= 0,0069**

**p<0,01 Teste *t* de Student não-pareado com correção de Welch.

4.5 Efeito do L-NAME (100 μ M) um inibidor da NOS no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado

Quando adicionado o inibidor da NOS (L-NAME) anteriormente ao RUT-BPY-IMI, não houve alteração estatisticamente significativa entre todas as concentrações (p>0,05), mostrando que não houve bloqueio do efeito relaxante da substância. O relaxamento máximo produzido pela adição de L-NAME foi 104,8% ± 16,73%, com um pEC_{50} de 5,254 ± 0,4351.

Gráfico 6 – Curva Concentração-resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com o fármaco acrescentado ao L-NAME em tiras de corpo cavernoso humano

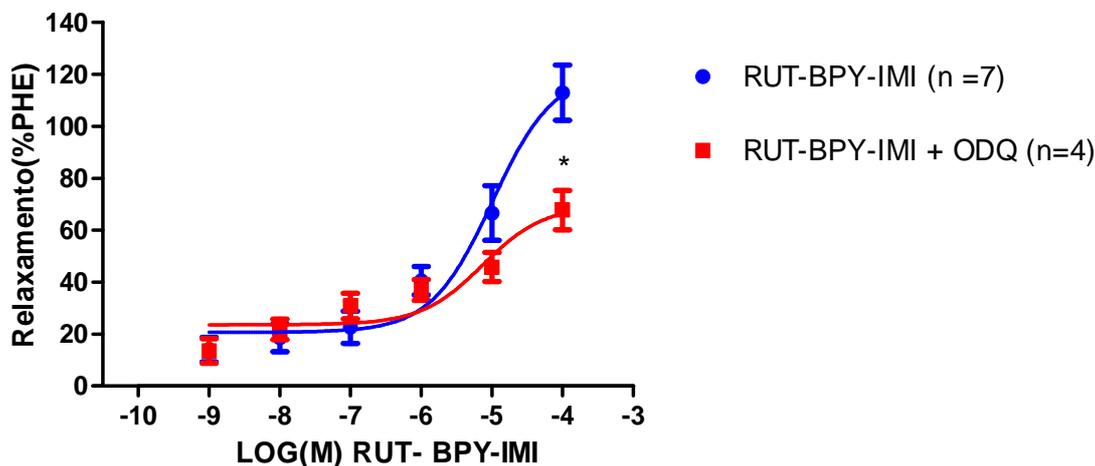


(RUT-BPY-IMI vs RUT-BPY-IMI+ L-NAME) –) (ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test")

4.6 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel por um inibidor específico do grupo heme da enzima (ODQ;30 μ M) e no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado

A adição de ODQ na amostra antes da colocação do RUT-BPY-IMI, bloqueou apenas parcialmente o efeito de relaxamento da substância. O relaxamento máximo produzido por esse mecanismo foi de $67,710\% \pm 7,560$, enquanto a pEC50 foi de $5,129 \pm 0,4595$. Quando comparado com substância sozinha houve diferença estatística entre as duas curvas ($p < 0,01$).

Gráfico 7 – Curva Concentração-resposta, comparando o efeito da Substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada ao ODQ (30 μ M) em tiras de corpo cavernoso humano



* $p < 0,05$ (RUT-BPY-IMI vs RUT-BPY-IMI+ ODQ –) (ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test")

Tabela 5 –Efeito de diferentes concentrações de RUT-BPY-IMI e RUT-BPY-IMI + ODQ (30 μ M) em corpo cavernoso de humano submetido à pré-contração com fenilefrina

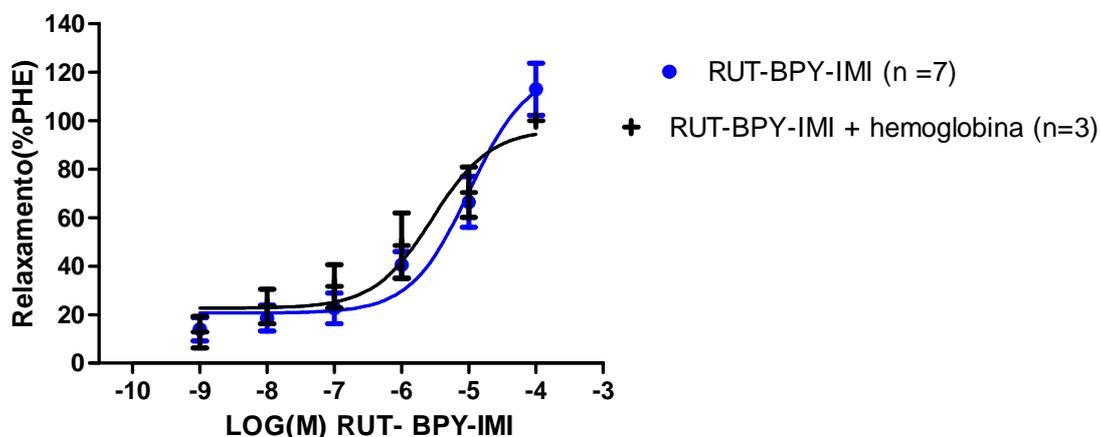
log [RUT-BPY-IMI]	RUT-BPY-IMI		RUT-BPY-IMI + ODQ 30 μ M		valor p
	Média	EPM	Média	EPM	
-9	14,000	4,740	13,570	4,740	P=0,9513
-8	18,540	5,290	21,800	3,830	P=0,634
-7	22,590	6,260	30,810	4,890	P=0,347
-6	40,540	5,470	36,950	4,000	P=0,6153
-5	66,480	10,510	45,800	5,590	P=0,1330
-4	112,920	10,630	67,710	7,560	P=0,0134*

* $P < 0,05$. Teste *t* de Student não-pareado com correção de Welch.

4.7 Efeito do removedor extracelular de NO (hemoglobina bovina) no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI em corpos cavernosos de humano

A adição de hemoglobina bovina ao banho antes da adição da droga RUT-BPY-IMI não causou efeito importante, nem deslocamento da curva, alcançando 96,44% +/- 10,44, não sendo estatisticamente significante, quando comparado. O Valor da pEC50 do RUT-BPY-IMI +Hemoglobina foi de 5,542 +/-0,3271, semelhante à substância sozinha (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Curva dose resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada à Hemoglobina em tiras de corpo cavernoso humano.



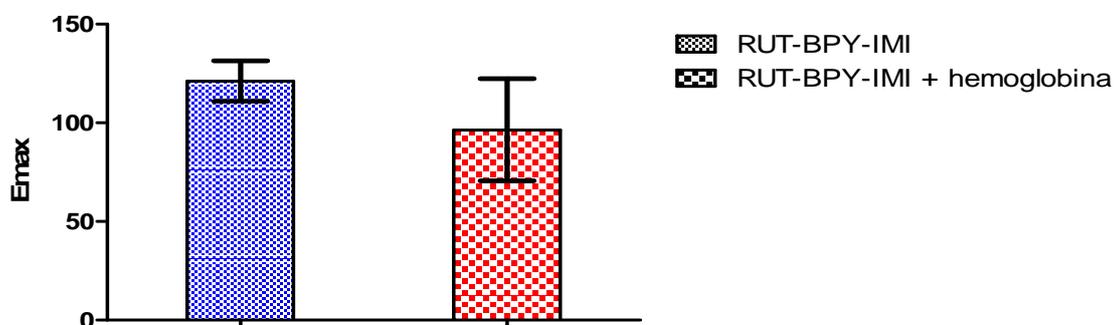
(RUT-BPY-IMI vs RUT-BPY-IMI+ hemoglobina bovina-) (ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test")

Tabela 6 – Determinação dos parâmetros pEC50 e E_{MAX} nos grupos RUT-BPY-IMI e RUT-BPY-IMI + Hemoglobina em tira de corpo cavernoso de humano

Parâmetro	RUT-BPY-IMI	RUT-BPY-IMI +hemoglobina	valor p
pEC50	4,991 ± 0,1916	5,542 ± 0,3271	p= 0,1125
E _{MAX}	112,92 ± 10,63%	96,44 ± 10,44%	p= 0,372

teste t de student não-pareado com correção de Welch.

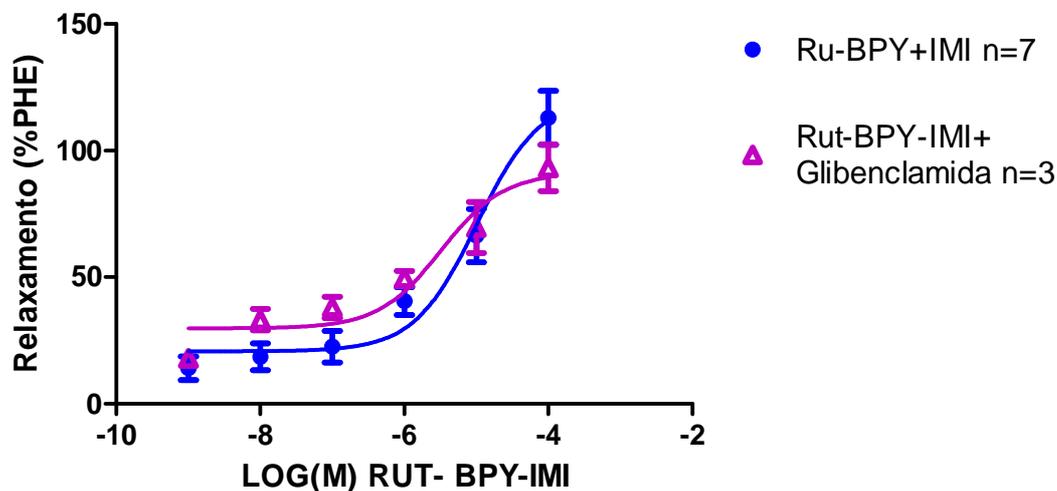
Gráfico 9 – Comparação do relaxamento máximo alcançado pela droga isolada e quando associada à hemoglobina



4.8 Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K_{ATP}), glibenclamida ($10\mu\text{M}$) no relaxamento induzido pela substância RUT-BPY-IMI no tecido estudado

A adição do bloqueador de K_{ATP} , glibenclamida no banho, 30min antes da contração com PHE, não causou mudança estatisticamente significativa no poder relaxante da droga estudada, causando apenas uma pequena diminuição no E_{MAX} . O E_{MAX} da curva com glibenclamida foi $91,37\% \pm 10,24\%$, enquanto a potência do fármaco adicionado à glibenclamida (pEC_{50}) foi de $5,487 \pm 0,3769$ (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Curva Concentração-resposta, comparando o efeito da substância RUT-BPY-IMI com a droga acrescentada à glibenclamida em tiras de corpo cavernoso humano

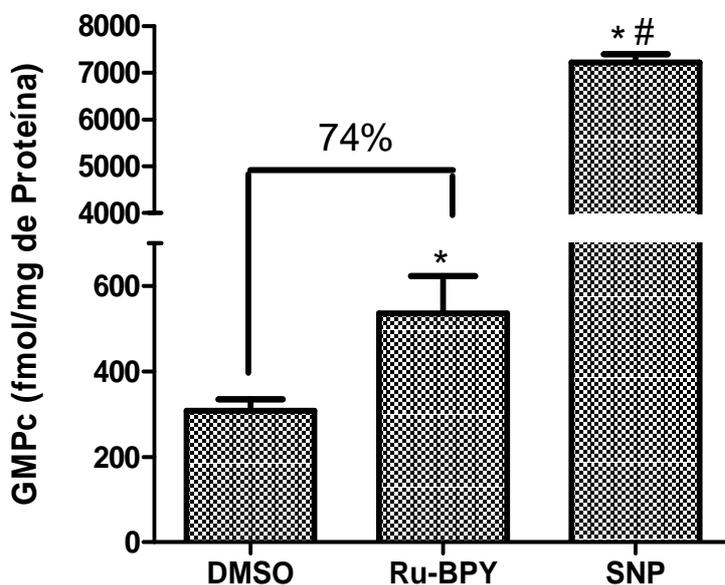


ANOVA seguida de "Bonferroni's Multiple Comparison Test"

4.9 Medição do GMPc após a exposição às substâncias estudadas

A concentração de GMPc intracelular no grupo exposto com o fármaco estudado, foi cerca de 74% superior a concentração do DMSO, com diferença estatística, e inferior ao SNP.

Gráfico 11 – Concentração de GMPc medido nos grupos expostos



* $p < 0,05$ Rut-Bpy x DMSO teste t não pareado

$p < 0,001$ Rut-Bpy X SNP teste t não pareado

5 DISCUSSÃO

A disfunção erétil é uma doença estigmatizante, comum e que vem aumentando em prevalência (WIERZBICKI, 2011). A disfunção endotelial é um dos principais mecanismos envolvidos nas doenças cardiovasculares, inclusive no corpo cavernoso (IGNARRO, 1999). Esse mecanismo pode estar envolvido em vários fatores de risco, sendo manifestação precoce das doenças cardiovasculares, sendo a DE marcador precoce dessas doenças (ANDERSSON, 2011).

Na disfunção endotelial encontra-se um desbalanço na homeostase entre fatores relaxadores e constritores (RUBANYI, 1993). A via da L-arginina/NO/cGMP frequentemente encontra-se envolvida na gênese da DE (BURNETT, 1992). Sendo a deficiência na produção do NO o fator chave tanto para a disfunção endotelial (MONCADA, 1993) como para a Disfunção Erétil (IGNARRO, 1992).

Novas drogas tem sido desenvolvidas a cada dia para o tratamento da DE (HATZIMOURADITIS; HATZICHRISTOU, 2008). Os maiores avanços foram realizados pelo entendimento dos mecanismos envolvidos, porém poucas drogas foram introduzidas clinicamente (ANDERSSON, 2001). As principais drogas desenvolvidas com sucesso foram os inibidores da PDE-5, porém essas drogas necessitam da presença do NO (CORBIN, 2002). Nesse contexto, novos fármacos que agissem como doadores de óxido nítrico foram desenvolvidos. As primeiras drogas testadas em tiras de corpo cavernoso foram os nitratos orgânicos (ANDERSSON, 2011). Esses fármacos produzem seu efeito estimulando a GC solúvel através da doação do NO (FEELISH; KOTSONIS; SIEBE, 1999). A principal substância estudada como doadora in vitro é o SNP. Testando o SNP em tiras de aorta de rato (BONAVENTURA, 2007) e corpo cavernosos de coelho (CERQUEIRA, 2008) mostraram um relaxamento importante com E_{MAX} : $101.8 \pm 3.3\%$; pEC_{50} : 8.20 ± 0.12 e 6.4 ± 0.14 , respectivamente. O uso in vivo dessa droga tem o inconveniente de produzir composto cianeto (BATES, 1991), Ânions peróxido (LAMARQUE; WHITTLE, 1995) e superóxido (VILLA, 1994). Além desse mecanismo, essa droga pode induzir a apoptose (ESTEVEZ, 1995).

Por esse motivo, substâncias com complexo metálico foram desenvolvidas, entre elas drogas do complexo nitrosil-rutênio (WANG, 2000; MARCONDES, 2002; BONAVENTURA, 2008). Essas moléculas tem o grande benefício de serem termicamente estáveis.

O presente estudo pesquisou o efeito de uma nova droga, o cis-[Ru(bpy)₂IMn(NO)]³⁺ (RUT-BPY-IMI), um composto derivado do complexo nitrosil rutênio com um radical imidazólico. O tecido estudado foi o corpo cavernoso humano, dissecado em doadores não-vivos de órgãos, testado em banhos orgânicos. Após o estímulo com Fenilefrina (PHE 10 μ M), todos os corpos cavernosos produziram uma curva de contração acima de 2g, mais de 100% da linha de base, mostrando a presença de receptores α 1. Essas contrações foram, em sua maioria, sustentadas, podendo ser realizados os experimentos. Esses resultados foram visualizados em outros estudos com corpo cavernoso humano (IGNARRO, 1992; GONZAGA-SILVA, 2005; SOUSA, 2010), assim como corpo cavernoso de coelho (BUSH; GONZALEZ; IGNARRO, 1992; CERQUEIRA, 2008).

A adição da droga estudada nos banhos de tecidos provocou um relaxamento de 112,92% \pm 10,03%, quando comparado ao veículo (DMSO), que produziu um E_{MAX} de 50,69% \pm 5,185%. O experimento mostrou uma diferença de mais de 70% de relaxamento, sendo significativo, principalmente na concentração de 10⁻⁴M. Em um trabalho de Sharabi *et al* (2004), utilizando corpo cavernoso de coelho, o sildenafil, na concentração de 1x 10⁻⁵ M, produziu um relaxamento de cerca de 60% no tônus produzido pela PHE. Ainda nesse trabalho, a fentolamina mostrou um relaxamento médio de cerca de 80%, no tônus alcançado pela PHE.

Em um estudo com corpo cavernoso humano, Gonzaga-Silva *et al* (2005) testaram o efeito da fentolamina em banhos orgânicos. Nesse trabalho, após a contração com uma solução despolarizante de 40mM de K⁺, foi observado um relaxamento no platô de contração de cerca de 50% (GONZAGA-SILVA, 2005). Em comparação com a droga testada nesse estudo, a eficiência do RUT-BPY-IMI foi maior que a fentolamina, uma droga utilizada comercialmente em injeções intra-cavernosas. Em outro estudo, com tiras de corpos cavernosos, Freitas *et al*. (2009) testaram o efeito relaxante da iombina. As tiras de CCH eram pré-contraídas com fenilefrina e com uma solução com 60mM de K⁺. O E_{MAX} dessa droga foi de cerca de 100% \pm 0% (Fenilefrina), e apenas 30,5 \pm 5%, quando pré-contraído com K⁺. Mais uma vez a droga foi mais eficiente que a iombina, inclusive quando pré-contraída com 80mM de K⁺.

Até o presente momento, este trabalho é o primeiro trabalho realizado com compostos do complexo nitrosil rutênio em tiras de corpos cavernosos humanos. Já em corpos cavernosos de coelho, Cerqueira *et al* (2008) testaram 2 compostos do complexo

nitrosil rutênio (Rut-Bpy e Rut-Caf). Os E_{MAX} desses compostos foram de 31,2% e 81% respectivamente, sendo inferiores ao composto testado (CERQUEIRA, 2008). Bonaventura, 2007), testando um novo composto do complexo nitrosil-rutênio [Ru(terpy)(bdq)NO] em anéis de aorta de coelho, mostrou um E_{MAX} , quando contraído com fenilefrina, de $102,7\% \pm 0,8\%$, um resultado semelhante ao relaxamento induzido pela substância. Vale salientar, que esses experimentos foram realizados em anéis de aorta rato sem endotélio. Em outro trabalho realizado por Bonaventura *et al.* (2007), foi demonstrado que a presença do endotélio modulava negativamente o relaxamento induzido pelas drogas do complexo nitrosil-rutênio, devido ao desacoplamento da eNOS, induzindo a produção do metabólito O^2- . Esse metabólito induz a ativação da COX, produzindo o Tromboxano A2 (TXA2). Esse efeito pode ser esperado no RUT-BPY-IMI, podendo potencializar o efeito dessa droga, porém isso não foi testado nesse trabalho, abrindo possibilidades para outros experimentos com corpos cavernosos sem endotélio (BONAVENTURA, 2009).

Para avaliar a capacidade de relaxamento da droga, foram comparados os resultados com fármacos já classicamente definidos como tratamento para disfunção erétil, ou que, *in vitro*, já comprovaram causar relaxamento significativo. Quando comparamos a droga com o SNP, o RUT-BPY-IMI alcançou um E_{MAX} de 112,92%, (E_{MAX} SNP=106,82% \pm 7,33%) não estabelecendo uma diferença entre as duas curvas de concentração-resposta. Quando comparados os dois E_{MAX} em um teste *t* não pareado, encontrou-se um valor de $p=0,3437$, sem diferença estatística entre as duas médias de E_{MAX} . Essa comparação dos efeitos máximos pode ser difícil de ser feita, pois a amostra de tecidos expostos ao SNP é pequena, causando uma distorção na curva de regressão. Como as curvas dos dois compostos possuíam concentrações diferentes, não foi possível comparar a potência das duas drogas. Contudo, outros trabalhos mostraram esse mesmo efeito do SNP, mostrando sua maior potência em relação a outras drogas. Testando vários compostos em corpos cavernosos, Seidler *et al.* (2002) demonstraram que o SNP foi mais potente que as outras drogas doadoras de óxido nítrico. Nesse mesmo trabalho, foi provado que o SNP possuía uma maior capacidade de relaxamento da musculatura que outras substâncias testadas (SEIDLER, 2002). Cerqueira *et al.* (2008) testando o SNP em banhos de tiras de corpos cavernosos de coelho, demonstraram que o SNP possuía um grande efeito máximo (E_{MAX} =109,7%), com potência (pEC_{50} =6,4). Esses dados foram comparados com o efeito de dois outros

compostos do complexo nitrosil-rutênio (LLNO1 e FONO1). Nesse estudo, os dois fármacos não produziram um relaxamento máximo maior que o SNP, nem foram mais potentes (CERQUEIRA, 2008).

Comparamos o RUT-BPY-IMI com o BAY 41-2272, um fármaco indutor da sGC NO-independente, bastante estudado em outros trabalhos. O E_{MAX} produzido pelo BAY 41-2272 foi de 107,64, que quando comparada em um teste t não pareado com a nossa substância, em todas as concentrações (10^{-9} a $10^{-4}M$), não houve diferença estatística em nenhuma concentração, nem tão pouco na E_{MAX} ou no pEC50 (potência). Esses dados demonstram que os efeitos desses dois fármacos são semelhantes, e que ambos são fortes relaxadores da musculatura lisa cavernosa humana. Bacarat *et al* (2003) testaram esse composto em corpos cavernosos de coelho e humanos. Nesse trabalho, o fármaco produziu um E_{MAX} de cerca de 100% tanto em RCC como em CCH. Já testando essa substância *in vivo*, Bischoff *et al* (2003) demonstraram que o efeito dessa substância sem a adição de um doador de óxido nítrico é fraco, e portanto essa substância tem sua ação máxima quando associada a outra droga doadora de óxido nítrico. Esse trabalho mostra que a substância é tão eficaz quanto o BAY 41-2272, e que teoricamente pode agir sozinha, causando um efeito relaxante importante. No entanto, novos trabalhos *in vivo* com esse fármaco devem ser desenvolvidos.

Outra comparação importante realizada nesse trabalho foi com um inibidor da PDE 5, a vardenafila, droga de uso comercial no tratamento do DE. Foram comparados o efeito relaxante máximo, a curva dose resposta e a potência da Vardenafila e do RUT-BPY-IMI. Comparando as duas curvas de dose resposta, encontrou-se uma diferença estatística importante nos dois E_{MAX} . O RUT-BPY-IMI mostrou um E_{MAX} bastante superior à vardenafila, quando comparados em teste t não pareados com correção de Welch ($p=0,0015$). Mais uma vez a comparação da potência dos fármacos foi impossível, pois a curva da vardenafila possuía mais pontos e mais concentrações. Os iPDE5 são drogas de escolha para o tratamento da DE (CORBIN, 2002). Dentre os fármacos disponíveis na prática clínica, a Vardenafila tem-se mostrado a droga mais potente e que produz o maior relaxamento *in vitro* (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2006; TOQUE, 2009). Comparando as três principais substâncias sildenafil, vardenafila e tadalafila, em banhos de corpos cavernosos de humanos, Toque *et al* (2009) mostraram que a vardenafila produzia um maior relaxamento máximo ($111 \pm 3\%$). Testando essas três substâncias em anéis de aorta, Teixeira,

Priviero e Webb (2006) mostraram que a vardenafila era superior aos outros dois iPDE5.

Desde a descoberta do óxido nítrico, tem-se implicado a esse neurotransmissor o papel de principal substância responsável pela ereção humana (IGNARRO; BURNETT, 1992). A presença da NO sintase em corpos cavernosos confirmou esse papel, principalmente após estudos de Burnett *et al.* A L-arginina é o substrato para a formação do óxido nítrico, e quando adiciona-se essa droga no banho biológico, ocorre um relaxamento do tecido (KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004).

Nesse contexto, para avaliar se a droga tem algum papel na modulação ou estímulo da NOS, foi utilizado o inibidor da NO sintase, o L-NAME, adicionado 30min antes da contração com PHE. A adição dessa substância não provocou alteração da curva de relaxamento. Não houve diferença estatística entre as concentrações das duas curvas. O relaxamento máximo produzido pelo RUT-BPY-IMI na presença de L-NAME foi $104,8\% \pm 16,73\%$, com um pEC50 de $5,254 \pm 0,4351$. Esse resultado demonstra que a droga não é indutora da NO sintase. Outras drogas doadoras de óxido nítrico foram testadas e mostraram a mesma característica. Filippi *et al* (2003) testando uma nova droga doadora de óxido nítrico (NCX4050) em tiras de corpos cavernosos humanos, quando adicionado L-NAME, não alterou a capacidade relaxante da droga. Seidler *et al* (2002) testaram várias drogas doadoras de óxido nítrico em tiras de corpos cavernosos de humanos. Esses fármacos, os nitroso-tióis e o nitrato de sildenafil, não tiveram seu efeito bloqueado pela adição de L-NAME, semelhante ao que encontramos no presente estudo (SEIDLER, 2002). Isso ocorre porque os doadores de óxido nítrico não produzem seu efeito através da indução da NOS, e sim agindo diretamente na ativação da guanilato ciclase (LUNARDI, 2009).

A ativação direta da Guanilato ciclase nas células da musculatura lisa do corpo cavernoso é a principal ação do NO e esse mecanismo tem sido alvo de várias pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas (MURAD, 1977; KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004; ANDERSSON, 2011). A guanilato ciclase solúvel possui dois sítios alostéricos: um sítio Heme na subunidade alfa, que é o principal sítio de ligação do NO, e, portanto, mecanismo de ação das drogas doadoras de óxido nítrico; e outro mecanismo na subunidade beta, chamado de sítio do YC-1, que ativa a guanilato ciclase independente da ativação do NO (MÜLSH, 1997; KALSI,

2003; ANDERSSON, 2011). Os dois mecanismos atuam ativando a enzima e elevando a concentração de GMPc (segundo mensageiro intracelular), tendo como substrato o GTP. Essa concentração atua em três vias: canais de íons, Fosfodiesterases e Proteino quinases (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010).

No intuito de avaliar o papel da guanilato ciclase solúvel no mecanismo de ação da substância testada, foi adicionado ao banho de tecidos o inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ 30 μ M), trinta minutos antes da contração com fenilefrina a 10 μ M. Essa dose já foi utilizada em outros trabalhos, sendo uma dose suficiente para alcançar seu efeito (BONAVENTURA, 2007). O objetivo desse experimento foi identificar se a substância age através da ativação da guanilato ciclase solúvel. A droga doadora de óxido nítrico geralmente libera o NO que ativa a sGC através da sua ligação com o sítio Heme, catalisando a formação de GMPc (LUCAS, 2000). O ODQ altera o estado de oxidação do sítio Heme, onde o NO age, porém não altera o efeito da GCs (ZHAO, 2000). A adição do ODQ 30 μ M provocou uma diminuição do efeito relaxante do fármaco em cerca de 50% (de 112% para 67%, com $p=0,0134$) (Tabela 5). Outras drogas produziram efeitos semelhantes. Em um trabalho recente, Bonaventura *et al* (2007) utilizando anéis de aorta, testando uma substância do complexo nitrosil rutênio, a adição de ODQ ao banho de tecidos provocou uma diminuição importante do E_{MAX} , além de uma diminuição da potência da substância (pEC_{50}). Esse mesmo efeito foi encontrado quando adicionado o ODQ ao SNP. Cerqueira *et al* (2008), testando outros compostos dois compostos do complexo nitrosil rutênio em corpos cavernosos de coelho, adicionaram ao banho de tecidos ODQ em doses crescentes de 10 a 100 μ M. Esse experimento resultou em um bloqueio total do E_{MAX} dos fármacos, principalmente na dose de 100 μ M. Nesse estudo o autor concluiu que esses fármacos agiam principalmente na via NO/sGC/GMPc, e esse efeito de bloqueio total pode ter sido devido à utilização de doses altas do ODQ. Utilizando tiras de corpo cavernoso humano, Seidler *et al* (2002) testaram várias drogas doadoras de óxido nítrico (S-nitrosotióis). A adição de ODQ aos banhos causou um bloqueio de cerca de 80% no relaxamento dos componentes. O bloqueio parcial da droga pode ser explicado primeiramente pelo fato do veículo (DMSO) provocar um relaxamento de cerca de 50%, e quando comparamos o DMSO com a curva do fármaco+ODQ, não houve diferença estatística. Outra explicação para o fenômeno é que a concentração utilizada de ODQ é insuficiente para

bloquear todo o efeito do RUT-BPY-IMI, como sugerido no trabalho de Cerqueira *et al* (2008).

Para avaliar o papel do NO extracelular no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, foi adicionado ao banho 30 min antes da contração com PHE, o removedor de NO extracelular hemoglobina Bovina. A adição desse composto reduziu em apenas 20% a E_{MAX} do RUT-BPY-IMI, passando para $96,44\% \pm 10,44\%$, com $p=0,372$, não sendo estatisticamente significativa. Não houve redução significativa da potência ($pEC50$), passando para $5,542 \pm 0,032$ ($p>0,05$). Analisando outra substância do complexo nitrosil-rutênio em anéis de aorta, Bonaventura *et al* (2007) encontraram que a adição de oxihemoglobina, um composto semelhante à hemoglobina bovina, não alterou o E_{MAX} do fármaco ou do SNP. (BONAVENTURA *et al*, 2007). Mesmo outros trabalhos com compostos do complexo nitrosil rutênio, cujo efeito da oxyhemoglobina foi de reduzir o efeito relaxante desses fármacos, em nenhum deles esse composto aboliu totalmente o relaxamento, tanto em hipocampo de ratos (WIERASZKO, 2001), como em anéis de aorta de coelho e corpos cavernosos de coelho (CERQUEIRA, 2008). Esse fato é concordante com esse presente trabalho, sugerindo que a substância é um doador de NO, e que a substância não produz efeito através do NO extracelular. Outras drogas tem efeito semelhante às drogas do complexo nitrosil rutênio. Em um trabalho com fundo gástrico de ratos, Jemkinson *et al* estudaram várias drogas que agiam na via NO/cGMP, dentre elas o próprio gás NO (exógeno) e drogas doadoras de óxido nítrico. A adição de hemoglobina, em banhos com esses compostos, ocasionou uma diminuição no relaxamento, com diferença estatística, em todas as drogas doadoras de óxido nítrico. Sugere-se que as drogas doadoras de óxido nítrico agem de forma semelhante, e as diferenças entre as ações de cada fármaco podem ser relativas às diferenças entre as moléculas de cada droga. Novos estudos com essa substância devem incluir experimentos que utilizem os removedores dos ânions do NO (NO^- e NO^0), L-cisteína e Hidroxicobalamina respectivamente.

Os canais de íons não-juncionais possuem função primordial, tanto na manutenção como no bloqueio do tônus da musculatura lisa, que apesar de bastante complexa já é bem estudada e compreendida atualmente (CHRIST, 2000; ANDERSSON, 2011). Esses canais são responsáveis pela manutenção da hiperpolarização da membrana celular, que em última análise permitem o aumento ou diminuição do influxo de cálcio para o meio intracelular desencadeando a contração ou relaxamento do miócito

(VENKATESWARLU, 2002). Isso vale para todos os tipos de vasos, como também para o corpo cavernoso humano (HÖPPNER, 1996). Dentre todos os canais, os mais estudados e envolvidos na fisiologia e no estudo de novas drogas para DE, são os canais de Potássio dependente de ATP (K_{ATP}), e os canais Maxi-K cálcio-sensível (BK_{Ca}) (BAUKROWITZ; FAKLER, 2000). Várias drogas vasodilatadoras agem através dos canais K_{ATP} , como o pinacidil (VILABAEK, 1988), cromakalium, minoxidil, (LONGMAN, 1992) e fentolamina (GONZAGA-SILVA *et al*, 2005).

Para avaliar o papel dos canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) no relaxamento induzido pela droga estudada, foi adicionado ao banho de tecidos o bloqueador desse canal Glibenclamida ($10\mu M$). A adição dessa substância não causou alteração na capacidade de relaxamento do RUT-BPY-IMI (Gráfico 11). Esses dados sugerem que a droga não age ativando os canais K_{ATP} . Não houve alteração nem na E_{MAX} ($91,37\% \pm 10,24\%$) e nem no $pEC50$. Avaliando novos compostos do complexo nitrosil-rutênio, Bonaventura *et al* (2007), trabalhando em anéis de aorta adicionou um bloqueador não específico dos canais de potássio (TEA). Esse experimento não demonstrou alteração na capacidade relaxante do composto. Contudo, quando adicionado o inibidor da Guanilato ciclase (ODQ), houve relaxamento importante. Cellek *et al* (1996), avaliando agentes doadores de NO em corpos cavernosos de humanos e coelhos bem como no músculo anococcígeo de coelho, demonstrou que a ação destas substâncias se faz através da ativação da GCs e produção de GMPc e não por ação direta em canais de íons. Lee e Kang (2001) sugeriram que a produção de GMPc provocaria a ativação da proteína quinase específica do GMPc (Proteínoquinase – PKG) e esta enzima atuaria na fosforilação dos canais de cálcio de longa duração tipo L, inibindo a saída do cálcio das organelas intracitoplasmáticas e o aumento de sua concentração no citosol, o que provocaria relaxamento celular. Alguns trabalhos tem demonstrado o papel do NO na ativação direta de canais de potássio. Além dos canais de potássio ATP-dependentes, o NO ativa vários outros canais, sendo o K_{CA} outro canal ativado pelo NO (Félétou, 2009). A ativação desses canais de dá por três mecanismos: Através do GMPc, ligação direta do NO (na forma de S-Nitroso-thiois) no canal de potássio, e prevenção da formação do bloqueador. Todos esses dados sugerem que o fármaco não produzem ação ativando canais de potássio K_{ATP} , e sim diretamente a sGC, como definido por uma revisão sobre compostos do complexo nitrosil-rutênio (LUNARDI, 2009).

Para definir se definitivamente o fármaco estudado tem como mecanismo de ação a indução da GCs, foi realizada a dosagem da concentração do GMPc nos fragmentos de corpos cavernosos. Os dados recolhidos após análise da quantificação de GMPc intracelular demonstraram que os fragmentos de corpos cavernosos tratados com o RUT-BPY-IMI apresentavam uma concentração de GMPc cerca de 74% a mais que as tiras tratadas com o veículo DMSO (Gráfico 12). Isso prova, juntamente com o bloqueio alcançado com adição do ODQ, que a substância realmente age ativando a GCs, aumentando a concentração do segundo mensageiro GMPc. Nesse estudo, os corpos cavernosos tratados com SNP apresentaram a maior concentração de GMPc, sendo a concentração bem maior que o grupo tratado com RUT-BPY-IMI. Isso não se traduziu num maior E_{MAX} do SNP. O efeito relaxante máximo aparentemente não tem relação direta com a concentração de GMPc. No estudo de Seidler *et al* (2002), a droga com maior capacidade relaxante máxima foi o SNP, porém a substância (NCX911) foi a que mais produziu GMPc, apesar de produzir uma menor resposta máxima.

O trabalho atual conclui que, a substância do complexo nitrosil-rutênio aqui estudada é um potente agente de relaxamento da musculatura lisa em corpos cavernosos de humanos, atuando através da doação direta NO e ativando a enzima guanilato ciclase solúvel. Estudos adicionais *in vitro* poderiam ser desenvolvidos, utilizando-se mais amostras, investigando-se mecanismos de ação diferentes como: ativação de canais de outros íons, estudos de eletroestimulação, avaliação do movimento intracelular de íons cálcio e a dosagem direta de outros segundos mensageiros além do GMPc, para caracterizar outros mecanismos de ação. Estudos *in vivo*, utilizando modelos animais, também são necessários para avaliar a relação entre pressão arterial e pressão intracavernosa e estimulação do nervo cavernoso. Os estudos sugeridos poderiam indicar prováveis aplicações clínicas no futuro de substâncias doadoras de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio.

6 CONCLUSÕES

1. O Fármaco RUT-BPY-IMI possui um efeito relaxante da musculatura lisa de corpos cavernosos de humanos.
2. O Fármaco parece possuir efeito, *in vitro*, comparável ao SNP, BAY 41-2272 e Vardenafila.
3. Não parece haver ativação direta dos canais de potássio durante o processo de relaxamento induzido por essa substância.
4. O agente possivelmente age liberando óxido nítrico.
5. O RUT-BPY-IMI parece atuar no sistema de sinalização celular NO/GMPc, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel.
6. Não há aparente ativação dos canais de potássio dependente de ATP, durante o processo de relaxamento da musculatura lisa cavernosa.
7. A Substância promove aumento da taxa de produção de GMPc.

REFERÊNCIAS

AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION. **Erectile dysfunction clinical guidelines panel**: report on a treatment of organic erectile dysfunction. Baltimore, Maryland, 1996.

ANDERSSON, K-. E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 811-859, 2011.

ANDERSSON, K-. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 417-442, 2001.

ANDERSSON, K-. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiologic Revs.**, v. 75, p. 191-227, 1995.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S; MURAD, F. Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3' 5' -cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 3203, 1977.

BARACAT, J. S.; TEIXEIRA, C. E.; OKUYAMA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; FARO, R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 477, p. 163-169, 2003

BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA JR., R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss is required. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p.157-165, 1991.

BERTHET, J.; SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. **J. Biol. Chem.**, v. 229, p. 351-361, 1957.

BISCHOFF, E.; SCHRAMM, M.; STRAUB, A.; FEURER, A.; STASCH, J. P. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. **Urology**, v. 61, p. 464-467, 2003.

BIVALACQUA TJ, CHAMPION HC, HELLSTROM WJ, KADOWITZ PJ. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Trends Pharmacol Sci.** v. 21, p. 484-9, 2000.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascul. Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, Mar. 2007.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 287-295, 2008.

BONAVENTURA D., LUNARDI CN., RODRIGUES GJ., NETO MA., VERCESI JA., de Lima RG., da Silva RS., Bendhack LM. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J Inorg Biochem.** v. 103, p. 1366-74, 2009

BRENOT, P. H. **Male impotence: a historical perspective.** Paris: L'Esprit du Temps, 1994.

BURNETT, A., L.; NELSON, R., J.; CALVIN, D. C.; LIU, J. X.; DEMAS, G. E.; KLUN, S. L.; KRIEGSFELD, L. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Mol. Med.**, v. 2, p. 288-296, 1996.

BURNETT, A.L.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; CHANG, T.S.; SNYDER, S.H.; 13-Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v.257, n.5068,p.401-403, 1992.

BUSH, P.A.; GONZALEZ, N. E.; IGNARRO, L. J. Biosynthesis of Nitric Oxide and citrulline from l-arginine by Constitutive nitric oxide synthase present in Rabbit corpus cavernosum. **Biochem Biophys Res. Commun**, v. 186, p. 308-314, 1992.

CELLEK, S.; KASAKOV, L.; MONCADA, S.; Inhibition of nitrergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. **Br. J. Pharmacol.** v. 118, p.137-140, 1996

CERQUEIRA, J. B. G.; GONZAGA-SILVA, L. F.; LOPES, L. G. F.; MORAES, M. E. A.; NASCIMENTO, N. R. F. Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 34, p. 638-646, 2008.

CHRIST, G. J. Gap junctions and ion channels: relevance to erectile dysfunction. **Int.J. Impot. Res.**, v.12, p.15-25, 2000.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 20, p.13729-13732, May 1999.

CORBIN, J. D.; TURKO, I. V.; BEASLEY, A.; FRANCIS, S. H. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP binding activities. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 2760-2767, 2000.

ESTEVEZ, A.G.; RADU, R.; BARBEITO, L.; SHIN, J.T.; THOMPSON, J.A.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 1543-1550, 1995.

FEELISH, M.; KOTSONIS, P.; SIEBE, J. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1-H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxaline 1-one is a non selective haem protein inhibitor

of nitric oxide synthase and other cytochrome P450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 243-253, 1999.

FÉLÉTOU, M.; Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **Br J Pharmacol.** v.156, p. 545–562.2009

FILIPPI, S.; CRESCIOLI, C.; VANNELLI, G. B.; FAZZINI, A.; NATALI, A.; RIFFAUD, J. P.; MAGGI, M.; LEDDA, F. Effects of NCX 4050, a new NO donor, in rabbit and human corpus cavernosum. **Int. J. Androl.**, v. 26, p. 101-108, 2003.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action, **Pharmacol.Rev.**, v. 62, p. 525-563, 2010.

FREITAS, F. C.; NASCIMENTO, N. R.; CERQUEIRA, J. B.; MORAIS, M. E.; REGADAS, R. P.; GONZAGA-SILVA, L. F. Yohimbine relaxes the human corpus cavernosum through a non-adrenergic mechanism involving the activation of K⁺ATP-dependent channels. **Int. J. Impot. Res.**, v. 21, p. 356-361, 2009.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, v. 53 p.123-127, 1998.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

GLINA, S.; PUECH-LEÃO, P.; REIS, J. M. S. M.; PAGANI, E. (Ed.). **Disfunção sexual masculina**. São Paulo: Instituto H. Ellis, 2002.

GONZAGA-SILVA, L. F.; NASCIMENTO, N. R.; FONTELES, M. C.; DE NUCCI, G.; MORAES, M. E.; VASCONCELOS, P. R.; MORAES, M. O. Phentolamine relaxes human corpus cavernosum by a nonadrenergic mechanism activating ATP-sensitive K channel. **Int. J. Impot. Res.**, v. 17, p. 27-32, 2005.

HATZIMOURATIDIS, K.; HATZICHRISTOU, D. G. Looking to the future for erectile dysfunction therapies. **Drugs**, v. 68, p. 231-250, 2008.

HEDLUND, P.; NYL, L.; ALM, P.; ANDERSSON, K-. E. Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. **J. Urol.**, v. 164, p. 868-875, 2000.

HERMAN, J. R. Aphrodisiacs. In: _____ (Ed.). **Urology, a view through the retrospectroscope**. New York: Harper & Row, 1973. p. 130-137.

HÖPPNER, C. K.; STIEF, C. G.; JONAS, U.; MANDREK, K.; NOACK, T.; GOLENHOFEN, K. Electrical and chemical control of smooth muscle activity of rabbit corpus cavernosum in vitro. **Urology**, v. 48, p. 512-518, 1996.

IGNARRO, L. J. Nitric Oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, p. 503-514, 2002.

IGNARRO, L. J.; BUSH, P. A.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; FUKUTO, J. M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, p. 843-850, 1990.

JENKINSON, K. M.; REID, J. J.; RAND J. M.; Hydroxocobalamin and haemoglobin differentiate between exogenous and neuronal nitric oxide in rat gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, v 275, p. 145-152, 1995

JOHANNES, C. B.; ARAÚJO, A. B.; FELDMAN, H. A. Incidence of erectile dysfunction in men ages 40-69: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J. Urol.**, v.163, p.460-469, 2000.

KALSI, J. S.; REES, R. W.; HOBBS, A. J.; ROYLE, M.; KELL, P. D.; RALPH, D. J.; MONCADA, S.; CELLEK, S. BAY41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **J. Urol.**, v.169, p. 761-766, 2003.

KINSEY, A. C.; POMEROY, W.; MORTIN, C. Age and sexual outlet. In: KINSEY, A. C. **Sexual behavior in the human male**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1948. p. 218.

KOSARIKOV, D. N.; LEE, J.M.; UVERSKY, V.N.; COUNTS-GERBER, N. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 87, p. 267-276, 2001.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain. Res. Bull.**, v. 62, p. 505-515, 2004.

KÜTHER, A.; REINECKE, M.; UCKERT, S.; BECKER, A.; DAVID, I.; HEITLAND, A.; STIEF, C. G.; FORSSMANN, W. G.; MÄGERT, H. J. Expression of guanylyl cyclase B in the human corpus cavernosum penis and the possible involvement of its ligand C-type natriuretic polypeptide in the induction of penile erection. **J. Urol.**, v.169, p.1918-1922, 2003.

LAMARQUE, D.; WHITTLE, B.J. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, p. 187-194, 1995.

LEE, S. W.; KANG, T. M. Effects of nitric oxide on the Ca²⁺-activated potassium channels in smooth muscle cells of the human corpus cavernosum. **Urol.Res.**, v. 29, p. 359-365, 2001.

LEE, Y. C.; MARTIN, E.; MURAD, F. Human recombinant soluble guanylylcyclase: expression, purification, and regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 10763-10768, 2000.

LOPES, L. F. G.; WIERASZKO, A. Y.; EL-SHERIF, C. M. J. D-trans-labilization of nitric oxide in Ru-II complexes by C-bound imidazoles. **Inorg.-Chim. Acta**, v. 312, p. 15-22, 2001.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 375-413, 2000.

LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. In: WALSH, P. C.; RETIK, H. B.; VAUGHAN, E. D.; STAMEY, T. A. **Campbell's urology**. 8th ed. [S.l.]: W. B. Saunders, 2002. v. 2, cap. 45.

LUE, T. F. Erectile dysfunction. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 1802-1813, 2000

LUNARDI, C.N.; SILVA, R.S. da; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, p. 87-93, 2009.

MARCONDES, F. G.; FERRO, A. A.; SOUZA-TORSONI, A.; SUMITANI, M. CLARKE, M. J.; FRANCO, D. W. et al. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on bloodpressure. **Life Sci.**, v. 70, p. 2735-2752, 2002.

MARTINEZ-PIÑEIRO, L.; LOPEZ-TELLO, J.; ALONSO DORREGO, J. M.; CISNEROS, J.; CUERVO, E.; MARTINEZ-PIÑEIRO, J. A. Preliminary results of a comparative study with in-tracavernous sodium nitroprusside and prostaglandin E1 in patients with erectile dysfunction. **J. Urol.**, v. 153, p. 1487-1490, 1995.

MARTÍNEZ-PIÑEIRO, L.; CORTE, S. R.; CUERVO, E.; LÓPEZ-TELLO, J.; CISNEROS, J.; MARTÍNEZ-PIÑEIRO, J. Á. Prospective comparative study with intracavernous sodium nitroprusside and prostaglandin E1 in patients with erectile dysfunction. **Eur. Urol.**, v.34, p.350-354, 1998.

MELMAN, A.; GINGELL, J. C. The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. **J. Urol.**, v. 161, p. 5-11, 1999.

MIZUSAWA, H.; HEDLUND, P.; SJUNNESSON, J.; BRIONI, J. D.; SULLIVAN, J. P.; ANDERSSON, K. E. Enhancement of apomorphine-induced penile erection in the rat by a selective alpha(1D)-adrenoceptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 701-708, 2002.

MOREIRA, JR. E.D.; ABDO, C.H.; TORRES, E.B.; LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A.

Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v.58, n.4, p.583-588,2001.

MOREIRA JR, E.D.; LISBOA LOBO, C.F.; VILLA M.; NICOLOSI A.; GLASSER D.B. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. **Int J Impot Res.**, v.2, p.S3-S9, 2002a

MOREIRA, JR. E.D.; BESTANE, W.J.; BARTOLO, E.B.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. Sao Paulo, **Med J.**, v.120, n.2, p.49-54, 2002b.

MÜLSCH, A.; BAUERSACHS, J.; SCHÄFER, A.; STASCH, J. P.; KAST, R.; BUSSE, R. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **Br. J. Pharmacol.**, v.120, p. 681-689, 1997.

NIH CONSENSUS CONFERENCE. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**, v. 270, n. 1, p. 83-90, Jul. 1993.

PALMER, R. M. J.; TERRIGE, A. J.; MONCADA, S. Nitric Oxide accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PRIETO, P.; RIVERA, L.; BENEDITO, S.; RECIO, P.; VILLABA, N.; HERNANDEZ, M.; GÁRCIA-SACRISTAN, A. Ca⁺⁺-activated K⁺ (K_{Ca}) channels are involved in the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 531, p. 232-237, 2006.

REGADAS, R. P.; MORAES, M. E.; MESQUITA, F. J.; CERQUEIRA, J. B.; GONZAGA-SILVA, L. F. Experimental model of human corpus cavernosum smooth muscle relaxation. **Int. Braz. J. Urol.**, v.36, p. 490-494, 2010.

SATHISHKUMAR, K.; ROSS, R. G.; BAWANKULE, D. U.; SARDAR, K. K.; PRAKASH, V. R.; MISHRA, S. K. Segmental heterogeneity in the mechanism of Sodium Nitroprusside-induced relaxation in ovine pulmonary artery. **Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 45, n. 6, p. 491-498, Jun. 2005

SEIDLER, M.; ÜCKERT, S.; WALDKIRCH, E.; STIEF, C. G.; OELKE, M.; TSIKAS, D.; SOHN, M.; JONAS, U. In vitro effects of a novel class of nitric oxide (NO) donating compounds on isolated human erectile tissue. **Eur. Urol.**, v. 42, p. 523-528, 2002.

SHAH, J. Erectile dysfunction through the ages. **BJU International**, v. 90, p. 433-441, 2002.

SHARABI, F. M.; DAABEES, T. T.; EL-METWALLY, M. A.; SENBEL, A. M. Comparative effects of sildenafil, phentolamine, yohimbine and L-arginine on the rabbit corpus cavernosum. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 18, n. 2, p. 187-194, Apr. 2004.

SOUSA, C. M.; HAVT, A.; SANTOS, C. F.; ARNAUD-BATISTA, F. J.; CUNHA, K. M.; CERQUEIRA, J. B.; FONTELES, M. C.; NASCIMENTO, N. R. The relaxation induced by uroguanylin and the expression of natriuretic peptide receptors in human corpora cavernosa. **J. Sex. Med.**, v. 7, p. 3610-3619, 2010.

STEKEL, W. **Impotence in the male**. The psychic disorders of sexual function in the male. New York: Boni & Liveright, 1927.

TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil in rat aorta. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 654-661, 2006.

TOQUE H.A.; PRIVIERO F.B.; TEIXEIRA C.E.; CLAUDINO M.A.; BARACAT J.S.; FREGONESI A.; DE NUCCI G.; ANTUNES E.; Comparative relaxing effects of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in human corpus cavernosum: contribution of endogenous nitric oxide release. **Urology.**, v. 74, n.1, p. 216-21, 2009.

VENKATERSWARLU, K.; GIRALDI, A.; ZHAO, W.; WANG, H. Z.; MELMAN, A.; SPEKTOR, M.; CHRIST, G. J. potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: diabetes and relaxation of human corpus cavernosum smooth muscle by adenosine triphosphate sensitive potassium channel openers. **J. Urol.**, v.168, p. 355-361, 2002.

VIDEBAEK, L. M., AALKJAER, C. AND MULVANY, M. J. Pinacidil opens K⁺ -selective channels causing hyperpolarization and relaxation of noradrenaline contractions in rat mesenteric resistance vessels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 95, p. 103, 1988. VILLA, L.M.; SALAS, E.; DARLEY-USMAR, V.M.; RADOMSKI, M.W.; MONCADA, S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 12383-12387, 1994.

WANG, Y. X.; LEGZDINS, P.; POON, J. S.; PANG, C. C. Vasodilator effects of organotransition-metal nitrosyl complexes, novel nitric oxide donors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 35, p. 73-77, 2000.

WIERASZKO, A. Y.; CLARKE, M. J.; LONG, D. R.; LOPES, L. F. G.; FRANCO, D. W: The influence of NO-containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. **Life Science**, v. 68, p. 1535-1544, 2001.

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

APÊNDICE – Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA GERAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente termo de consentimento, eu _____ (Responsável pela doação), _____ (identidade), _____ (naturalidade), _____ (estado civil), residente a _____ (endereço), cidade de _____, _____ (parentesco) do _____ (doador), internado no Hospital _____ no dia _____, prontuário: _____, que teve sua morte encefálica e/ou PCR às _____ do dia _____, e após exames clínicos e complementares por equipe médica especializada, autorizo, de minha livre e espontânea vontade, a remoção de fragmentos de corpo cavernoso, os quais serão utilizados para fins de pesquisa científica nos termos da lei n° 8.489 de 18 de novembro de 1992, regulamentada pelo decreto n° 879 de 22 de julho de 1993. Fui informado(a) claramente que a referida remoção é realizada pela mesma incisão (corte) utilizada para retirada dos órgãos para transplante, e que os fragmentos destinam-se a fins científicos (pesquisa *in vitro*). A publicação dos resultados deste estudo não terá identificação do doador.

_____, _____ de _____ de _____

ass: _____

Testemunhas:

_____ RG: _____

_____ RG: _____

Dr. Alexandre Saboia Leitão Júnior

Pesquisador Responsável Universidade Federal do Ceará

ANEXO– Material cirúrgico utilizado nos experimentos

<i>2 pinças prensão tipo mosquito</i>	Edlo, Brasil
2 pinças anatômicas tipo addison	Edlo, Brasil
1 tesoura oftálmica	Edlo, Brasil
2 placas de Petri	

