



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS**

**ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO COMPOSTO DO IWP-051, UM  
ESTIMULADOR DA GUANILATO CICLASE NA MUSCULATURA  
LISA CAVERNOSA DE HUMANOS**

**FORTALEZA**  
**2022**

**ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO COMPOSTO DO IWP-051, UM  
ESTIMULADOR DA GUANILATO CICLASE NA MUSCULATURA  
LISA CAVERNOSA DE HUMANOS**

Tese submetida à coordenação de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira

**FORTALEZA  
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L548a Leitão Júnior, Alexandre Saboia.

Avaliação da ação composto do IWP-051, um estimulador da guanilato ciclase na musculatura lisa cavernosa de humanos / Alexandre Saboia Leitão Júnior. – 2022.  
80 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira.

1. Disfunção Erétil . 2. Óxido Nítrico . 3. Guanilato Ciclase. I. Título.

CDD 617

---

**ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO COMPOSTO DO IWP-051, UM  
ESTIMULADOR DA GUANILATO CICLASE NA MUSCULATURA  
LISA CAVERNOSA DE HUMANOS**

Tese submetida à coordenação de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

---

Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Co-Orientador: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

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

## Agradecimentos

Ao Prof. José Alberto Dias Leite pela oportunidade de realizar esse trabalho na pós-graduação de Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona por abrilhantar com sua presença na banca de doutorado, certo de que muito contribuirá para a melhoria desse trabalho

Ao Prof. Dr. Cristiano Mendes Gomes por contribuir com sua estimada presença na banca, demonstrando o apreço pela ciência

Ao Prof. Dr. Ricardo Reges Maia de Oliveira, orientador, mentor e amigo, pelas oportunidades, ensinamentos e palavras de incentivo, além de grande exemplo de cientista e pensador.

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.

Ao Professor Prof. Dr. Eduardo de Paula Miranda pela amizade e pela disponibilidade de contribuir na confecção e avaliação dessa Tese

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

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

Ao Colega Doutorando Iury Paz pela intensa parceria, e enorme ajuda em todas as etapas desse trabalho, tornando-se indispensável para a realização deste.

À Dra Eliane e a todas as enfermeiras da central de transplantes do IJF, 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, incansáveis nessa árdua e nobre tarefa

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, Prof. Dr. Rommel Prata Regadas, Dr. Romulo Farias, Dr. Rafael Guimarães, Dr. Raphael Farias, Dr. Daniel Gomes e Thiago Santos pelo incentivo para a ciência e a amizade.

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

A Deus pedra angular da minha existência.

À minha esposa, Jaquellyne, por ser minha razão de existir e fonte de inspiração

Aos Meus Filhos Catarina, Clarissa e Miguel meus mais preciosos feitos

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

## 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 é importante para diminuir o impacto dessa doença. O estudo avaliou o relaxamento, *in vitro*, induzido por um novo fármaco estimulador da Guanilato ciclase solúvel (IWP-051) em faixas de tecidos 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 (PE 10 $\mu$ M) e curvas de concentração-resposta ( $10^{-12}$  a  $10^{-4}$ ) foram obtidas. No primeiro experimento o fármaco era comparado com o Tadalafila. Para esclarecer o mecanismo pela qual esse fármaco promove seu relaxamento e o seu efeito sinérgico com outras classes foram realizados os seguintes experimentos: avaliação do relaxamento alcançado com a contração com  $K^+$ 80mM, adição de um inibidor da Óxido Nítrico sintase (NOS), L-NAME (100 $\mu$ M); adição de ODQ (10 $\mu$ M), um inibidor da Guanilato Ciclase solúvel; Glibenclamida (10 $\mu$ M), um bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente ( $K_{ATP}$ ) e o HA1077 um inibidor da ROCK. Além disso, foi avaliado o efeito da droga em contrações espontâneas, ao final dosou-se a fosforilação da VASP e o GMPc tecidual. A substância provocou um relaxamento máximo ( $E_{MAX}$ ) na musculatura lisa de corpo cavernoso importante, com potência (pEC50) boa ( $E_{MAX} = 107,37\% \pm 2,98\%$  e  $pEC50=6,289\pm 0,09787$ ). Comparou-se com a Tadalafila, e não houve diferença nem no  $E_{MAX}$  ( $P=0,0817$ ) nem pEC50 ( $P=0,1823$ ). Apesar de não ter tido inibição do efeito relaxante máximo da droga com L-NAME ( $p>0,05$ ), observou-se um importante desvio da curva para a direita, reduzindo a potência da droga em mais de 10 vezes ( $p<0,0001$ ). Mesmo efeito alcançado com a adição ODQ (10 $\mu$ M) ao banho no pEC50 ( $p<0,001$ ). O  $E_{MAX}$  alcançado na curva concentração-resposta com  $K^+$  80mM foi cerca de 20% menor que a curva com PE (10 $\mu$ M) ( $p<0,0001$ ). Não houve bloqueio de efeito máximo do fármaco com a Glibenclamida (10 $\mu$ M) ( $p>0,05$ ). A adição da substância aboliu as contrações espontâneas na concentração de  $10^{-5}$ M. Houve aumento da fosforilação da VASP (3x em relação ao controle  $p<0,05$ ) com redução parcial com adição de ODQ ( $p<0,05$ ). A concentração do GMPc nas tiras tratadas com IWP-051 foi cerca de 3 vezes maior que o controle negativo ( $p<0,05$ ) e parcialmente bloqueada pelo ODQ ( $p<0,05$ ). O IWP-051 é uma substância estimuladora da GCs, potente relaxadora da musculatura lisa do corpo cavernoso humano. A substância possivelmente depende da ação da NOS, atua,

provavelmente ativando a Guanilato ciclase solúvel, produzindo GMPc. Parece atuar nos canais de potássio, e não atuam no  $K_{ATP}$ . Finalmente o IWP, abole as contrações espontâneas.

**Palavras chave:** Disfunção erétil; Óxido nítrico-antagonistas e inibidores; Guanilato ciclase-antagonistas e inibidores.

## 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 Guanylate Cyclase stimulator (IWP-051) 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<sup>+</sup> solution, and later again with Phenylephrine (PE 10 μm) and concentration-response curves (10<sup>-12</sup> to 10<sup>-4</sup>M) were obtained. Initially the drug was compared with Tadalafil. To clarify the mechanism by which this drug promotes relaxation, the following experiments were carried out: effect of an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), L-NAME (100 μm); addition of ODQ (10 μM), an inhibitor of the soluble Guanylate Cyclase; evaluation of relaxation achieved with the contraction with 80 mm K<sup>+</sup>; Glibenclamide (10 μm), a potassium ion channel blocker ATP-dependent (K<sub>ATP</sub>). It was observed, during the experiments the presence of spontaneous contractions, and the effect of the drug on those contractions were studied. It was also measured the phosphorylation of VASP, and measurement of GMPc concentration. The substance caused an E<sub>MAX</sub> relaxation in smooth muscle of the corpus cavernosum (E<sub>MAX</sub> = 107.37 % ± 2.98%. and pEC<sub>50</sub>=6.289±/-. 0.09787). Comparing IWP-051 with tadalafil, there were no difference between both E<sub>MAX</sub> (p = 0.0817) or pEC<sub>50</sub> (p=0.1823). Although there was no inhibition of the maximal relaxation with the addition of L-NAME, a right shift of the relaxation curve of the drug was observed (p<0.0001), reducing the potency in 10 times. The same results were observed when adding ODQ (10 μM) into the bath (p<0.001). The E<sub>MAX</sub> achieved in concentration-response curve with 80 mm K<sup>+</sup> was about 20% lower than the curve with PE (10 μm) (p < 0.001). The addition of 10<sup>-5</sup>M of IWP-051 abolished all spontaneous contractions. There was no inhibition or blockade of the maximum effect of the drug with Glibenclamide (10 μm) (p> 0.05). The addition of IWP-051 in HCC strips increased the phosphorylation of VASP by 3 times compared with the control (DMSO), and the effect was reduced by the addition of ODQ (p<0.05). GMPc measurement also increased in the presence of IWP-051 by 3 times and was also partially abolished by adding ODQ (p<0.05). Iwp-051 is a sGC stimulator, it produces a powerful relaxation of the smooth muscle of the corpus cavernosum. It depends on NOS to improve your potency, It acts by activating



the soluble guanylate Cyclase. It seems that it does activate potassium channels, and it do not act through  $K_{ATP}$ . It abolishes spontaneous contraction.

**Keywords-nitric:** Erectile dysfunction; oxide-antagonists and inhibitors.Cyclic GMP-antagonists and inhibitors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do corpo Pênis.....	22
Figura 2 – Suprimento arterial e drenagem venosa dos corpos cavernosos.....	23
Figura 3 – Esquema da inervação peniana.....	24
Figura 4 – Estado flácido onde não há compressão do plexo venoso.....	25
Figura 5 – Compressão do plexo venoso com diminuição do efluxo sanguíneo.....	25
Figura 6 – Esquema representativo da via do Óxido nítrico.....	27
Figura 7 – Farmacologia da ereção peniana: Vias de relaxamento do corpo Cavernoso.....	28
Figura 8 – Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos.....	36
Figura 9 – Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo.....	37

Figura 10 – Fragmento de corpo cavernoso humano banhado em Krebs.....	37
Figura 11 – Fragmento de corpo cavernoso montado no banho de tecidos.....	38
Figura 12- Sistema de banhos isolados.....	38
Figura 13 – Imunohistoquímica mostrando células ckit +, em lâmina de faixa de CCH.....	54
Quadro 1 – Características demográficas da população de doadores não-vivos.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Traçado de uma curva de contração- relaxamento com o uso da IWP-051, em concentrações crescentes.....	45
Gráfico 2 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com o controle Tadalafila em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano (n= número de experimentos).....	45
Gráfico 3 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Bloqueador L-NAME em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano (n= número de experimentos).....	46

Gráfico 4 – Traçado de uma curva de contração- relaxamento com o uso da IWP-051, em concentrações crescentes, após incubação com ODQ (10 $\mu$ M).....	47
Gráfico 5 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Inibidor da GCs ODQ (10 $\mu$ M) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos).....	48
Gráfico 6 – Gráfico em barras comparando o pEC50 do IWP-051 com o efeito do inibidor da GCs ODQ.....	48
Gráfico 7 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 na contração com PE e KCl 80 mM em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos).....	49
Gráfico 8 – Em barras comparando o Emax da contração com PE e KCl 80mM.....	50
Gráfico 9 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Bloqueador de K <sub>ATP</sub> Glibenclamida (10 $\mu$ M) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos).....	51
Gráfico 10 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o inibidor da ROCK HA 1077 (10 $\mu$ M) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos).....	52
Gráfico 11 – Gráfico em barras comparando o Emax IWP-051 X IWP+HA 1077.....	52
Gráfico 12 – Registro de um experimento com tira de corpo cavernoso humano, com a adição do IWP com concentrações crescentes.....	53
Gráfico 13 – Gráficos em barra, comparando as diferenças de frequência e a amplitude das contrações espontâneas.....	53
Gráfico 14 – Gráfico em colunas com dosagem de VASP.....	54
Gráfico 15 – Gráfico em colunas com dosagem de GMPc dos diferentes grupos.....	55

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e Tadalafila.....	46
Tabela 2 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e IWP+L-NAME.....	47

Tabela 3 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e IWP+ODQ.....	49
---	----

### **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância <i>one-way</i>
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
CC	Corpos Cavernosos

CCH	Corpos Cavernosos de Humano
CNP	Peptídeo Natriurético do tipo C
CONEP	Conselho Nacional de Saúde
DE	Disfunção Erétil
E <sub>MAX</sub>	Percentual Máximo de relaxamento induzido pela substância
NOSe	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
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 <sub>ATP</sub>	Canais de íons potássio metabolicamente ativos dependentes de ATP Trifosfato de Adenosina
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
MMAS	Massachusetts Male Aging Study
M	Molar
MS	Ministério da Saúde
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PDE	Fosfodiesterase específica do GMPc
pEC50	Cologaritmo da concentração da substância que provoca 50% do efeito máximo
PE	Fenilefrina
PKG	Proteínoquinase
SNACET	S-nitroso-N acetilcisteína
SNP	Nitroprussiato de Sódio

TCA	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

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Definição.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Histórico e Etiologia.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Bases anatômicas e fisiofarmacológicas da ereção.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 O papel do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Drogas testadas para o tratamento da Disfunção Erétil.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Estimuladores e ativadores da Guanilato Ciclase.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Aspectos éticos e local do estudo .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Fármacos e substâncias.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Material cirúrgico e laboratorial.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Preparação dos corpos cavernosos.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5 Protocolos experimentais.....</b>	<b>38</b>
<i>3.5.1 Avaliação do efeito relaxante da substância IWP-051 na musculatura lisa cavernosa de humanos.....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.2 Avaliação dos efeitos relaxantes da substância Tadalafila.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.3 Avaliação do efeito do inibidor da NO sintase sobre o relaxamento produzido pela substância IWP-051.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.4 Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido substância do grupo estudada.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.5 Avaliação do fármaco IWP-051 na contração com K<sup>+</sup> 80mM.....</i>	<i>39</i>
<i>3.5.6 Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (KATP).....</i>	<i>40</i>
<i>3.5.7 Efeito do bloqueador da Rho quinase HA1077.....</i>	<i>41</i>
<i>3.5.8 Relaxamento contrações espontâneas.....</i>	<i>41</i>
<i>3.5.9 Fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP).....</i>	<i>41</i>
<i>3.5.10 Dosagem de GMPc tecidual.....</i>	<i>41</i>
<b>3.6 Análise Estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>

4.1	Amostras.....	44
4.2	Efeito relaxante do IWP-051 e comparação do efeito do IWP-051 com o controle Tadalafila.....	45
4.3	Efeito do L-NAME (100µM) um importante inibidor da NOs no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado.....	46
4.4	Efeito da inibição da enzima Guanilato ciclase solúvel por um inibidor específico do grupo heme da enzima (ODQ;10µM) e no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado.....	47
4.5	Efeito do IWP-051 na contração realizada com K <sup>+</sup> 80mM, comparando com a ação na contração realizada por fenilefrina.....	49
4.6	Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K <sub>atp</sub> ), glibenclamida (10µM) no relaxamento induzido pela substância IWP-051 no tecido estudado.....	50
4.7	Efeito do inibidor da Rho quinase HA1077 sob o relaxamento induzido pelo IWP-051.....	51
4.8	Relaxamento de contrações espontâneas.....	53
4.9	Dosagem da Fosfoproteína estimulada por vasodilatador(VASP).....	54
4.10	Dosagem do GMPc após o estímulo das substâncias estudadas.....	55
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO.....	78
	ANEXO A – MATERIAL CIRÚRGICO USADO NOS EXPERIMENTOS.....	81
	ANEXO B – LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	82



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Definição

A Disfunção Erétil é um problema que afeta os homens desde a antiguidade. Até meados de 1990, era conhecida por impotência sexual, porém, em 1993, após o consenso do Instituto de Saúde dos Estados Unidos da América, definiu-se como disfunção erétil como a incapacidade persistente de obter ou manter uma ereção suficiente que possibilite a penetração vaginal e uma atividade sexual satisfatória (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT, 1993). Não se define um tempo específico para definir como uma doença, porém comumente estipula-se 6 meses (SOORIYAMOORTHY; LESLIE, 2021).

## 1.2 Histórico e Etiologia

Apesar de muitos acreditarem que a disfunção erétil é uma doença do homem moderno (SKETEL, 1927), os primeiros relatos de impotência datam de 2000a.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 (BRENOT, 1994).

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 800a.C. a disfunção erétil e já a colocavam com uma possível patologia 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 isquicavernoso e bulbocavernoso comprimiam o bulbo do pênis, impedindo o retorno do pênis (SHAH, 2002). Já em 1668, o alemão Regnier de Graaf desenvolveu essa teoria e injetou fluido dentro dos cadáveres, e notou que ao injetar líquido na artéria hipogástrica, o pênis imediatamente ficava ereto. (JOCELYN; SETCHELL, 1972).

No “Livro da reprodução”, em 1585, Ambroise Paré descreveu em detalhes a anatomia peniana, atribuindo à entrada de sangue nos corpos cavernosos, a fisiologia da ereção. Esse trabalho foi o primeiro a estabelecer as bases anatômicas e fisiológicas para a Ereção (BRENOT, 1994).

Já em 1948, Kinsey mostrava 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 (KINSEY; POMEROY; MARTIN, 2003).

Dados modernos estimam que 55 % dos homens apresentam DE na idade de 75 anos (JOHANNES et al., 2000; MELMAN; GINGELL, 1999). Outro estudo realizado na *Massachusetts Male Aging Study* (MMAS), encontrou que a probabilidade do homem apresentar disfunção erétil severa aumenta de 5,1% para 15% quando a idade varia de 40 para 70 anos (JOHANNES et al., 2000). Outros dados selecionados de estudos de base populacional nos Estados Unidos tem demonstrado e confirmado dados de 40% de DE em pacientes com 40 anos e cerca de 70% em pacientes com mais de 70 anos (FELDMAN et al., 1994).

Estima-se que cerca de 322 milhões de homens serão acometidos de Disfunção erétil em 2025, um aumento de cerca de 111% em relação aos dados de 1995 (AYTAÇ; MCKINLAY; KRANE, 1999). Num estudo recente, com cerca 97000 pacientes acima de 18 anos em 8 países, inclusive o Brasil, mostrou uma prevalência de DE, de uma forma geral acima de 40%, em paciente entre 40-70 anos (GOLDSTEIN et al., 2020).

No Brasil, as estimativas apontam que mais de 40% dos brasileiros entre 40 e 70 anos sofram desta condição (MOREIRA et al., 2001) e que pelo menos um milhão de novos casos surjam por ano nesta mesma faixa etária (MOREIRA JÚNIOR et al., 2002). Dados mais recentes, mostraram uma prevalência de cerca de 42% em pacientes acima de 40 anos (GOLDSTEIN et al., 2020).

A etiologia da DE é muitas vezes multifatorial, mas do ponto de vista clínico pode ser dividido em orgânico, relacional e psicogênico. No passado, achava-se que a DE seria uma doença principalmente psicogênica, contudo, novos dados têm demonstrado que cerca de 80% dos casos são orgânicos. Frequentemente, associa-se o componente orgânico a fatores psicológicos e relacionais, que no final contribuem negativamente para a qualidade de vida do paciente (YAFI et al., 2016).

Além da idade, outros fatores têm sido implicados para o aumento da incidência de DE, sendo eles: doença cardiovascular, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes,

hipogonadismo, obesidade, tabagismo, alcoolismo, hiperplasia prostática benigna, depressão e ejaculação precoce (SOORIYAMOORTHY; LESLIE, 2022).

Além da idade, dentre os fatores de risco, a doença coronariana é a mais relacionada com a DE. Ambas as condições partilham fatores de risco semelhantes, e a presença de uma sempre indica que a outra pode estar presente (SOORIYAMOORTHY; LESLIE, 2022).

De acordo com Montorsiet *al.* (2003), 50% dos pacientes com doença coronariana submetidos a cateterismo possuem DE associada. Essa correlação pode ser explicada pois ambas as artérias (cavernosa e coronariana) tem calibres semelhantes, e as alterações ateroscleróticas compartilham a mesma fisiopatologia. A aterosclerose está diretamente relacionada com a disfunção endotelial (GUAY, 2005).

Em uma metanálise com mais de noventa mil homens, somente a presença de DE aumentou em 44% o risco de eventos cardiovasculares, 62% de Infarto agudo do miocárdio, 39% de AVC e 25% mais risco de morte. (VLACHOPOULOS et al., 2013).

Devido ao grande impacto que essa doença representa na saúde do homem, e essa grande prevalência, 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 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 (LUE, 2000; ANDERSSON; WAGNER, 1995). Esses corpos cavernosos são separados por um mesmo septo que se comunicam, permitindo a comunicação dos seios venosos. Na parte distal, esses corpos cavernosos são cobertos pela glândula, que compreendem uma continuação do corpo esponjoso que recobre a uretra (YIEE; BASKIN, 2010).

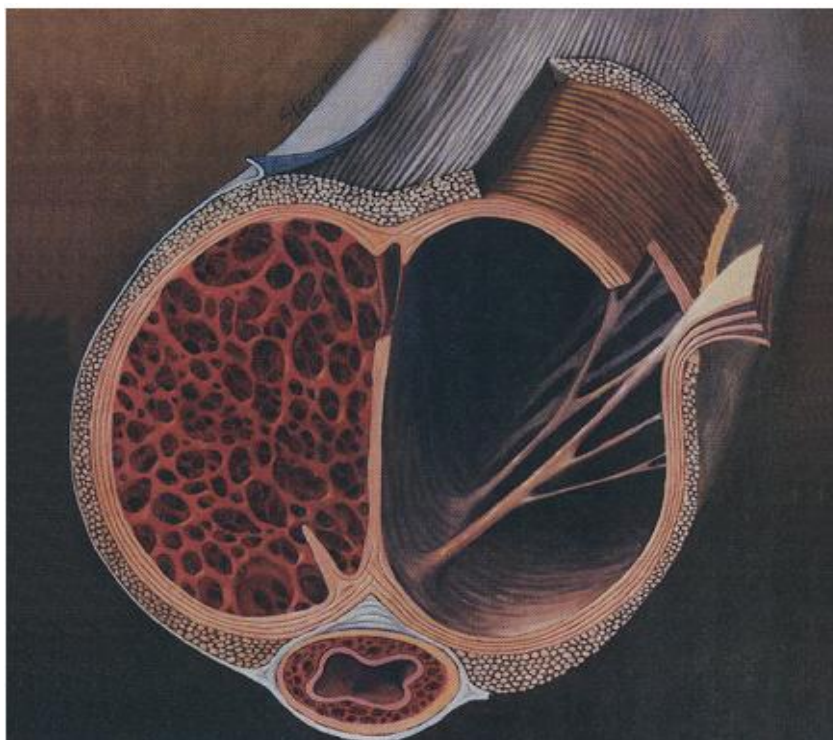
Compreendem uma rede de sinusóides supridos pelas artérias helicinais, que são ramos terminais das artérias cavernosas. No estado flácido, as trabéculas do músculo liso dos corpos cavernosos, os quais sustentam os sinusóides vasculares, estão tonicamente contraídos e permitem apenas uma pequena quantidade de influxo arterial (BURNETT, 1992). A liberação

de neurotransmissores de terminais dos nervos cavernosos e do endotélio em resposta à estimulação sexual resulta em relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e ereção peniana.(MACDONALD; BURNETT, 2021)

O suprimento arterial é composto por 3 ramos principais e em pares: cavernosa, dorsal e bulbouretral. Todos esses ramos são oriundos da artéria pudenda interna, ramo da íliaca interna. A artéria cavernosa bilateralmente emite ramos para dentro do corpo cavernoso e vão ocupar a parte central dos sinusóides, emitindo as artérias helicinais que são ramos terminais da mesma. A artéria dorsal do pênis vai irrigar a glândula e seus ramos ermiais fazem anastomoses com ramos terminais da artéria cavernosa. (YIEE; BASKIN, 2010)

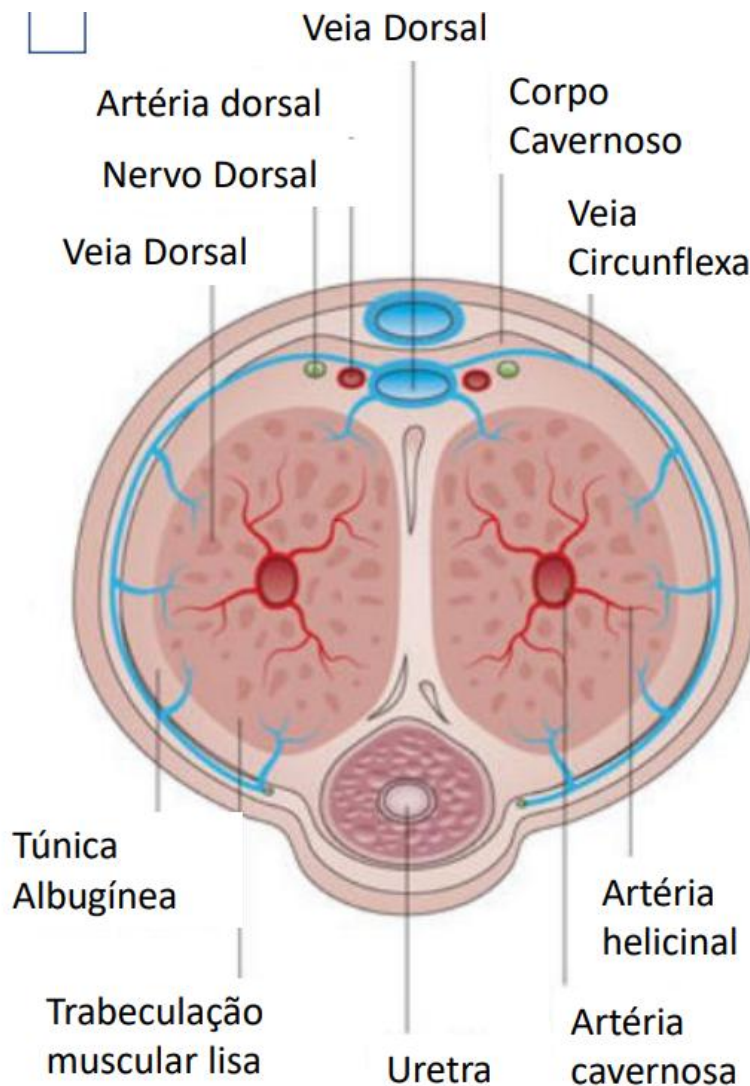
A drenagem venosa é realizada por pequenas veias formadas dentro do corpo cavernoso, abaixo da túnica albugínea, elas se unem para formar a veia dorsal profunda que em última instância forma a veia pudenda interna (LUE, 2002; ABDEEN; LESLIE, 2022) (FIGURA 2). Essa distribuição é importante pois a compressão das veias emissárias, entre as camadas da túnica albugínea, permite a manutenção da ereção, aumentando a pressão intracavernosa, e impedindo a drenagem rápida do sangue intracavernoso(HSU et al., 2003; YIEE; BASKIN, 2010).

Figura 1 – Estrutura do corpo Pênis



Fonte: LUE *et al.* (2012, p. 613).

Figura 2 – Suprimento arterial e drenagem venosa dos corpos cavernosos

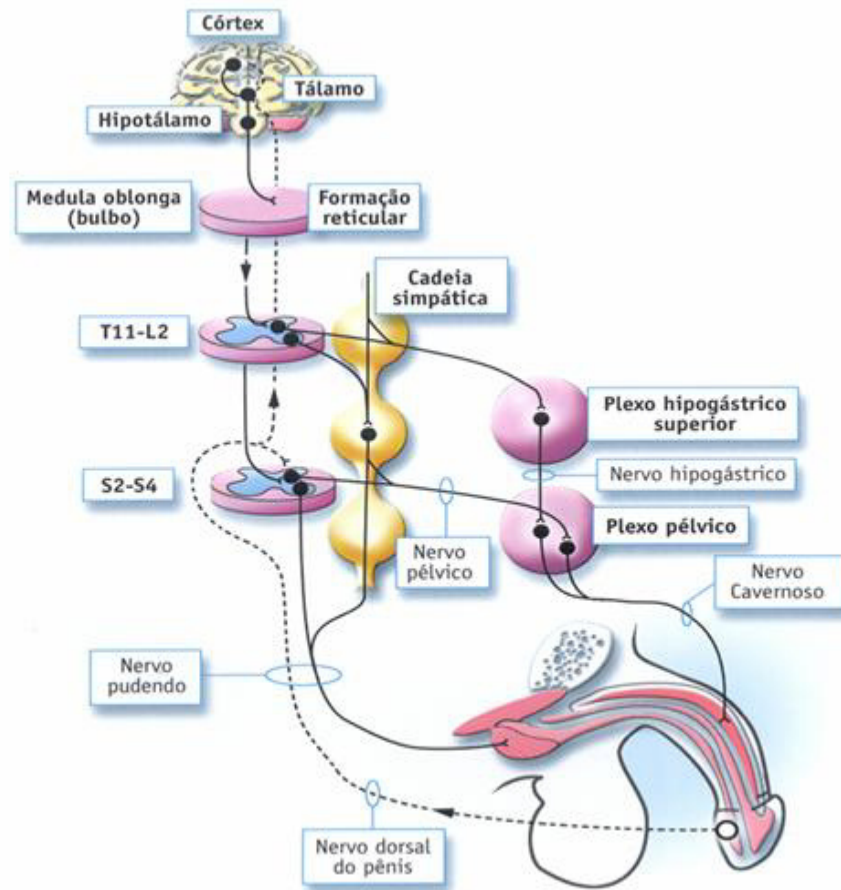


**Fonte:** Adaptado de YAFI et al. (2016).

A inervação peniana pode ser dividida em autonômica (simpática e parassimpática) e somática (sensitiva e motora) (PRIETO, 2008). 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 espinho-talâmico até o tálamo e córtex sensitivo (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

Já 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 nos últimos neurônios nitrérgicos, liberam NO estimulando a produção de GMPc, responsáveis pela fase erétil (ANDERSSON, 2011; YIEE; BASKIN, 2010).

Figura 3–Esquema da inervação peniana



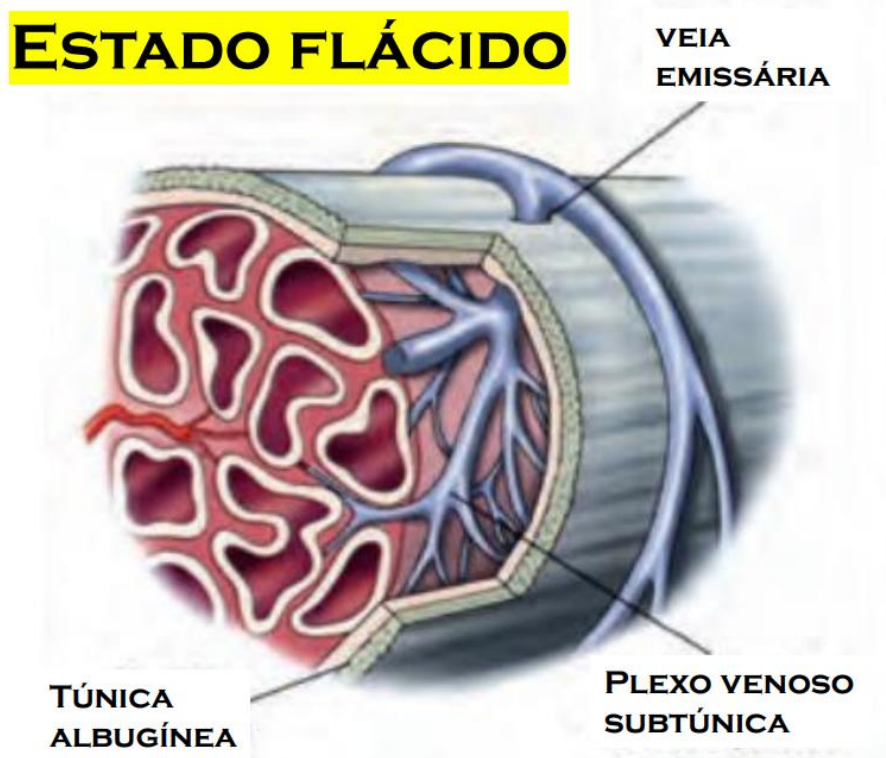
Fonte: GLINA *et al.*(2002, p. 29).

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 (FIGURA 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; ANDERSSON, 2011; MACDONALD; BURNETT, 2021).

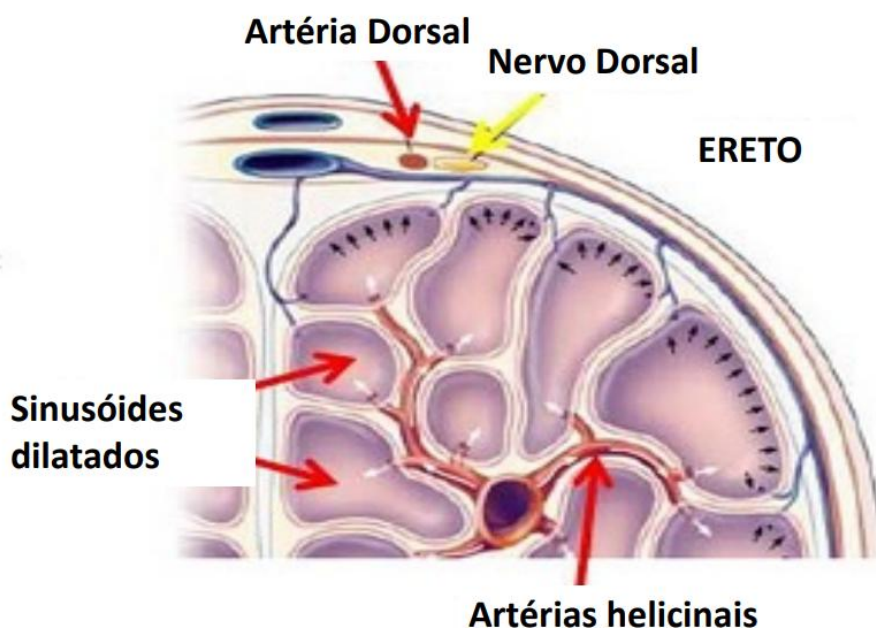
Figura 4 – Estado flácido onde não há compressão do plexo venoso.



Fonte: Adaptado de LUE *et al.* (2012).



Figura 5 – Compressão do plexo venoso com diminuição do efluxo sanguíneo.



Fonte: Adaptado de LUE *et al*, 2012.

### 1.3 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 colmostraram em um trabalho muito bem desenhado, em faixas teciduais de aorta de coelho que a acetilcolina só causava relaxamento da musculatura lisa na presença de células endoteliais, que quando as faixas de tecidos 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(FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Em 1987, já estava bem estabelecida a presença de um Fator de Relaxamento Endotelial, porém ainda não se sabia que molécula era responsável por esse efeito. Havia sido sugerido por Furchgott que esse fator de relaxamento poderia ser o óxido nítrico. Em um trabalho com cultura de células endoteliais de suínos, estudou-se a atividade do óxido nítrico e do Fator de Relaxamento Endotelial, onde foi demonstrado que a atividade dos dois componentes era igual, estabelecendo que os dois componentes eram semelhantes (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987).



A descoberta do Óxido Nítrico como fator de relaxamento e responsável como neurotransmissor de fibras não-adrenérgicas não colinérgicas, fez com que o óxido nítrico se tornasse um transmissor atraente para a ereção (RAJFER et al., 1992).

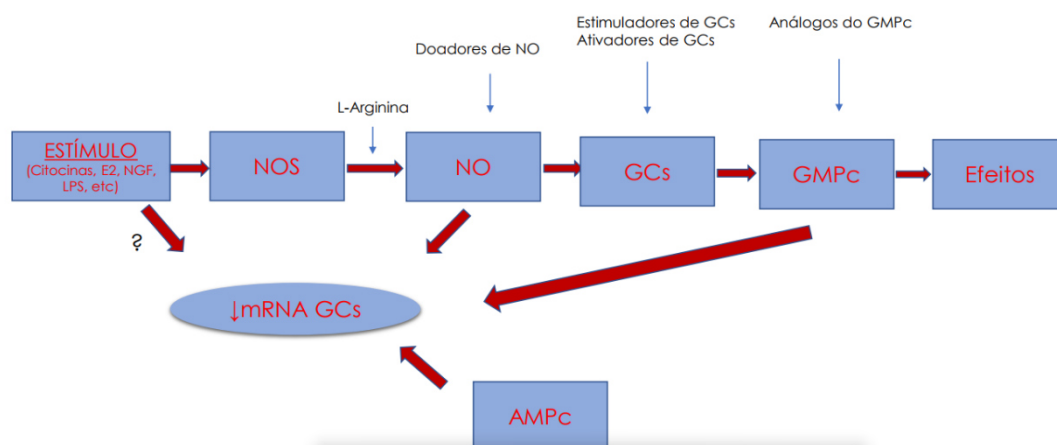
Estudando corpos cavernosos de coelho, Ignarro(1990) descobriu o papel do óxido nítrico e ativação da Guanilato ciclase solúvel, no relaxamento da musculatura lisa cavernosa. Em 1992, estudando tecidos humanos retirados em cirurgias de prótese peniana colocados em banhos de soluções, conseguiu-se definir em testes com eletroestimulação que o óxido nítrico é o principal mediador da ereção também em humanos. A ativação da Guanilato ciclase solúvel já havia sido provada em 1977 por Arnold *et al.* (1977).

No mesmo ano, Burnett *et al.* (1992), demonstrou através de estudos com imunohistoquímica a presença de NO sintase em corpos cavernosos de ratos, demonstrando e definindo a via da NOS como a principal via no relaxamento do corpo cavernoso.

Hoje em dia, 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 ((BURNETT et al., 1992, 1993; GONZALEZ-CADAVID, 1999; RAJFER, 1999; IGNARRO, 1990; KIM et al., 1991; KNISPEL; GOESSL; BECKMANN, 1992; MACDONALD; BURNETT, 2021; PICKARD; POWELL; ZAR, 1991; STIEF et al., 1991; TRIGO-ROCHA et al., 1993)

A produção de óxido nítrico é realizada por uma enzima chamada Óxido Nítrico Sintase (NOS), existindo em pelo menos 3 isoformas (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). A primeira é a NOS1 (NOS<sub>n</sub>), produzido nos neurônios e tem como papel principal o neurotransmissor, segunda é a NOS 2 (NOS<sub>i</sub>) produzida por células como macrófagos, hepatócitos células musculares lisas, e é induzida por processo inflamatório, como resposta citotóxica, e é ativada independente do cálcio (LUO et al., 2014). A terceira isoforma é a NOS 3 (NOS<sub>e</sub>), essa forma é a enzima que produz o fator de relaxamento endotelial (NO) (BURNETT et al., 1992; KOTS; BIAN; MURAD, 2011; MURAD, 2004; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015) (Figura 5). A síntese de óxido nítrico, com estímulo neuronal, a partir da arginina sob a ação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS<sub>n</sub>) e sua ligação com a enzima Guanilatociclase solúvel (GCs) constitui passo essencial para o início e manutenção do processo erétil (HEDLUND et al., 2000).

Figura 6 – Esquema representativo da via do Óxido nítrico.



**Fonte:** Adaptado de 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, este último ativado pela Guanilato ciclase solúvel é a principal via de relaxamento do corpo cavernoso. Esta enzima atua em alvos intracelulares fosforilando receptores de inositol trifosfato (PI3), ativando canais de íon potássio, causando hiperpolarização celular e diminuindo o transporte de íons cálcio para o citosol(XIAO et al., 2019).

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 (ANDERSSON, 2011; CORBIN; FRANCIS, 1999; MACDONALD; BURNETT, 2021)(Figura 6).

A dissociação da miosina de cadeia leve é realizada pela enzima Fosfatase miosina de cadeia leve (MLPC), cuja ativação promove relaxamento muscular. A enzima ROCK regula esse mecanismo, que quando ativada, desfosforila (inativa) a MLPC e permite a ligação entre as fibras de miosina e actina(LINDER et al., 2005; MACDONALD; BURNETT, 2021).

Figura 7 – Farmacologia da ereção peniana: Vias de relaxamento do corpo Cavernoso.



sítios. Essas drogas possuem até 1000 vezes mais afinidade pelo sítio que o GMPc. Na ausência da via do NO, essas drogas são ineficazes. Em faixas teciduais de corpo cavernoso, se não houver a presença de doadores de NO, essas drogas não induzem relaxamento (CORBIN, 2004).

Outro mecanismo implicado no relaxamento do corpo cavernoso são os doadores de óxido nítrico. Estudos iniciais realizados em hipocampo de ratos, Wierasko e cols 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. 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. Adicionalmente sua degradação fotoquímica e liberação de cianeto com efeitos tóxicos importantes limita seu uso clínico, destaca-se ainda serem menos efetivos quando dados intracorpóreo (MARTINEZ-PINEIRO et al., 1995; KISHIMOTO et al., 2021).

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 utilizado em estudos com faixas de tecidos de corpos cavernosos humanos montados em sistemas de banhos isolados e apresentaram um promissor potencial de relaxamento tecidual (SEIDLER et al., 2002).

Um 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, foram utilizadas 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., 2007a; LUNARDI; DA SILVA; BENDHACK, 2009)

Utilizando aorta de rato estes pesquisadores demonstraram potente efeito relaxante do endotélio vascular por parte deste grupo de doadores de NO. Nesse contexto, 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. Nestes experimentos, 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 ( $K^+_{atp}$ ).

Venkateswarluet *al.* (2002) demonstraram 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 ( $K^+_{ca}$ ). Buscando entender o papel dos canais de potássio, outros autores provaram 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(PRIETO et al., 2006).

Bonaventuraet *al.* (2007) mostraram que a incubação dos tecidos com um bloqueador inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio, reduziu significativamente o relaxamento induzido pelas substâncias do complexo nitrosil-rutênio.(BONAVENTURA et al., 2007b)No mesmo estudo, utilizando aorta de coelho os autores demonstraram que um novo doador de óxido nítrico do complexo age doando tanto NO, como NO-(ânionanitrosil), enquanto o SNP age somente NO\*. Além disso, esse mecanismo não envolve a ativação retículo sarcoplasmático. (BONAVENTURA et al., 2008)

Novas drogas com composições químicas semelhantes têm sido implicadas em relaxamento de músculo liso de corpo cavernoso. Cerqueira *et al.* (2008), em um estudo com corpo cavernoso de coelho e faixas de tecidos de aorta demonstrou que dois novos compostos do complexo nitrosil rutênio são potentes drogas vasodilatadores, e uma delas produziam um importante relaxamento no corpo cavernoso, comparável ao SNP.

Em um estudo bem desenhado, Leitão Júnior(2016) apresentou o efeito de um novo metalofármaco (FOR0811), derivado do imidazol, em faixas teciduais de corpos cavernosos humanos, de doadores falecidos. Foi demonstrado que essa substância produzia efeitos relaxantes semelhantes ao SNP, com potência semelhante a um estimulador direto da Guanilato ciclase o BAY 41-2272. Nesse mesmo estudo, foi mostrado que essa droga não agia através de canais de potássio ( $K_{atp}$ ), e que a mesma droga produzia concentrações consideráveis de GMPc, superiores estatisticamente ao controle e inferiores ao SNP (LEITÃO JUNIOR, 2016).

Esses dados contribuem para a ideia de que a via do NO-GCs-GMPc é crucial para regular o fluxo sanguíneo nos tecidos. Alterações na função da GCs, como também a redução da concentração de óxido nítrico nos tecidos, tem sido implicado em doenças cardiovasculares, pulmonares, renal, hepáticas, e também na Disfunção erétil (NAKAI et al., 2016).

Contudo, em situações de estresse oxidativo, o mesmo que encontramos em doenças cardiovasculares, as espécies reativas de oxigênio (ROS) reduzem o ferro da GCs, não respondendo mais a NO (FOLLMANN et al., 2013). Dessa forma, o efeito de drogas que agem através da via NO-GCs-GMPc é extremamente limitado, isso inclui os inibidores da PDE 5 assim como os doadores de NO. Além disso, esses últimos tem outros dois problemas: a variabilidade interindividual de metabolismo e o desenvolvimento de tolerância.

### **1.6 Estimuladores e ativadores da Guanilato Ciclase**

A guanilato ciclase é um enzima importante para vários mecanismos de sinalização celular. Existem dois subtipos que se caracterizam pela localização na célula. A primeira é a GC de membrana que se trata de um receptor transmembrana plasmática, cujos agonistas são peptídeos como Natriurético tipo A, B e C, além da uroguanilina. (SOUSA et al., 2010). A segunda, e mais utilizada como alvo para intervenção farmacológica é a guanilato ciclase solúvel, enzima inteiramente citoplasmática que é estimulada principalmente por agonistas gasosos (CO e NO), e uma gama de medicações chamadas de estimuladoras e ativadoras. (FOLLMANN et al., 2013; GRZEŚK; NOWACZYK, 2021)

A GC é estimulada por três substâncias, o NO, o peptídeo natriurético e compostos exógenos como o Monóxido de Carbono (CO) (ANDERSSON, 2011). Dois tipos de Peptídeos Natriuréticos tem efeito no relaxamento de CCH, demonstrado em faixas de tecidos de corpos cavernosos de humano, o CNP e o ANP. Em um estudo realizado em CCH, foi demonstrado que tanto o ANP como a uroguanilina tiveram um efeito relaxante em faixas de tecidos 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).

A ativação da Guanilato ciclase solúvel é uma forma de estimular o relaxamento da musculatura lisa do CCH sendo essa enzima expressada por todo tipo de células (LUCAS et al., 2000). A GCs é uma proteína de origem citosólica, composta por duas unidades, uma alfa

e uma beta, na qual existe um domínio Heme. Através da ligação do NO nesse domínio, existe uma nova conformação na subunidade catalítica, com aumento da produção do GMPc que estimula as proteíno-quinases intracelulares, canais de íons e fosfodiesterases, determinando seus múltiplos efeitos fisiológicos (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017).

Uma alternativa aos doadores de NO, são drogas que ativam diretamente a GCs, ligando de forma alostérica ao ferro, estimulando a formação de GMPc (FOLLMANN et al., 2013) Essas classes agem de duas formas: independente ao NO e sinergicamente aumentando a capacidade na GCs. Essa classe de drogas tem uma capacidade interessante de fornecer novos métodos de tratamento para disfunção erétil e outras doenças como hipertensão pulmonar e outras doenças cardiovasculares (EVGENOV et al., 2006).

Dois diferentes subtipos da GCs estão presentes *in vivo*: a forma reduzida que contém o ligante do NO Heme, e a forma que não possui o componente Heme. Em situações de estresse oxidativo, o mesmo que encontramos em situações de disfunção endotelial como doenças cardiovasculares, as espécies reativas de oxigênio (ROS) reduzem o ferro da GCs, não respondendo mais a NO. (MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017)

Nesse contexto, dois tipos de moduladores da GCs foram desenvolvidos, e são importantes sinalizadores do sistema cardiovascular incluindo a musculatura cavernosa e o endotélio. Esses moduladores são classificados como estimuladores e ativadores. Tais compostos são importantes em situações de estresse oxidativo, como já descrito, pois podem estimular tanto em situações de diminuição da concentração de NO, como em situações de redução do sítio heme da GCs. (EVGENOV et al., 2006).

Os estimuladores de GC são drogas que agem em dois mecanismos separados: sinergicamente ao NO e direta estimulação do sítio nativo da enzima, independente do NO, ligando-se alostericamente ao Ferro, aumentando a produção de GMPc. Já os ativadores da GCs agem em GCs com perda do sítio heme, melhorando inclusive a produção do GMPc em situações de depleção de NO. (ALBERSEN et al., 2013)

Várias moléculas estimuladoras da GCs já foram testadas *in vitro* em corpos cavernosos. Teixeira, Priviero e Webb (2007) testaram o BAY 41-2272 em camundongos sem a expressão das duas formas de NOs, NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>e</sub>, em corpos cavernosos. Nesse trabalho, eles demonstraram que essa substância relaxou as faixas de tecidos de corpos cavernosos, e também aumentaram a concentração de GMPc (dosados por radioimunoensaio), confirmando que sua ação se dá com ativação direta da GCs.

Outras duas drogas que agem diretamente na ativação da GCs foram implicadas no relaxamento do CCH. A YC-1 age aumentando de forma alostérica a afinidade do GTP no seu

sítio, gerando o aumento da concentração do GMPc(FRIEBE; KOESLING, 1998; MÜLSCH et al., 1997). 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 (MIZUSAWA et al., 2002).

Um derivado da pirazolopiridina, BAY41-2272 também estimula diretamente a GCs de forma independente do NO, causando relaxamento de faixas de tecidos 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). Em faixas de tecido de corpos cavernosos humanos saudáveis, foi testado o efeito relaxante do BAY 41-2271, e ficou demonstrada a sua capacidade de relaxamento, com efeitos semelhantes ao SNP, porém com menor potencial relaxante (LEITÃO JUNIOR, 2016).

Após a descoberta dessas novas drogas estimuladoras de GCs (BAY 41-2272 e BAY 41-8543), vários trabalhos na literatura demonstraram a capacidade relaxante dessas drogas em modelos animais, principalmente em modelos de Hipertensão pulmonar (EVGENOV et al., 2004; SCHERMULY et al., 2008), porém todas elas se mostraram com baixa estabilidade metabólica, baixa biodisponibilidade oral (MITTENDORF et al., 2009).

A primeira droga estimuladora de GCs a ser utilizada em humanos foi a Riociguat. Essa droga foi testada em um estudo randomizado, duplo cego, fase 3, e demonstrou resultados interessantes no tratamento da hipertensão pulmonar (GRIMMINGER et al., 2013). Esse fármaco atualmente é utilizado, além dessa doença, no tratamento da doença de Raynaud, e encontra-se em estudos fase 2 para o tratamento de Esclerose Sistêmica e anemia falciforme (XIAO et al., 2019).

Outras substâncias dessa classe com potencial de utilização clínica têm sido testadas, porém as que mais se destacam são o Vericiguat (BAY 12-1189), o Praciguat (IW-1973) e o IWP -051, sendo que as duas primeiras já possuem estudos para uso clínico (XIAO, 2019). Essa última molécula, um estimulador de GCs, objeto de nosso estudo, possui uma farmacocinética interessante com apenas uma tomada ao dia, com excelente potência, estabilidade, seletividade e efeitos farmacodinâmicos (NAKAI et al., 2016).

Essas drogas tem grande potencial para o tratamento da disfunção erétil, já que seu mecanismo de ação, estimulador de GCs, podem relaxar o corpo cavernoso, independente da via NO, e podem agir, em teoria sinergicamente, e potencializando o efeito de outras drogas



como os IPDE5. Não há, até o momento, nenhum trabalho, além do anterior a esse, que tenha estudado essas drogas estimuladoras em corpos cavernosos de humanos.

No presente trabalho, será abordada a ação de uma droga estimuladora da GCs, o IWP-051, que já tem sua farmacodinâmica e farmacocinética bem estudadas, em corpos cavernosos de humanos. Esses achados demonstram a variedade de mecanismos envolvidos na ação destas substâncias e justifica a realização de estudos adicionais para avaliar seu potencial terapêutico.

## **2OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

- Avaliar a capacidade de relaxamento da substância IWP-051, na musculatura lisa de corpo cavernoso de humano.

### **2.2 Específicos:**

- Identificar os mecanismos envolvidos no relaxamento produzido pelo fármaco IWP-051;

-Avaliar o efeito sinérgico do IWP-051 com um inibidor da RhoA/ROCK (HA1077), no relaxamento das faixas de tecidos de corpo cavernoso;

-Avaliar o efeito da droga na redução das contrações espontâneas em repouso, tanto da amplitude como frequência;

- Avaliar a concentração de fosforilação de VASP nas tiras de corpos cavernosos humanos expostos ao fármaco e compará-lo com o SNP e os expostos ao controle negativo;

- Avaliar a concentração de GMPc nas tiras de corpos cavernosos humanos expostos aos fármacos e compará-la com a concentração nas tiras expostas ao SNP e ao controle negativo.

### **3MÉTODO**

#### **3.1Aspectos éticos e local do estudo**

O presente projeto de pesquisa, antes de sua execução foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo CONEP-Conselho Nacional de Saúde/MS, e foi aprovado sob o CAAE no. 12932419.0.0000.5054 e número do parecer 3.420.560. Como os corpos cavernosos foram retirados no Instituto José Frota-IJF, a instituição também apreciou o projeto com aprovação através do CAAE 12932419.0.3001.5047 e apreciação número 3.612.938. Foram seguidas as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde-Ministério de Saúde. Os corpos cavernosos foram retirados de doadores não-vivos, vítimas de traumatismo crânio-encefálico, já doadores de outros órgãos para transplante. Todo o processo seguiu as normas do DECRETO No. 9.175, DE 18 DE OUTUBRO DE 2017, que regulamenta a Lei de transplantes. 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. Os experimentos foram

realizados no Instituto de Superior de Ciências biomédicas, laboratório de FisiofarmacologiaCárdio-Renal.

### 3.2 Fármacos e Substâncias

A substância a ser testada é uma droga protegida por direitos de patente, portanto não podem ser demonstradas, produzida pela *IronwoodsPharmaceuticals Inc*, Massachusetts. O IWP-051 é uma droga estimuladora da GCs independente do NO.

A solução de Krebs-Henseleit, com pH ajustado para 7,4, é utilizada na seguinte composição (em mM): NaCl 118,00; NaHCO<sub>3</sub> 25,00; KCL 4,70; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,20; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,17; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,50; e glicose 5,60. A solução foi preparada 24 horas antes dos procedimentos sem Ca<sup>++</sup> e glicose que eram adicionados à solução momentos antes dos experimentos. Fenilefrina, N (G)-nitro-larginina (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), Tadalafil (TAD), 4, glibenclamida (Glib). Solução fisiológica de sal (PSS) foi preparada utilizando a seguinte composição química [mM]: 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1,17 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,03 K<sub>2</sub>EDTA· 2H<sub>2</sub>O, 5,5 glicoses e 1,6 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; pH 7,4.

### 3.3 Material cirúrgico e laboratorial

O material cirúrgico e laboratorial utilizados são discriminados no Apêndice.

### 3.4 Preparação dos corpos cavernosos

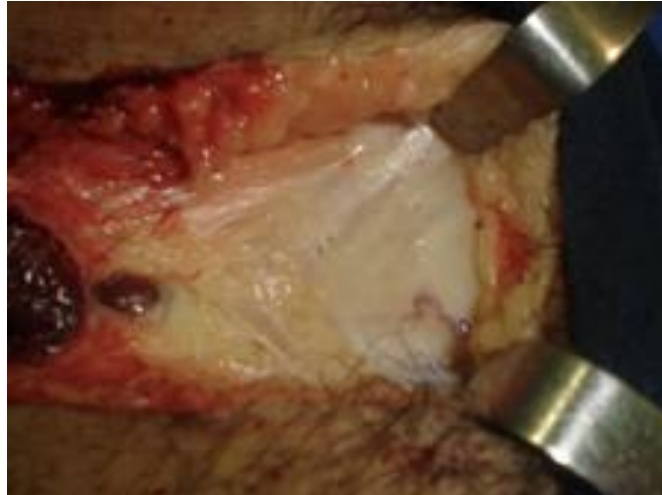
Trata-se de pesquisa *in vitro* utilizando-se corpo cavernoso de doador cadáver obtido no momento da captação de órgãos para transplante, obedecendo-se os rigores das leis específicas.

**Corpo Cavernoso Humano**– Após consentimento da família e liberação através de um termo próprio, segmentos de 1 – 2cm de corpos cavernosos eram retirados do doador cadáver de Múltiplos órgãos através da mesma incisão xifopubiana ao fim da cirurgia, como descrito por Regadaset *al.*(2010). O fragmento do corpo cavernoso foi colocado em solução preservadora utilizada na perfusão dos órgãos e condicionados a 4°C.

Os experimentos eram realizados em duas etapas: com 12 horas e após 36h. As faixas de tecidos de corpo cavernoso eram 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.

Figura 8 – Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos



**Fonte:** Regadas *et al.* (2010, p. 491)

Figura 9 – Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo



**Fonte:** Regadas *et al.* (2010, p. 491).

Figura 10 – Fragmento de corpo cavernoso humano banhado em Krebs



Fonte: Autor (2020).

### 3.5 Protocolos Experimentais

Os tecidos eram suspensos entre duas pontas de metal em “L” e uma das pontas era conectada a um transdutor de força isométrica, enquanto a outra era fixada a uma unidade móvel, permitindo o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos eram 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 LabChart versão 8 da fabricante AD instruments de aquisição de dados.

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



Fonte: Autor (2014).

Figura 12 – Sistema de banhos isolados



Fonte: Autor (2014).

### ***3.5.1 Avaliação do efeito relaxante da substância IWP-051 na musculatura lisa cavernosa de humanos***

Após 60 minutos de estabilização os tecidos eram contraídos com  $K^+$  e após 15 min eram lavados novamente com substância nutritiva. Após um período de estabilização de mais 15 min, o fragmento de corpo cavernoso era novamente contraído, agora com fenilefrina (PE,  $10\mu M$ ). 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 ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}M$ ) IWP-051.

### ***3.5.2 Avaliação dos efeitos relaxantes da substância Tadalafila***

Após 60 minutos de estabilização os tecidos eram contraídos com  $K^+$  e após 15 min eram lavados novamente com substância nutritiva

Após um período de estabilização de mais 15 min, o tecido era novamente contraído, agora com fenilefrina (PE,  $10\mu M$ ). 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 pelos fármacos estudados, eram realizadas curvas de relaxamento com concentrações crescentes da substância: Tadalafila ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}M$ ).

### ***3.5.3 Avaliação do efeito do inibidor da NO sintase sobre o relaxamento produzido pela substância IWP-051***

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 ( $100\mu M$ ), um inibidor da NOS, foi adicionado 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 foram obtidas.

### ***3.5.4 Efeito do inibidor da Guanilato ciclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido pela substância do grupo estudada***

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  $10\mu M$  aos banhos, 30 minutos antes da pré-contração com fenilefrina ( $10\mu M$ ). Subsequentemente foram obtidas curvas resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância.

### ***3.5.5 Avaliação do fármaco IWP-051 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.

### ***3.5.6 Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (KATP)***

Após a contração com  $K^+$  80mM eram aguardados 15min após a lavagem do banho com a solução de Krebs os tecidos retornaram 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, curva resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância foram obtidas.

### ***3.5.7 Efeito do bloqueador da Rho quinase HA1077***

Após a contração com  $K^+$  80mM eram aguardados 15min após a lavagem do banho com a solução de Krebs os tecidos retornaram à tração de repouso. Nesse experimento a HA 1077 ( $10\mu M$ ), foi adicionada aos banhos 30 minutos antes da adição de fenilefrina ( $10\mu M$ ). Subsequentemente foram obtidas curvas resposta de relaxamento com concentrações crescentes da substância.

### ***3.5.8 Relaxamento de contrações espontâneas***

Em tecidos de corpo cavernoso de humano que apresentaram contrações espontâneas e estáveis, foram adicionadas doses crescentes ( $0,1 \text{ nmol.L}^{-1}$  a  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) do IWP-051. Foram avaliadas as alterações tanto na amplitude das ondas de contração e relaxamento, quanto a alteração na frequência.

### ***3.5.9 Fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP)***

O nível de fosforilação de Ser239 de VASP é um marcador útil para monitorar a ativação e sinalização da proteína quinase dependente de cGMP. Foi avaliado o efeito de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de IWP-051, para isso, utilizou-se as tiras de CCH no pico de ação de relaxamento da substância, os quais foram homogeneizados em PBS e enriquecido com *Halt Protease Inhibitor Cocktail* (1:100; *ThermoScientific*, Waltham, MA, EUA) e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA de *TissueLyzer* (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Logo depois, as amostras foram centrifugadas a 17000 G a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min, e os sobrenadantes foram guardados para procedimentos posteriores. As proteínas foram resolvidas usando eletroforese em gel SDS-PAGE. Aliquotas de 50  $\mu\text{g}$  de proteínas foram submetidas à SDS-PAGE (10% de acrilamida) e transferidas para uma membrana de PVDF a 500 mA durante a noite usando um aparelho *Hoefler* (Holliston, MA, EUA).

Em seguida, a membrana foi imersa em uma solução de bloqueio de TBS-T (0,05% de Tween 20/ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  Tris/ $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, pH 7,5 mais 5% BSA). As membranas foram então incubadas durante a noite com o anticorpo primário para Ser239 da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) (1:1000, *CellSignaling*, Danvers, MA, EUA), VASP total ou  $\beta$ -actina (1:5000, *Sigma*) como controle de carregamento interno.

A membrana foi ainda incubada durante 1 h à temperatura ambiente com um anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina. A transferência foi



desenvolvida usando um kit de quimiluminescência (CDP Star, Applied Biosystems) e lida usando um sistema de fotodocumentação Chemidoc XRS+ (Biorad, Hercules, CA, EUA).

### ***3.5.10 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.

#### **Medida de GMPc basal**

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

#### **Medida de GMPc após a exposição aos fármacos utilizados**

Após o período de realização dos experimentos com os fármacos IWP-051, Tadalafila e alcançados o Emax das substâncias, e após um período de estabilização de cerca de 20min, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram mantidas a -20°C até o dia do experimento.

#### **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 FolinCiocalteu.

#### **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°C. Foi removido o sobrenadante e descartou-se 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 etélica (superior) foi descartada.

Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens as amostras secaram em atmosfera de nitrogênio a 60°C e as ressuspendeu-se no tampão de ensaio do “kit” imunoenzimático para dosagem de GMPc. Foi utilizado o método de acetilação da amostra para dosagem de GMPc, em fentomoles de GMPc por poço. Posteriormente, calculou-se a concentração de GMPc por mg de tecido.

### 3.6 Análise Estatística

O efeito relaxante das substâncias foi medido a partir do platô de contração máxima induzida pela fenilefrina (10µM) e expresso como percentual reverso de diminuição da contração provocada pela fenilefrina.

Para construir as curvas de concentração-resposta, realizou inicialmente 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  $10^{-4}$ . 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).

O efeito máximo de relaxamento ( $E_{max}$ ) foi considerado pelo nadir da curva de percentual reverso, induzido pelos agentes relaxantes nas curvas de concentração-resposta, descrito na seguinte expressão:

$$R = \frac{T_F - T_S}{T_F} \times 100$$

Onde  $T_F$  e  $T_S$  são as tensões decorrentes da ação da fenilefrina e de uma dada substância.

As concentrações dos fármacos que induziram 50% de relaxamento máximo ( $EC_{50}$ ) 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 (3-12 experimentos), utilizando regressão não-linear.

Para comparar os dois grupos em relação às variáveis Emax e pEC50, utilizou-se o teste *t* de *Student* para variáveis não pareadas. Foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 9.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Em cada grupo de experimentos, *n* significa o número de tecidos (de cada paciente).

Por fim, realizou-se o teste de *Shapiro-Wilk* para distribuição de normalidade. Diferenças entre os valores médios foram avaliadas ou teste *t* para dados não pareados, seguida pelo teste *Fisher Multiple Comparison Test*, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Amostras**

Durante o período do estudo foram realizadas 21 captações de corpos cavernosos, no período que compreende o dia 01/12/2019 a 05/04/2021. Todos os fragmentos de corpos cavernosos foram retirados de paciente em mortes encefálica, elegíveis para captação de outros órgãos. A idade desses doadores variou de 19 anos até 66 anos, com média de 41,2

anos. A maioria dos doadores não tinham comorbidades, e alguns eram hipertensos. Todos os doadores foram vítimas de violência externa, sendo traumatismo cranioencefálico a causa determinante para a morte encefálica.

Quadro 1 – Características demográficas da população de doadores não-vivos

DOADOR	IDADE	CAUSA DA MORTE	DATA DA CAPTAÇÃO	COMORBIDADE	OBSERVAÇÃO
1	38 ANOS	TCE	01/12/2019		
2	55 ANOS	TCE	03/12/2019	TABAGISMO, HAS DM	PLACAS NA AORTA
3	42 ANOS	TCE	03/12/2019	TABAGISMO	
4	64 ANOS	TCE	05/12/2019	ETILISTA	
5	20 ANOS	TCE	17/12/2019		
6	34 ANOS	TCE	17/12/2019		
7	19 ANOS	TCE	17/12/2019		
8	40 ANOS	TCE	08/01/2020		
9	66 ANOS	TCE	10/01/2020		
10	35 ANOS	TCE	26/01/2020		
11	35 ANOS	TCE	29/01/2020		
12	52 ANOS	TCE	02/02/2020		
13	26 ANOS	TCE	11/02/2020		
14	39 ANOS	TCE	20/08/2020		
15	47 ANOS	TCE	01/10/2020		
16	55 ANOS	TCE	02/10/2020		HAS
17	36 ANOS	TCE	25/10/2020		
18	39 ANOS	TCE	10/11/2020		
19	46 ANOS	TCE	26/01/2021		
20	36 ANOS	TCE/PAF	05/02/2021		
21	24 ANOS	TCE	05/04/2021		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

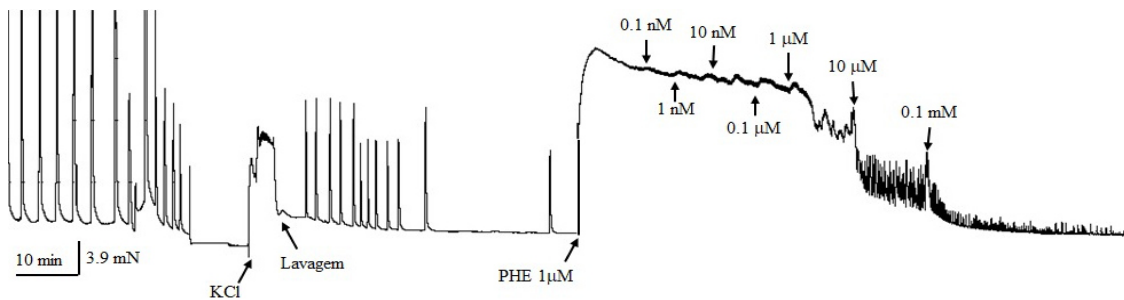
#### 4.2 Efeito relaxante do IWP-051 e comparação do efeito do IWP-051 com o controle

##### Tadalafila

Após a contração com PE (10 $\mu$ M), era aguardada a estabilização da curva de contração, que se dava em cerca de 20 min. Então eram adicionadas as drogas: IWP-051 em concentrações crescentes de 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-4</sup> M, e a Tadalafila também nessas concentrações. O relaxamento máximo alcançado pela Tadalafila foi de 98,78%  $\pm$  1,67 %, com pEC50 (-logEC50) foi de 5,515 $\pm$  0,7767. A substância estudada alcançou um relaxamento máximo de

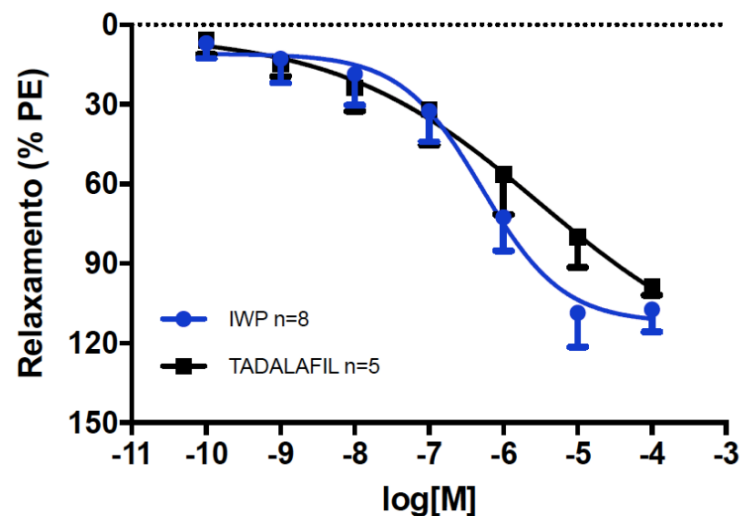
107,37% ± 2,98%. A sua respectiva pEC50 (-logEC50) foi de 6,289+/- 0,09787. Ao comparar as duas curvas, não houve diferença estatística nem em relação ao EMax, como na potência pEC50 (Gráfico 2;Quadro 1).

Gráfico 1 – Traçado de uma curva de contração- relaxamento com o uso da IWP-051, em concentrações crescentes



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Gráfico 2 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com o controle Tadalafila em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano (n= número de experimentos)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 1 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e Tadalafila.

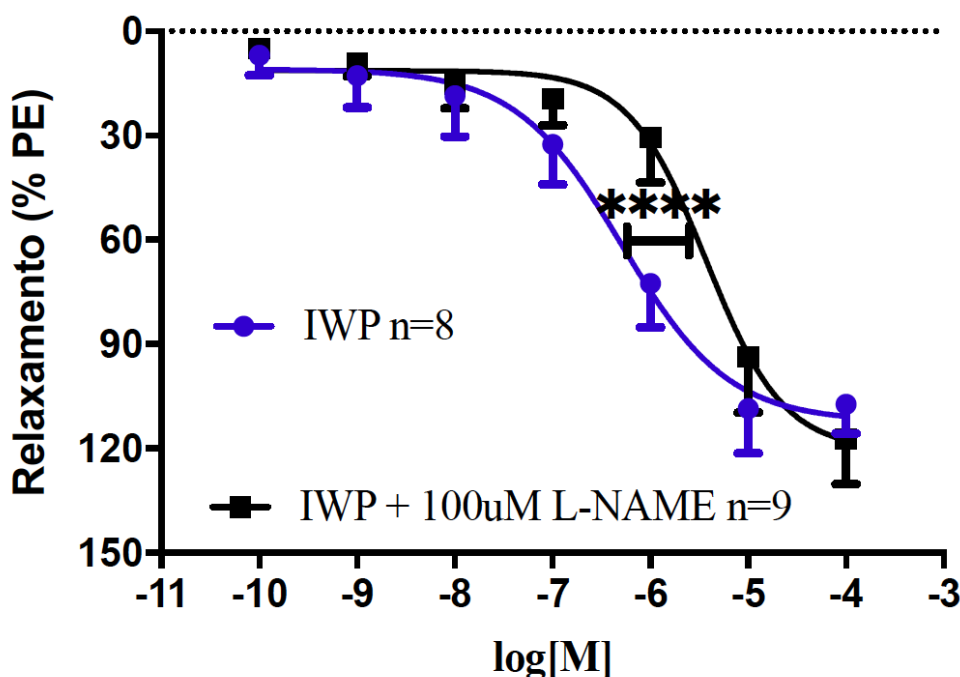
Teste t de <i>Student</i> não-pareado			
Parâmetro	IWP-051	TADALAFILA	valor p
pEC50	6,289±0,097	5,515± 0,7767	P=0,1823
E <sub>max</sub>	107,37 % ± 2,98%	98,78% ±1,66%	P=0,0817

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

### 4.3 Efeito do L-NAME (100 $\mu$ M) um importante inibidor da NOs no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado

Quando adicionado o inibidor da NOS (L-NAME) anteriormente ao IWP-051, não houve alteração estatisticamente significativa no Emax da droga, sendo esse de  $117,25\% \pm 4,654687$ . Porém houve um importante deslocamento da curva para a direita, encontrando um pEC50 de  $5,429 \pm 0,08057$ . Ao comparar as duas potencias houve diferença estatística com p extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

Gráfico 3 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Bloqueador L-NAME em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

\*\*\*\* $P < 0,0001$  Teste t de Student não-pareado

Tabela 2 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e IWP+L-NAME.

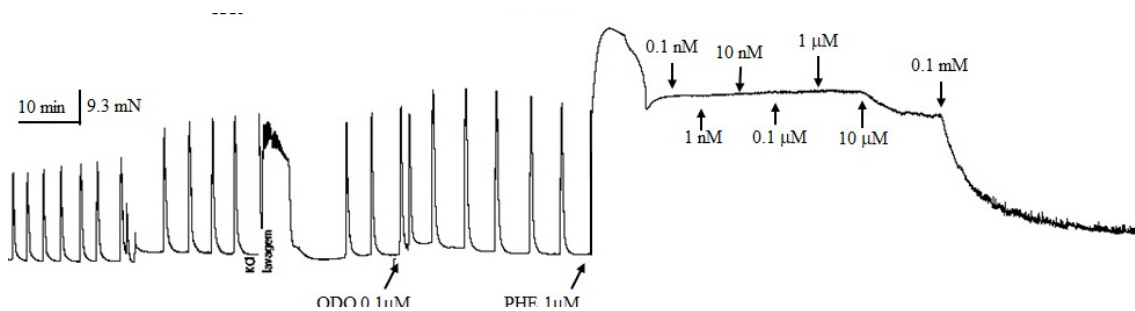
Teste t de Student não-pareado - **** $P < 0,0001$			
Parâmetro	IWP-051	IWP+L-NAME	valor p
pEC50	$6,289 \pm 0,097$	$5,723 \pm 0,3177$	<b><math>P &lt; 0,0001</math></b> ***
E <sub>max</sub>	$107,37\% \pm 2,98\%$	$79,34\% \pm 16,14\%$	$P = 0,1760$

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 4.4 Efeito da inibição da enzima Guanilato ciclase solúvel por um inibidor específico do grupo heme da enzima (ODQ; 10 μM) e no relaxamento induzido pela substância no tecido estudado

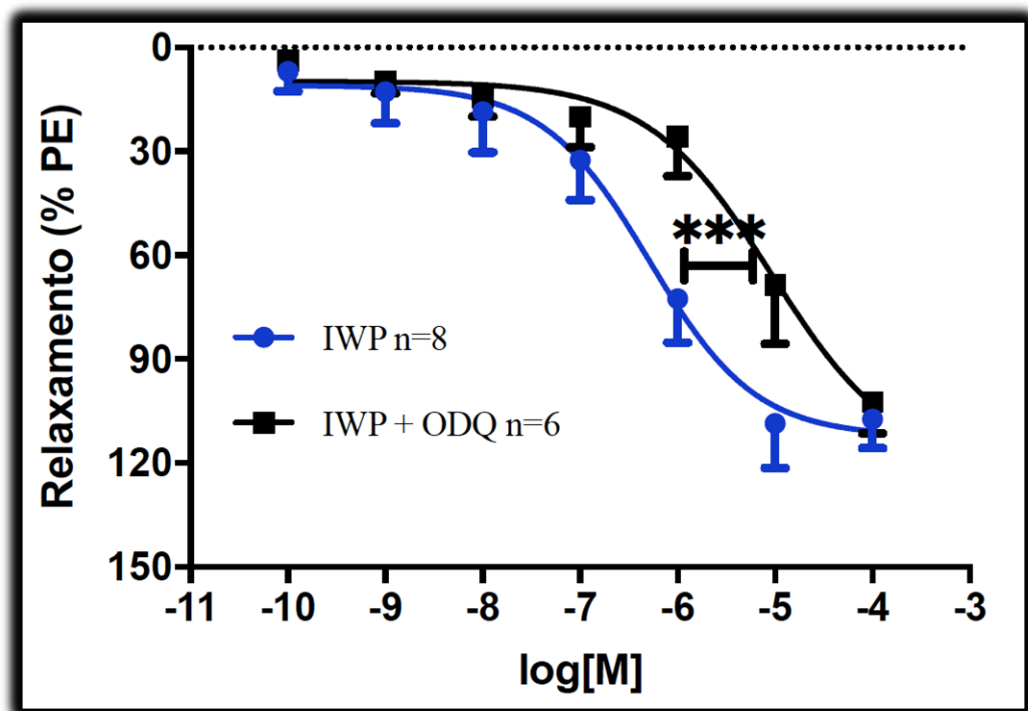
A adição de ODQ na amostra antes da colocação do IWP-051, bloqueou apenas parcialmente o efeito de relaxamento da substância. Não houve diferença no relaxamento máximo alcançado, porém durante a comparação da potência das substâncias e das curvas, houve deslocamento para a direita, indicando um bloqueio da ação da droga pelo ODQ. O relaxamento máximo produzido pela adição desse bloqueador foi de  $102,49\% \pm 3,693$ , enquanto a  $pEC_{50}$  foi de  $5,036 \pm 0,2340$ .

Gráfico 4 – Traçado de uma curva de contração-relaxamento com o uso da IWP-051, em concentrações crescentes, após incubação com ODQ (10 μM)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

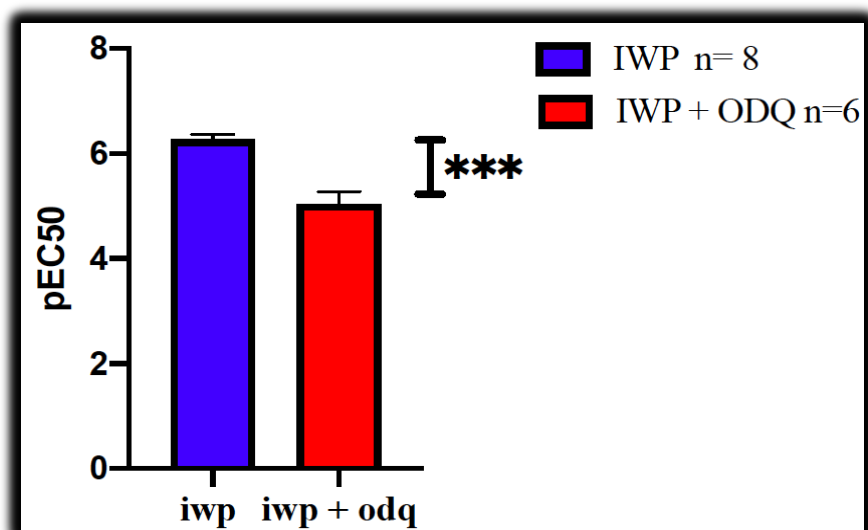
Gráfico 5 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Inibidor da GCs ODQ (10 μM) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

\*\*\* $P < 0,001$  Teste t de Student não-pareado

Gráfico 6 – Gráfico em barras comparando o pEC50 do IWP-051 com o efeito do inibidor da GCs ODQ.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

\*\*\* $P = 0,0002$  Teste t de Student não-pareado

Tabela 3 – Comparação entre o Emax e pEC50 das curvas dose resposta do IWP-051 e IWP+ODQ.

\*\*\* $P < 0,0001$  Teste t de Student não-pareado com correção de Welch



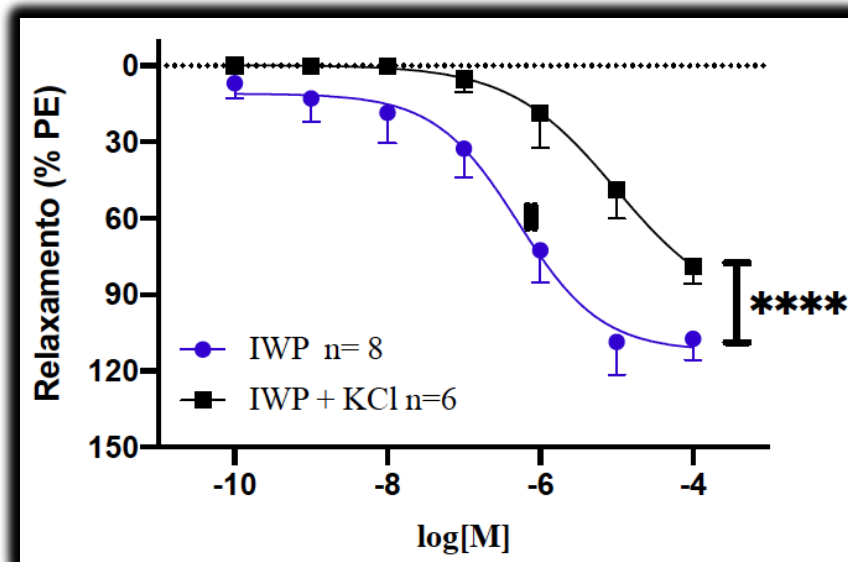
<i>Parâmetro</i>	<b>IWP-051</b>	<b>IWP-051+ODQ</b>	<i>valor p</i>
pEC50	6,289±0,097	5,036 ± 0,2340	<b>P&lt;0,001</b> ***
E <sub>max</sub>	107,37 % ± 2,98%	102,49% ± 3,693	P=0,3197

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 4.5 Efeito do IWP-051 na contração realizada com K<sup>+</sup> 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 faixas de tecidos de corpo cavernoso foram contraídas com K<sup>+</sup> 80mM. As curvas de relaxamento foram avaliadas com as mesmas concentrações (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-4</sup>). O Relaxamento Máximo (E<sub>max</sub>) da substância na contração com K<sup>+</sup> foi 78,83 ± 2,841%. A pEC50 foi de 6,289. Houve diferença importante entre o E<sub>max</sub> das duas curvas num teste t não pareado, sugerindo uma ação de Canais de Potássio na ação do IWP-051. P<0,0001.

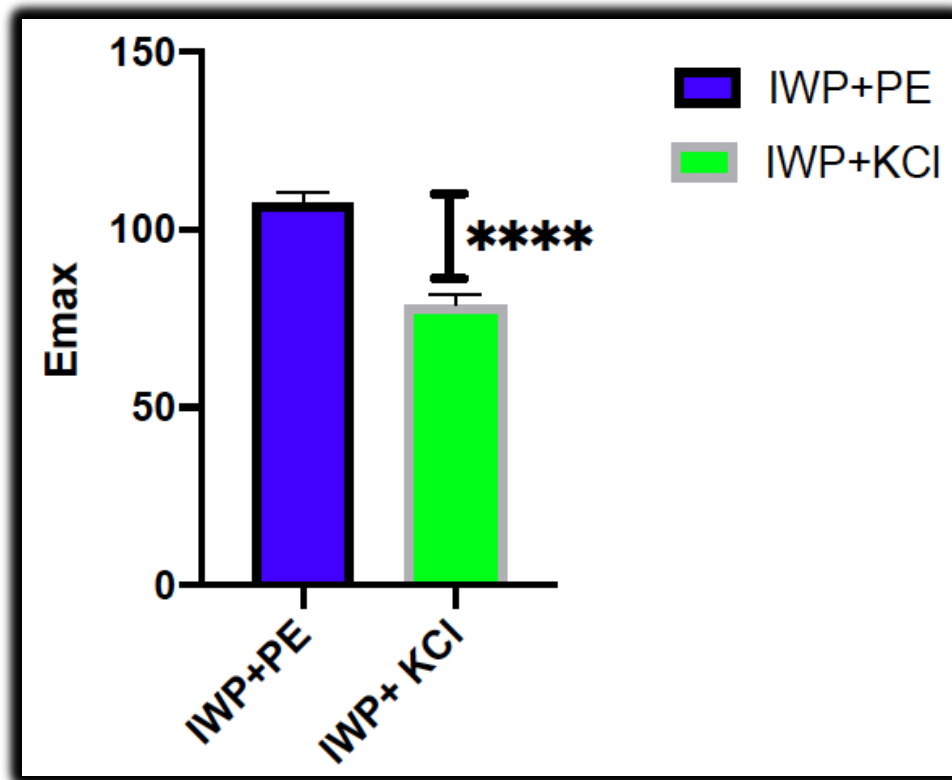
Gráfico 7 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 na contração com PE e KCl 80 mM em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

\*\*\*\*P<0,0001 Teste t de Student não-pareado

Gráfico 8 – Em barras comparando o E<sub>max</sub> da contração com PE e KCl 80mM



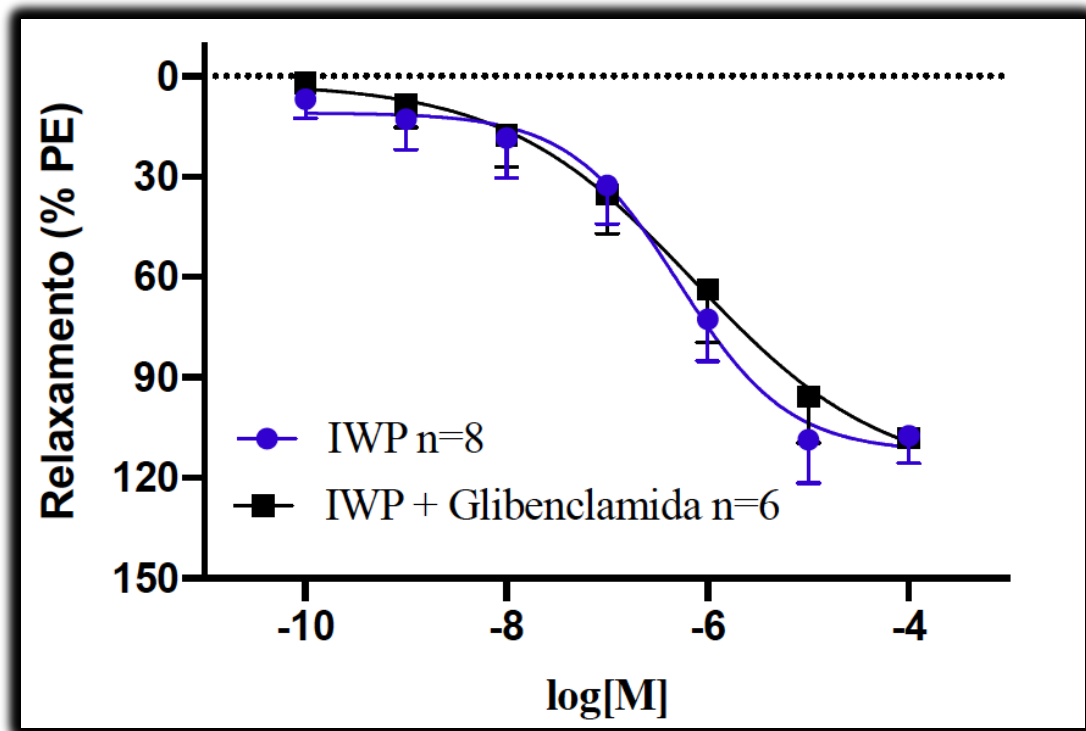
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

\*\*\*\*P=0,0001 Teste t de Student

#### 4.6 Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente ( $K_{atp}$ ), glibenclamida ( $10\mu\text{M}$ ) no relaxamento induzido pela substância IWP-051 no tecido estudado

A adição do bloqueador de  $K_{atp}$ , glibenclamida no banho, 30min antes da contração com PE, não causou mudança estatisticamente significativa no poder relaxante da droga estudada, e aparentemente não houve alteração da potência da mesma. O Emax da curva com glibenclamida foi  $108,078\% \pm 3,176\%$ , enquanto a potência do fármaco adicionado à glibenclamida ( $pEC_{50}$ ) foi de 6,136. Esses resultados sugerem que a droga não tem seu efeito através desses canais.

Gráfico 9 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o Bloqueador de  $K_{ATP}$  Glibenclamida ( $10\mu\text{M}$ ) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos)

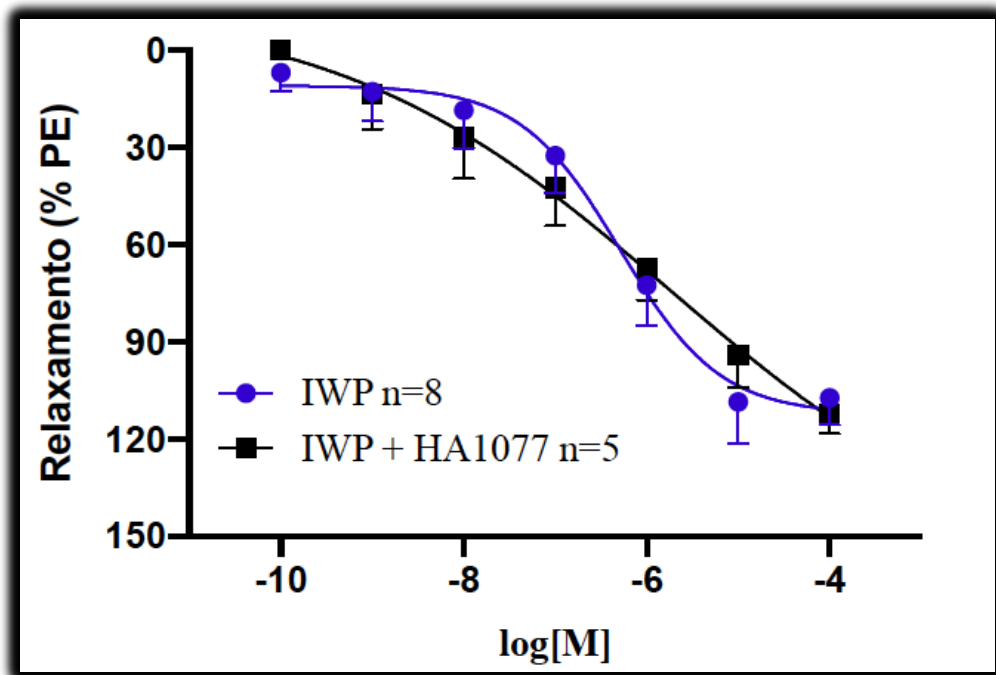


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 4.7 Efeito do inibidor da Rho quinase HA1077 sob o relaxamento induzido pelo IWP-051.

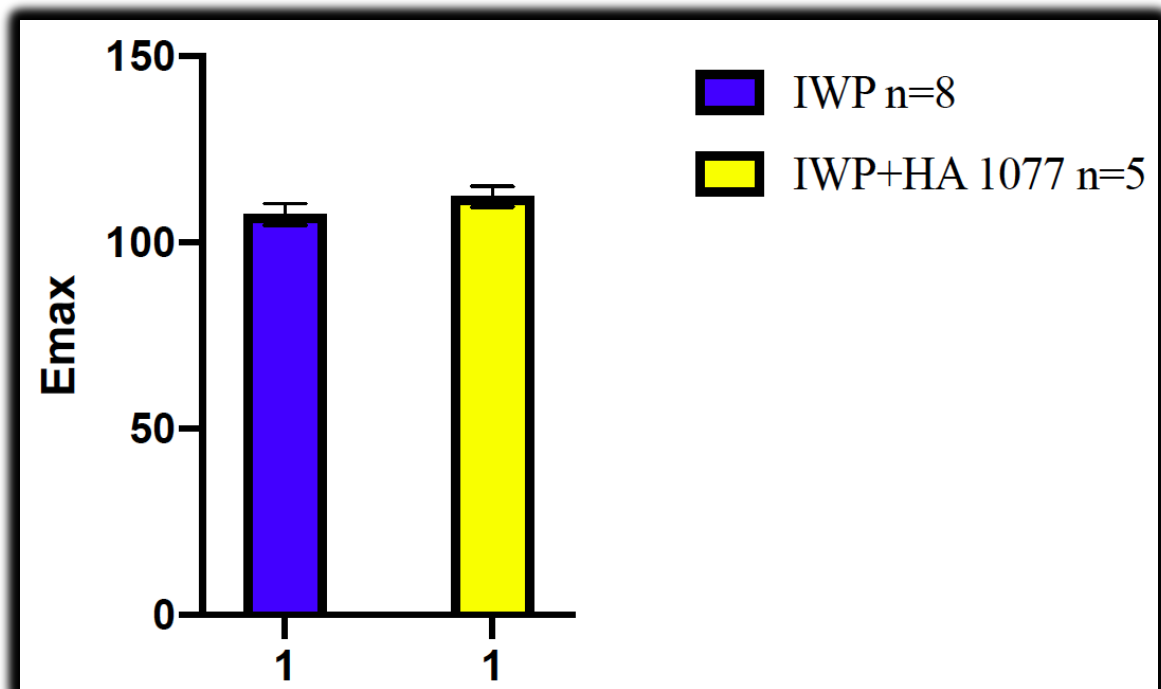
A adição de HA1077 (10 $\mu$ M), 30 min antes da contração induzida pela estimulador de GCs não causou nenhum efeito aditivo à capacidade de relaxamento, nem aparentemente à potência. O relaxamento máximo alcançado pela adição do HA 1077 foi de 112,26%  $\pm$  2,814%, e a respectiva pEC<sub>50</sub> foi de 5,731 não havendo diferença estatística nem o relaxamento máximo, nem a potência. Esse resultado mostra que não há sinergia entre as duas medicações.

Gráfico 10 – Curva Dose resposta, comparando o efeito da Substância IWP-051 com a substância incubada com o inibidor da ROCK HA 1077 (10 $\mu$ M) em faixas de tecidos de corpo cavernoso humano. (n= número de experimentos)



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Gráfico11 – Gráfico em barras comparando o Emax IWP-051 X IWP+HA 1077

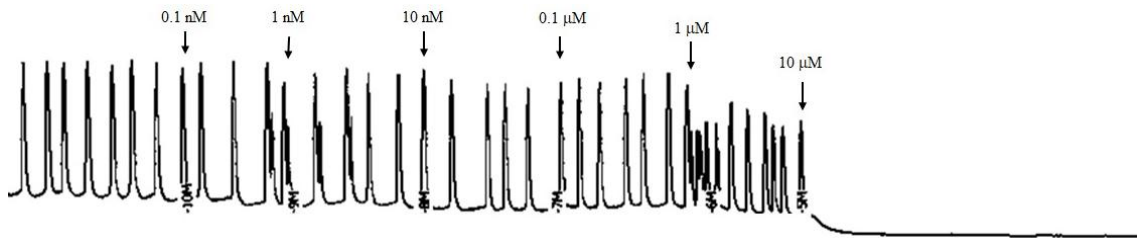


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 4.8 Relaxamento de contrações espontâneas

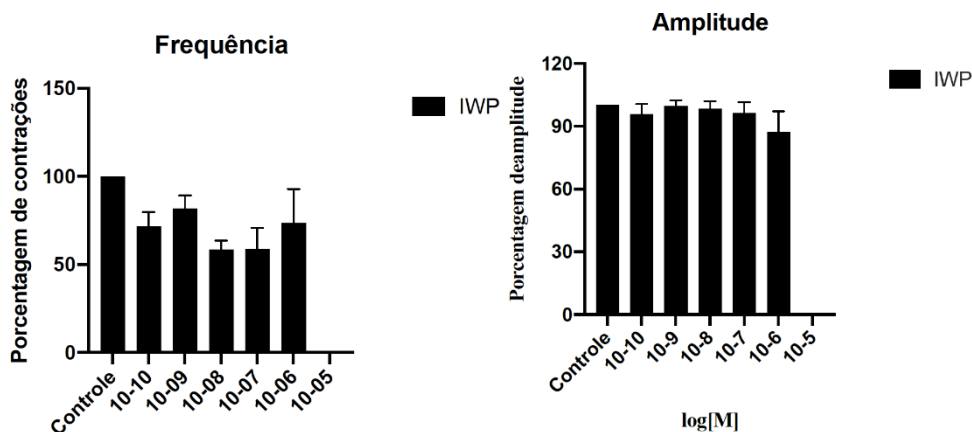
Durante a realização dos experimentos, notou-se que naquelas faixas teciduais de CCH que eram feitas no mesmo dia da retirada do tecido, existiam essas contrações espontâneas, os quais foram descritas inicialmente por Christ em 1990, e citados por Andersson em 1995 (ANDERSSON; WAGNER, 1995; CHRIST et al., 1990). Essas contrações estavam presentes em todos os experimentos realizados no primeiro dia após a retirada. Apesar de secundárias no mecanismo de detumescência peniana, elas podem ser importantes para o início do mecanismo de relaxamento do corpo cavernoso, já que essas contrações são reflexo de um sincronismo das células da musculatura lisa cavernosa, causada provavelmente pela junções-gap intercelulares.(THORNBURY; HOLLYWOOD; SERGEANT, 2019)Então, testou-se o efeito da substância nessas contrações espontâneas, conforme explicado no método. Como resultado tem que essas contrações eram abolidas ao chegar a uma concentração de  $10^{-5}$  (Gráfico 10). Foi realizado também imunohistoquímica com a presença de células de cajal (ckit+).

Gráfico 12 – Registro de um experimento com tira de corpo cavernoso humano, com a adição do IWP com concentrações crescentes.



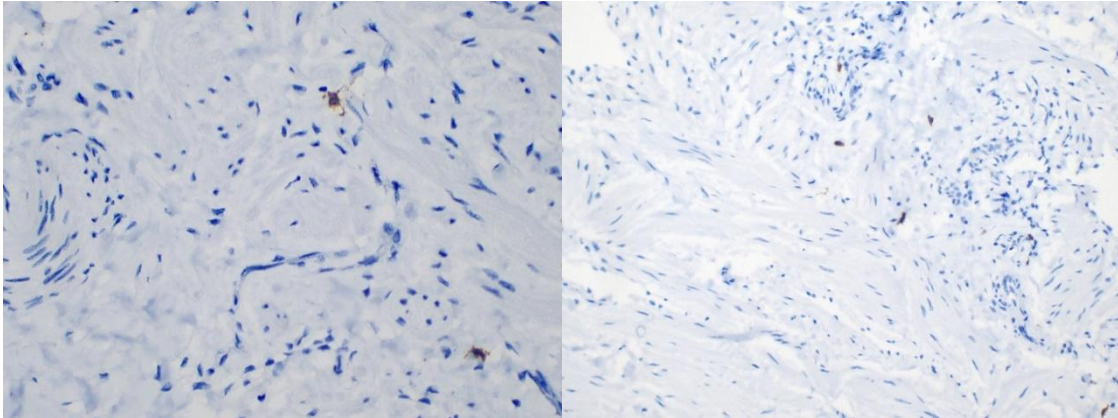
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Gráfico 13 – Gráficos em barra, comparando as diferenças de frequência e a amplitude das contrações espontâneas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2021).

Figura 13 – Imunohistoquímica mostrando células ckit +, em lâmina de faixa de CCH.

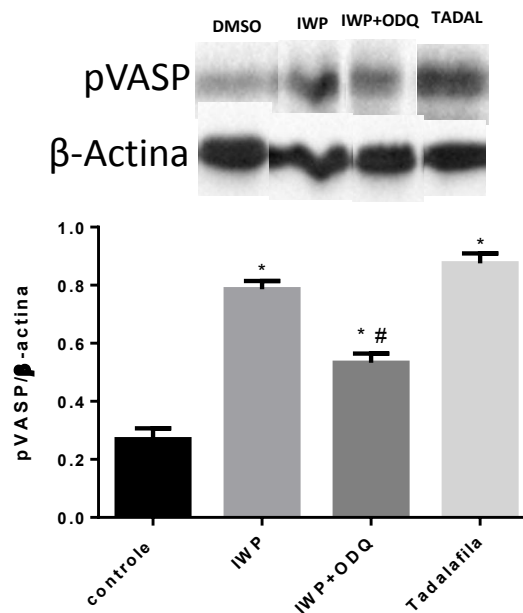


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2021).

#### **4.9 Dosagem da Fosfoproteína estimulada por vasodilatador(VASP)**

A dosagem defosforilação da VASP nas tiras de corpos cavernosos estimuladas com tratadas com o IWP-051 foram cerca de 3 a 4 vezes maiores que o controle ( $p > 0,05$ ), houve também um aumento semelhante nas tiras tratadas com Tadalafila ( $p > 0,05$ ), demonstrando que essas substâncias realmente agem pela via do GMPc. Além disso, quando adicionado o ODQ, cuja ação bloqueia a ação da GCs, houve redução da fosforilação da VASP, com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) (Figura 13). Esses resultados comprovam que as substâncias testadas provocam um aumento da expressão da VASP, provavelmente estimulando GCs.

Gráfico 14 – Gráfico em colunas com dosagem de VASP



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

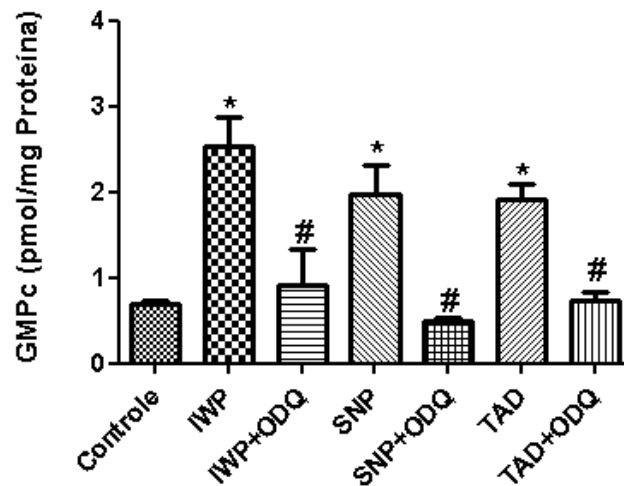
\* $p < 0,05$  teste pareado t de Student não pareado vs controle

#  $p < 0,05$  teste pareado t de Student não pareado IWP vs IWP+ODQ

#### 4.10 Dosagem do GMPc após o estímulo das substâncias estudadas

A dosagem de GMPc do grupo IWP foi cerca de 3 vezes maior que a dosagem de GMPc no grupo controle com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), a adição do ODQ à substância testada reduziu consideravelmente a geração de GMPc do IWP, demonstrando que esse estimulador da GCs, tem seu efeito reduzido por esse inibidor da Guanilato ciclase. Outro dado encontrado é que os níveis de GMPc gerado pelo IWP, foram semelhantes a outras substâncias sabidamente promotoras de geração de GMPc e relaxamento do endotélio do corpo cavernoso.

Gráfico 15 – Gráfico em colunas com dosagem de GMPc dos diferentes grupos.



\* $p < 0,05$ , teste t de Student não pareado vs. controle

# $p < 0,05$  teste t de Student não pareado, vs. IWP, SNP ou Tadalafila (TAD)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo pesquisou o efeito de uma nova droga, o IWP-051, um estimulador da GCs, desenvolvido para o tratamento inicialmente de hipertensão pulmonar. O tecido estudado foi o corpo cavernoso humano, dissecado em doadores não-vivos de órgãos, testado em banhos orgânicos. Mesmo considerando a nobreza do tecido, trabalhou-se com uma amostra importante para os experimentos.

Após o estímulo com Fenilefrina (PE  $10\mu\text{M}$ ), todos os corpos cavernosos produziram uma curva de contração acima de 2g, mais de 100% da linha de base, mostrando a presença de receptores  $\alpha_1$ . Essas contrações foram, em sua maioria, sustentadas, podendo ser realizados os experimentos. Esses resultados foram visualizados em outros estudos com corpo cavernoso humano (LEITÃO JUNIOR et al., 2016; RAJFER et al., 1992; SILVA et al., 2005; SOUSA et



al., 2010), assim como corpo cavernoso de coelho (REGADAS et al., 2008; RAJFER et al., 1992).

A adição da droga estudada nos banhos de tecidos provocou um relaxamento máximo (Emax) de  $107,3\% \pm 2,98\%$ , com uma potência (pEC50) de  $6,289 \pm 0,097$ . Esses dados comprovam que o IWP-051 é potente e eficaz. Em um trabalho de metodologia semelhante, também utilizando CCH de pacientes doadores para transplante, Leitao Jr *et al.* (2016) estudaram o BAY 41-2272, um fármaco indutor da GCs NO-independente, amplamente estudada em experimentos anteriores. (LEITAO JUNIOR et al., 2015)

BAY 41-2272 foi capaz de produzir um relaxamento de 107,4%, com pEC50 de 5,64, dados muito semelhantes ao encontrados com IWP-051. Esses dados demonstram que os efeitos desses dois fármacos são semelhantes, e que ambos são fortes relaxadores da musculatura lisa cavernosa humana. Baracat *et al.* (2003) testaram esse composto em corpos cavernosos de coelho e humanos, onde o fármaco produziu um Emax de cerca de 100% tanto em CC de coelhos 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, alcançando sua ação máxima quando adicionada ao SNP nitroprussiato de sódio (um doador de NO).

Outra droga estimuladora de GCs testada foi o BAY 60-4552, esse composto, testado em corpos cavernosos de humanos, mostrou uma capacidade de relaxamento de cerca de 17%, muito abaixo do relaxamento encontrado no presente trabalho (ALBERSEN et al., 2013). Essa diferença pode ser explicada pela diferença de capacidade de relaxamento da substância ou, por outro lado, pode ser pelo fato de que essa substância ter sido testada em pacientes com algum grau de disfunção erétil. Esses corpos cavernosos estudados possuíam algum grau de disfunção endotelial, com depleção de NO e alteração da GCs, sendo confirmada ao realizar o experimento com o inibidor da NOs L-NAME.

Outra comparação importante realizada nesse trabalho foi com um inibidor da PDE 5, a Tadalafila, droga de uso comercial no tratamento do DE. Foi comparado o efeito relaxante máximo, a curva dose resposta e a potência da Tadalafila e do IWP-051 (Gráfico 2).

Comparando as duas curvas dose resposta, não se viu uma diferença estatística entre os dois relaxamentos máximos, mostrando que em relação à capacidade de relaxamento (Emax) e a potências (pEC50) eram semelhantes nas duas curvas dose resposta.

Os iPDE5 são drogas de escolha para o tratamento da DE (CORBIN, 2004). Estudando a Vardenafila em outro estudo com CCH saudáveis, Leitão Jr *et al.* (2016),

demonstraram que ela possui uma capacidade de relaxamento inferior ao FOR8011 e também ao BAY 41-2272, mesma classe da droga estudada.

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 et al., 2009). Comparando as três principais substâncias Sildenafil, Vardenafila e Tadalafila, em banhos de corpos cavernosos de humanos, Toque *et al.* (2009) mostraram que a Tadalafila produzia um relaxamento máximo significativo, apesar de inferior à Vardenafila.

Testando essas três substâncias em anéis de aorta, Teixeira *et al.* (2006) mostraram que a Vardenafila era superior aos outros dois iPDE5. Em um trabalho de Sharabiet *al.* (2004), utilizando corpo cavernoso de coelho, o Sildenafil, na concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, produziu um relaxamento de cerca de 60% no tônus produzido pela PE. Esses resultados, demonstram que a substância testada tem em si uma capacidade de relaxamento importante, com pelo menos mesmo efeito relaxante que os IPDE5 e com potência semelhante.

Desde a descoberta do óxido nítrico, tem-se implicado a esse neurotransmissor o papel de principal substância responsável pela ereção humana (BURNETT et al., 1992). A presença da NO sintase em corpos cavernosos, confirmou esse papel, principalmente após estudos de Burnett e cols. 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, ou dependência do NO endógeno, foi utilizado o inibidor da NO sintase, o L-NAME, adicionado 30min antes da contração com PE. A adição dessa substância não provocou diminuição do relaxamento máximo ( $p > 0,05$ ). Porém, houve um significativo deslocamento da curva para a direita com importante força estatística ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 3). O relaxamento máximo produzido pela adição de L-NAME foi  $117,25\% \pm 4,65\%$ , com um  $pEC_{50}$  de  $5,429 \pm 0,08$  ( $p < 0,0001$ ). Estes dados sugerem que a ação da droga é dependente do NO endógeno produzido para manter que alcance o relaxamento máximo com uma menor concentração. A adição do L-NAME reduziu em mais de 10 vezes a potência.

Baracat *et al.* (2003), testando o BAY 41-2272 em corpos cavernosos de coelho e humanos, encontrou um desvio da curva de relaxamento dose resposta para a direita indicando, pela alteração do  $pEC_{50}$ , que essa substância precisa do NO endógeno, produzido pela NOS para gerar o seu efeito. Outro dado muito interessante que contribui para essa visão é que na verdade essas substâncias estimuladoras da GCs, potencializama produção de

GMPCGs, catalisando o efeito do NO (FRIEBE; KOESLING, 1998). Isso pode ajudar a explicar por que altera apenas a potência e se mantém o efeito máximo. Resultados desse estudo foram muito semelhantes, confirmando que o NO endógeno promove um efeito sinérgico e interdependente com os estimuladores da GCs.

Teixeira *et al.* (2007) também demonstraram que a adição do L-NAME provoca um deslocamento para a direita, e acrescentou nesse resultado que o responsável por esse efeito é o bloqueio da NOSe.(TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2007) Outras classes de droga foram testadas por essa via de ação. Filippi e cols. testando uma droga doadora de óxido nítrico (NCX4050) em faixas de tecidos de corpos cavernosos humanos, quando adicionado L-NAME, não alterou a capacidade relaxante da droga (FILIPPI *et al.*, 2003).

Seidler e cols testaram várias drogas doadoras de óxido nítrico em faixas de tecidos 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 (SEIDLER *et al.*, 2002).

Leitão Jr *et al.* (2016), ao testar o FOR8011 em CCH, mostraram efeito semelhante, não alterando nem em relaxamento máximo nem em potência. 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 (ANDERSSON, 2011; ARNOLD *et al.*, 1977; KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004; MURAD, 2004).

A guanilatociclase 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 (ANDERSSON, 2011; KALSI *et al.*, 2003; MÜLSCH *et al.*, 1997; MONTFORT; WALES; WEICHSEL, 2017). 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 Proteínas 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 guanilatociclase solúvel (ODQ 10 $\mu$ M), 30 minutos antes da contração com fenilefrina a 10 $\mu$ M. Essa dose já foi utilizada em outros trabalhos, sendo uma dose suficiente para alcançar seu efeito (BONAVENTURA *et al.*, 2007a). O objetivo desse experimento foi identificar se a substância

age através da ativação da guanilato ciclase solúvel. A NOS geralmente libera o NO que ativa a GCs através da sua ligação com o sítio Heme, catalisando a formação de GMPc(LUCAS et al., 2000;PETERS et al., 2018).

O ODQ altera o estado de oxidação do sítio Heme, onde o NO age, porém não altera o efeito da GCs(ZHAO et al., 2000;EVGENOV et al., 2006). A adição do ODQ 10 $\mu$ M não alterou o relaxamento máximo da droga, mantendo-se acima dos 100% de relaxamento. Porém, reduziu em mais de 10 vezes a potência da droga (pEC50 reduziu de 6,2 para 5,0), com significância estatística (p<0,0002). Esses dados convergem com o apresentado por outros estimuladores da GCs.

Em um trabalho com traqueia de ratos, Toque *et al.* (2010), identificaram uma importante alteração na potência da droga estimuladora de GCs BAY 41-2272, com deslocamento da curva dose resposta para a direita, causando bloqueio da ação relaxante da droga, identificando o sítio Heme, como local efetor do mecanismo de ação da droga. Resultados semelhantes, em CCH e de coelhos foram encontrados por Baracat et al. (2003).

De acordo com Leitão Júnior *et al.* (2016), em outras classes de drogas, esse efeito foi mais evidente, testando o FOR8011, metalo-fármaco doador de NO, a adição de ODQ, causou um bloqueio importante no efeito relaxante da droga, com diferença estatística considerável.

Bonaventura *et al.* (2007), utilizando corpos cavernosos de coelho, testaram um metalo-fármaco do complexo nitrosil rutênio. Os experimentos demonstraram que a adição de ODQ ao banho de tecidos provocou uma diminuição importante do EMAX, além de uma diminuição da potência da substância (pEC50), o mesmo efeito foi encontrado na ação do ODQ em banhos com SNP.

Cerqueira *et al.* (2008), testando outros compostos do complexo nitrosil rutênio em corpos cavernosos de coelho, adicionaram ao banho de tecidos ODQ em doses crescentes de 10 a 100 $\mu$ M. Esse experimento resultou em um bloqueio total do Emax dos fármacos, principalmente na dose de 100 $\mu$ 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 faixas de tecidos de corpo cavernoso humano, Seidler *et al.* (2002) testaram várias drogas doadoras de óxido nítrico (S-nitrosotiois). A adição de ODQ aos banhos causou um bloqueio de cerca de 80% no relaxamento dos componentes. Dados desse estudo demonstram que o uso do ODQ altera o sítio de ligação do NO, impedindo que o NO endógeno estimule o aumento da potência do IWP-051, diminuindo a sua pEC50, requerendo uma maior concentração substância para alcançar o relaxamento máximo.

Nesse contexto de depleção de NO, ou que o sítio HEME dependente encontra-se oxidado, talvez os ativadores de GCs possam ter um efeito mais importante, tendo sua capacidade de relaxamento ampliada nesse contexto (SANDNER; BECKER-PELSTER; STASCH, 2018; THOONEN et al., 2015). O efeito desses ativadores, em sinergia com o IPDE5 em corpos cavernosos com disfunção endotelial, já fora demonstrado (ALBERSEN et al., 2013)

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 (ANDERSSON, 2011; CHRIST, 2000).

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 et al., 2002; ABSI et al., 2019). Isso vale para todos os tipos de vasos, como também para o corpo cavernoso humano (HÖPPNER et al., 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 (BKCa) (OLIVER et al., 2000). Várias drogas vasodilatadoras agem através dos canais  $K_{ATP}$ , como o pinacidil (VIDEBAEK; AALKJAER; MULVANY, 1988), cromakalium, minoxidil, (LONGMAN; HAMILTON, 1992) e fentolamina (SILVA et al., 2005).

Para avaliar o papel dos canais de potássio realizou-se um experimento com a contração com solução despolarizada que avalia o efeito dos canais no relaxamento induzido por IWP-051. Nesse experimento observou-se uma importante alteração do relaxamento máximo alcançado, com queda de cerca de 20% do efeito máximo  $p < 0,0001$ , e com claro desvio da curva para direita. Existem dois mecanismos que podem explicar esse efeito, ou houve ativação dos canais de potássio pelo NO, ou pela ativação desses canais pelo GMPc.

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 demonstrou alteração na  $E_{MAX}$  e do  $pEC_{50}$  do composto, quando adicionado o inibidor da Guanilato ciclase (ODQ), não houve relaxamento do tecido.

Nesse mesmo trabalho, no experimento com SNP, quando adicionado o TEA, houve perda importante do relaxamento máximo do mesmo, e quando incubado com ODQ, aboliu-se totalmente o efeito relaxante da substância, podendo inferir que uma parte do efeito foi realizado através de canais de potássio (BONAVENTURA et al., 2007a).

A partir desses resultados tentou-se estudar os canais de potássio ATP-dependentes (KATP) norelaxamento induzido pela droga estudada, adicionando-se ao banho de tecidos obloqueador desse canal Glibenclamida (10 $\mu$ M). A adição dessa substância não causou alteração na capacidade de relaxamento do IWP-051. Esses dados sugerem que a droga não age ativando os canais KATP, pois não houve alteração no relaxamento máximo ou no pEC50. Faltam estudos que avaliem esses canais de potássio em estimuladores de GCs.

Em CCH, foi testado o FOR8011 com bloqueador glibenclamida, e nesse estudo não houve diferença no efeito dessa substância. Celleket *al.* (1996), avaliando agentes doadores de NO em corpos cavernosos de humanos e coelhos bem como no músculo anococcígeo de coelho, demonstraram 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 (BIVALACQUA et al., 2004; CELLEK; KASAKOV; MONCADA, 1996).

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 KCA outro canal ativado pelo NO (FÉLÉTOU, 2009). A ativação desses canais se 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(FÉLÉTOU, 2009). Todos esses dados sugerem que o fármaco não produz ação ativando canais de potássio KATP, e sim diretamente a sGC, como definido em estudos preliminares, e possivelmente outros canais de potássio podem estar envolvidos, para definir isso teríamos que realizar outros experimentos com TEA e outros bloqueadores específicos de cada tipo de canal de potássio.

A contração da musculatura lisa do corpo cavernosa é o que faz o corpo cavernoso manter o estado flácido e retorno a esse estado chama-se detumescência(ANDERSSON, 2011; MACDONALD; BURNETT, 2021). Esse estado é mantido por três principais mecanismos: o aumento de concentração de fatores contráteis derivados do endotélio, neurotransmissor adrenérgico e contrações miogênicas intrínsecas (LINDER et al., 2005).

Vários estudos tem tentado provar o efeito sinérgico dos estimuladores de GCs com outras drogas que agem em diferentes mecanismos dentro da via do NO/GC-GMPc(ALBERSEN et al., 2013; BISCHOFF et al., 2003; CLAUDINO et al., 2011; OUDOT

et al., 2011). Essa busca por esse efeito sinérgico, advém, pois em situações em que há diminuição da concentração de NO, o efeito dos IPDE5, é limitado. Uma estratégia interessante, seria, na deficiência de NO você testar uma droga que aumentasse a disponibilidade desse composto, ou substâncias que induzissem diretamente a produção do GMPc(ALBERSEN et al., 2013).

Um interessante mecanismo para promoção do relaxamento da musculatura cavernosa é a via de RhoA/kinase. A manutenção do estado de contração da musculatura lisa é feita através principalmente do aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  através dos fatores de contração (noradrenalina, ET-1, etc) que ativam seus respectivos receptores via proteína G, gerando seu efeito via calmodulina, ativando a miosina de cadeia leve (MLC) a fosforilar, promovendo a ligação da miosina com a actina (SOPKO; HANNAN; BIVALACQUA, 2014).

Contudo, somente esse aumento não explica qual motivo, de que essa fosforilação não é proporcional a concentração intracitoplasmática de  $Ca^{2+}$ . Depois comprovou-se que a RhoA é uma enzima que sensibiliza o  $Ca^{2+}$ , diminuindo a ação da enzima MLC fosfatase, aumentando a fosforilação da MLC, causando em última análise a contração da fibra muscular lisa sem aumento da concentração do Ca intracitoplasmático(SECCIA et al., 2020).

Os efeitos da RhoA se dão com ativação da enzima ROCK, que promove a contração através do mecanismo citado. Esse mecanismo parece importante na manutenção do estado de flacidez peniana, pois a concentração de RhoA e ROCK é 17 vezes maior na musculatura cavernosa do que no íleo (UVIN et al., 2017).

Estudou-se o efeito da adição de um inibidor da RhoA/ROCK (HA-1077) no relaxamento do corpo cavernoso. Esse experimento não mostrou nenhum efeito adicional ao relaxamento já encontrado pelo IWP-051, nem no que diz respeito ao relaxamento máximo nem ao aumento de potência.

Em um estudo clássico, testando o Y-27632, em corpos cavernosos de ratos, ChitaleyeWebb (2002)comprovaram o efeito relaxante dessa droga, identificando se tratar de uma independente da via do NO. Contudo, em trabalhos posteriores, foi visto que a remoção do NO, ou células endoteliais, ou bloqueio da GCs, reduzem o efeito dessa classe de drogas, sugerindo que o efeito final da via do NO é a inibição da Via da RhoA/ROCK.

Por agirem em vias de relaxamento separado, o efeito aditivo de duas substâncias pode melhorar o efeito relaxante das drogas. Testando o mesmo Y-27632 em CCH, de pacientes com DE, a adição da Vardenafila melhorou consideravelmente o relaxamento das faixas de tecidos de corpo cavernoso, mostrando um bom efeito sinérgico entre essas duas classes (UVIN et al., 2017).

Em outro estudo objetivando avaliar o efeito sinérgico dessas classes de medicação, utilizando injeção intracavernosa em CC de ratos, Wilkes *et al.* (2004), encontraram resultados semelhantes com efeito sinérgico positivo. Não há estudos que associam o uso de um indutor da GCs e um inibidor da ROCK, talvez essa combinação não acrescente melhora do Emax, ou da potência. Por outro lado, esse efeito de adição de relaxamento não foi alcançado pois as tiras de corpos cavernosos utilizados foram sem disfunção endotelial, e o efeito de relaxamento máximo já foi alcançado. Sendo assim, essa combinação pode ter seu papel em corpos cavernosos disfuncionais.

Durante a realização dos experimentos, notou-se que algumas faixas de tecidos de corpos cavernosos exibiam contrações rápidas, durante o período de relaxamento. Esse efeito era mais proeminente quando o experimento era realizado no dia da captura do espécime.

De acordo com Andersson e Wagner (1995), um dos mecanismos de manutenção da flacidez peniana são contrações miogênicas intrínsecas. Apenas em ou outro manuscrito, foram descritas essas contrações espontâneas em CC de coelhos, não sendo mais descrito em trabalhos posteriores (HÖPPNER *et al.*, 1996). Outros trabalhos, utilizando eletromiografia de corpo cavernoso demonstraram as ondas lentas eram responsáveis pela manutenção da flacidez peniana (KELLNER *et al.*, 2000; MACHTENS *et al.*, 1997).

Devido ao tipo de contração, especula-se tratarem de contrações miogênicas, e o mecanismo de ação ainda é obscuro. A presença de marcapassos celulares (células de cajal) em algumas faixas de corpos cavernosos (Figura 12) podem representar que essas células podem possuir papel importante nessas contrações. Outros estudos comprovaram a presença tanto em CCH (SHAFIK; SHAFIK; SHAFIK, 2009), como também em uretra, bexiga e ureter (MCCLOSKEY; GURNEY, 2002; PEZZONE *et al.*, 2003).

Acreditando que essas contrações possuem algum papel na manutenção do estado de flacidez peniana, estudou-se o efeito do IWP-051 tanto na frequência, como na amplitude de onda das contrações. No trabalho, comprovou-se que o uso da substância abole tanto a frequência como a amplitude quando é adicionada a concentração de  $10^{-5}$ M podendo contribuir para o início da cascata de relaxamento do CCH.

Estudando corpos cavernosos de coelho, Höppner *et al.* (1996), descreveram essas contrações pela primeira vez, descrevendo que as mesmas são diminuídas com nifedipina e doadores de NO. Christ *et al.*, demonstraram que essas contrações miogênicas espontâneas eram comuns até 24h após a retirada dos corpos cavernosos. Além disso, elas pareciam ser mediadas pelas ciclooxigenases. Outro dado adicional, que diverge dos nossos dados, é que essas contrações eram bastante heterogêneas, enquanto em nosso estudo podemos notar que as



mesmas eram bem constantes e bem semelhantes.(CHRIST et al., 1990). Mas até agora, em nosso conhecimento, foi o primeiro estudo que avaliou o efeito de uma substância relaxadora nessas contrações miogênicas, com resultados bastante promissores. Claro que esses dados são preliminares e outros estudos precisam ser realizados para definir o papel dessas contrações no mecanismo de flacidez peniana. Supõe-se também que essas contrações podem ser estimuladas pelas células de Cajal.

Os efeitos da via NO/GMPc vão ser finalizados na estimulação de uma proteínquinaseGMPc dependente(DEFWE et al., 2010). A fosforilação da VASP é um dos efeitos finais dessa via, sendo a VASP uma fosfoproteína pertencente à famíliaEna/VASPenvolvidas na dinâmica da regulação do citoesqueleto, como inativação da agregação plaquetária (BUTT et al., 1994), nucleação dos filamentos de actina(JIN et al., 2005) recrutamento de profilina e G-Actina. Além disso, ela é encontrada não somente em estruturas de adesão, como também na membrana plasmática propiciando protusão lamelipodial e as pontas filopdiais, necessárias tanto para a movimentação celular como fagocitose(WALDERS-HARBECK et al., 2002).

Ao utilizar a dosagem da fosforilação da VASP, define-se que a droga age ativando essa via. Os resultados encontrados mostraram que a concentração defosforilação da VASP encontrada no grupo IWP é cerca de 3 vezes maior que o grupo controle. A utilização do ODQcausou a redução de cerca de 30%da fosforilação em comparação ao da substância isolada. Esses dados sugerem fortemente que a ação do IWP se dá pela via do GMPc. Esses dados são concordantes com a literatura.

Estudando tiras de artéria mesentérica sem endotélio em ratos, Banday e Lokhandwala (2019) demonstraram que uma droga doadora de NO, relaxava esses tecidos, e aumentaram a concentração de pVASP. Além disso, foi demonstrado, que assim como o IWP, por agirem na porção HEME da GCs, a adição de ODQ bloqueou a ativação da PKG. A oxidação causou bloqueio na ação do doador de NO, reduzindo a pVASP.

Outras substâncias como o ativador de GCs,BAY 60-2770, obtiveram resultados semelhantes aumentando a concentração de pVASP, utilizando um modelo de crescimento arterial em ratos. A adição desse composto foi capaz de aumentar consideravelmente os níveis de fosforilação da VASP(HOLT et al., 2016).

Nessa mesma metodologia, Joshiet al. (2011), obtiveram uma concentração de pVASP cerca de 3 x maior que o veículo, esse dado é muito interessante, pois essa droga é um estimulador da GCs, mesma classe da droga testada neste trabalho, e coincidentemente produzindo alcançando o mesmo poder de efeito de fosforilação.

Para determinar 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 IWP apresentavam uma concentração de GMPc cerca de 3x maior que o veículo (controle).

Além disso, quando adicionado o ODQ, houve uma redução importante da geração do GMPc, sendo estatisticamente significativa. Esses resultados comprovam que o IWP-051 produz GMPc através da indução da GCs, e a redução alcançada pela adição do ODQ, confirmam a ação da substância no sítio HEME NO-dependente. Testando um doador de NO, e corpos cavernosos humanos, a concentração de GMPc nesse estudo foi maior no grupo tratado com a substância, cerca de 74% a mais que as tiras tratadas com o veículo DMSO, e houve também bloqueio importante com o uso do ODQ (LEITÃO JUNIOR et al., 2016). 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.

Esse trabalho é o primeiro que demonstra o efeito relaxante da droga indutora de GCs IWP-051 em faixas de tecidos de corpos cavernosos humanos. Além disso, utilizando uma grande amostragem, realizou-se múltiplos experimentos para demonstrar tanto a eficácia da substância, como elucidar alguns mecanismos de ação da mesma. Outra importante contribuição foi a realização de experimentos com substâncias que poderiam agir sinergicamente no efeito relaxante dessa classe droga. Ainda nos experimentos, demonstrou-se que o fármaco gera uma concentração importante de GMPc e fosforilação da VASP, definindo o mecanismo de ação através da via NO/GMPC.

Adicionalmente, um dado complementar desse estudo foi a descrição das contrações miogênicas espontâneas oriundas do corpo cavernoso. Esses resultados já foram encontrados por outros autores, porém não foram valorizados. Essas contrações podem ser importantes para explicar os mecanismos fisiológicos do estado de flacidez peniana e o início do relaxamento, já que essas são reflexo de um sincronismo das células da musculatura lisa cavernosa. O teste de novas substâncias nessas contrações pode abrir um grande leque de possibilidades experimentais, mostrando no futuro um grande caminho para o desenvolvimento de outras drogas. O próximo passo para esses experimentos será testar esse fármaco em corpos cavernosos com disfunção endotelial, para avaliar os seus efeitos em condições que outras substâncias falham. E finalmente testar em ensaios clínicos com pacientes.

O trabalho atual conclui que, o IWP-051 é um potente agente de relaxamento da musculatura lisa em corpos cavernosos de humanos, atuando na indução da enzima guanilato ciclase solúvel. A adição de IPDE 5 e inibidores da RhoA/kinase não demonstrou benefício no efeito relaxante máximo ou na potência.

Estudos adicionais *in vitro* poderiam ser desenvolvidos, utilizando-se mais amostras, investigando-se mecanismos de ação diferentes como: ativação de canais de outros íons, 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 indutoras da GCs.

## 6 CONCLUSÕES

1. O Fármaco IWP-051 possui um efeito relaxante da musculatura lisa de corpos cavernosos de humanos.
2. O Fármaco possui efeito, *in vitro*, comparável à Tadalafila.
3. O agente tem sua ação diminuída na ausência de NO endógeno.
4. O IWP-051 atua no sistema de sinalização celular NO/GMPc, estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel
5. Parte do efeito da droga está relacionada com a ativação de canais de potássio
6. Não há aparente ativação dos canais de potássio dependente de ATP, durante o processo de relaxamento da musculatura lisa cavernosa.
7. Há indícios de que não há efeitos sinérgicos com inibidores da ROCK
8. O IWP-051 abole as contrações espontâneas do CC com concentrações superiores a  $10^{-5}$  M.
9. O IWP-051 gera uma importante concentração de VASP, com efeito parcialmente abolido pela adição do ODQ
10. O IWP-051 gera uma considerável concentração de GMPc, com efeito diminuído pela adição de ODQ

## REFERÊNCIAS

- ABDEEN, B. M.; LESLIE, S. W. **Stuttering Priapism**. [s.l.: s.n.].
- ABSI, M. et al. Simvastatin causes pulmonary artery relaxation by blocking smooth muscle ROCK and calcium channels: Evidence for an endothelium-independent mechanism. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220473, 1 ago. 2019.
- ALBERSEN, M. et al. Synergistic effects of bay 60-4552 and vardenafil on relaxation of corpus cavernosum tissue of patients with erectile dysfunction and clinical phosphodiesterase type 5 inhibitor failure. **Journal of Sexual Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1268–1277, 2013.
- ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 191–236, 1 jan. 1995.
- ANDERSSON, K.-E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 4, p. 811–859, dez. 2011.
- ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 8, p. 3203–3207, 1 ago. 1977.
- AYTAÇ; MCKINLAY; KRANE. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU International**, v. 84, n. 1, p. 50–56, jul. 1999.
- BARACAT, J. S. et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, n. 2, p. 163–169, 2003.
- BISCHOFF, E. et al. BAY 41-2272: A stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. **Urology**, v. 61, n. 2, p. 464–467, 2003.
- BIVALACQUA, T. J. et al. Pharmacotherapy for erectile dysfunction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 12, p. 484–489, dez. 2000.
- BIVALACQUA, T. J. et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: A mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 24, p. 9121–9126, 2004.
- BONAVENTURA, D. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 215–222, 2007a.
- BONAVENTURA, D. et al. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 215–222, mar. 2007b.
- BONAVENTURA, D. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 4, p. 287–295, jun. 2008.
- BRENOT, P. H. **Male impotence: a historical perspective**. PARIS: L'Esprit du Temps, 1994.
- BURNETT, A. L. et al. Nitric oxide: A physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 401–403, 1992.
- BURNETT, A. L. et al. Immunohistochemical Localization of Nitric Oxide Synthase in the Autonomic Innervation of the Human Penis. **Journal of Urology**, v. 150, n. 1, p. 73–76, jul. 1993.
- BUTT, E. et al. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14509–14517, 20 maio 1994.

- CELLEK, S.; KASAKOV, L.; MONCADA, S. Inhibition of nitregeric relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 1, p. 137–140, maio 1996.
- CERQUEIRA, J. B. G. et al. Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new nitric oxide donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex. **International braz j urol**, v. 34, n. 5, p. 638–647, out. 2008.
- CHRIST, G. J. et al. Pharmacological studies of human erectile tissue: Characteristics of spontaneous contractions and alterations in  $\alpha$ -adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, n. 2, p. 375–381, 1990.
- CHRIST, G. J. Gap junctions and ion channels: Relevance to erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, p. S15–S25, 2000.
- CLAUDINO, M. A. et al. Long-term oral treatment with BAY 41-2272 ameliorates impaired corpus cavernosum relaxations in a nitric oxide-deficient rat model. **BJU International**, v. 108, n. 1, p. 116–122, 2011.
- CORBIN, J. D. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, n. S1, p. S4–S7, 6 jun. 2004.
- CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13729–13732, maio 1999.
- DEFAWE, O. D. et al. VASP phosphorylation at serine239 regulates the effects of NO on smooth muscle cell invasion and contraction of collagen. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, n. 1, p. 230–237, jan. 2010.
- DOULIAS, P. T.; TENOPOULOU, M. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, p. 1–10, 2020.
- EVGENOV, O. V et al. Soluble Guanylate Cyclase Activator Reverses Acute Pulmonary Hypertension and Augments the Pulmonary Vasodilator Response to Inhaled Nitric Oxide in Awake Lambs. p. 2253–2259, 2004.
- EVGENOV, O. V et al. **NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cyclicgmp.net>>.
- FELDMAN, H. A. et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **The Journal of urology**, v. 151, n. 1, p. 54–61, jan. 1994.
- FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: Therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 545–562, 2009.
- FILIPPI, S. et al. Effects of NCX 4050, a new NO donor, in rabbit and human corpus cavernosum. **International Journal of Andrology**, v. 26, n. 2, p. 101–108, abr. 2003.
- FOLLMANN, M. et al. The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 36, p. 9442–9462, 2013.
- FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010.
- FRIEBE, A.; KOESLING, D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 53, n. 1, 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, n. 5789, p. 373–376, nov. 1980.
- GOLDSTEIN, I. et al. Epidemiology Update of Erectile Dysfunction in Eight Countries with High Burden. **Sexual Medicine Review**, v. 8, n. 1, p. 48–58, 2020.
- GONZALEZ-CADAVID, N. F.; IGNARRO, L. J.; RAJFER, J. **Nitric oxide and the cyclic GMP system in the penis**. **Molecular Urology**, 1999.

- GRIMMINGER, F. et al. Riociguat for the Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. 2013.
- GRZEŚK, G.; NOWACZYK, A. **Current modulation of guanylate cyclase pathway activity—mechanism and clinical implications.** *Molecules* MDPI AG, , 1 jun. 2021.
- GUAY, A. T. Relation of endothelial cell function to erectile dysfunction: implications for treatment. **The American journal of cardiology**, v. 96, n. 12B, p. 52M-56M, 26 dez. 2005.
- HEDLUND, P. et al. CHOLINERGIC NERVES IN HUMAN CORPUS CAVERNOSUM AND SPONGIOSUM CONTAIN NITRIC OXIDE SYNTHASE AND HEME OXYGENASE. **The Journal of Urology**, p. 868–875, set. 2000.
- HOLT, A. W. et al. Soluble guanylyl cyclase-activated cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits arterial smooth muscle cell migration independent of VASP-serine 239 phosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 9, p. 1364–1379, 1 set. 2016.
- HÖPPNER, C. K. et al. Electrical and chemical control of smooth muscle activity of rabbit corpus cavernosum in vitro. **Urology**, v. 48, n. 3, p. 512–518, set. 1996.
- HSU, G.-L. et al. Penile venous anatomy: an additional description and its clinical implication. **Journal of andrology**, v. 24, n. 6, p. 921–7, [s.d.].
- HU, S. et al. **Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP.** [s.l: s.n.].
- IGNARRO, L. J. Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 535–560, abr. 1990.
- JOCELYN, H. D.; SETCHELL, B. P. Regnier de Graaf on the human reproductive organs. An annotated translation of *Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus* (1668) and *De Mulierub Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus* (1962). **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 17, p. 1–222, dez. 1972.
- JOHANNES, C. B. et al. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **The Journal of urology**, v. 163, n. 2, p. 460–3, fev. 2000.
- JUNIOR, A. S. L. et al. Relaxant effect of a metal-based drug in human corpora cavernosa and its mechanism of action. n. July, p. 1–5, 2015.
- KALSI, J. S. et al. BAY41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **Journal of Urology**, v. 169, n. 2, p. 761–766, 2003.
- KELLNER, B. et al. Computerized classification of corpus cavernosum electromyogram signals by the use of discriminant analysis and artificial neural networks to support diagnosis of erectile dysfunction. **Urological research**, v. 28, n. 1, p. 6–13, jan. 2000.
- KIM, N. et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 112–118, 1 jul. 1991.
- KINSEY, A. C.; POMEROY, W. R.; MARTIN, C. E. Sexual Behavior in the Human Male. **American Journal of Public Health**, v. 93, n. 6, p. 894–898, jun. 2003.
- KISHIMOTO, H. et al. Utilization of Sodium Nitroprusside as an Intestinal Permeation Enhancer for Lipophilic Drug Absorption Improvement in the Rat Proximal Intestine. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 21, 22 out. 2021.
- KNISPEL, H. H.; GOESSL, C.; BECKMANN, R. Nitric oxide mediates relaxation in rabbit and human corpus cavernosum smooth muscle. **Urological Research**, v. 20, n. 4, p. 253–257, jun. 1992.
- KOTS, A. Y.; BIAN, K.; MURAD, F. Nitric Oxide and Cyclic GMP Signaling Pathway as a Focus for Drug Development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 3299–3305, 2011.

- KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain research bulletin**, v. 62, n. 6, p. 505–15, 15 fev. 2004.
- KÜTHE, A. et al. Molecular biological characterization of phosphodiesterase 3A from human corpus cavernosum. **Chemico-Biological Interactions**, v. 119–120, p. 593–598, maio 1999.
- LEE, Y.-C.; MARTIN, E.; MURAD, F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: Expression, purification, and regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 20, p. 10763–10768, 26 set. 2000.
- LINDER, A. et al. Rho-Kinase and RGS-Containing RhoGEFs as Molecular Targets for the Treatment of Erectile Dysfunction. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 31, p. 4029–4040, 2005.
- LONGMAN, S. D.; HAMILTON, T. C. Potassium channel activator drugs: Mechanism of action, pharmacological properties, and therapeutic potential. **Medicinal Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 73–148, mar. 1992.
- LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–413, 2000.
- LUE, T. F. Erectile Dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 24, p. 1802–1813, 15 jun. 2000.
- LUNARDI, C. N.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 87–93, 2009.
- LUO, S. et al. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 22, p. 3548–53, 2014.
- MACDONALD, S. M.; BURNETT, A. L. **Physiology of Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction**. **Urologic Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 nov. 2021.
- MACHTENS, S. A. et al. Corpus cavernosum electromyography: technique and clinical implications. **Techniques in urology**, v. 3, n. 3, p. 147–51, 1997.
- MARTINEZ-PINEIRO, L. et al. Preliminary Results of a Comparative Study with Intracavernous Sodium Nitroprusside and Prostaglandin E1 in Patients with Erectile Dysfunction. **Journal of Urology**, v. 153, n. 5, p. 1487–1490, maio 1995.
- MCCLOSKEY, K. D.; GURNEY, A. M. Kit positive cells in the guinea pig bladder. **The Journal of urology**, v. 168, n. 2, p. 832–6, ago. 2002.
- MELMAN, A.; GINGELL, J. C. The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. **The Journal of urology**, v. 161, n. 1, p. 5–11, jan. 1999.
- MITTENDORF, J. et al. Discovery of riociguat ( BAY 63-2521 ): a potent , oral stimulator of hypertension. v. 1, p. 2521, 2009.
- MIZUSAWA, H. et al. Nitric oxide independent activation of guanylate cyclase by YC-1 causes erectile responses in the rat. **Journal of Urology**, v. 167, n. 5, p. 2276–2281, 2002.
- MONTFORT, W. R.; WALES, J. A.; WEICHSEL, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 3, p. 107–121, 20 jan. 2017.
- MOREIRA, E. D. et al. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v. 58, n. 4, p. 583–588, out. 2001.
- MOREIRA JR, E. D. et al. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador, northeastern Brazil: a population-based study. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. S2, p. S3–S9, 8 ago. 2002.
- MOREIRA JÚNIOR, E. D. et al. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 120, n. 2, p. 49–54, mar. 2002.
- MÜLSCH, A. et al. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 4, p. 681–689, fev. 1997.



- MURAD, F. Discovery of Some of the Biological Effects of Nitric Oxide and its Role in Cell Signaling. **Bioscience Reports**, v. 24, n. 4–5, p. 452–474, 10 ago. 2004.
- NAKAI, T. et al. Discovery of IWP-051, a Novel Orally Bioavailable sGC Stimulator with Once-Daily Dosing Potential in Humans. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 5, p. 465–469, 2016.
- NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**, v. 270, n. 1, p. 83–90, 7 jul. 1993.
- OLIVER, D. et al. Gating of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels Controls Fast Inhibitory Synaptic Transmission at Auditory Outer Hair Cells. **Neuron**, v. 26, n. 3, p. 595–601, jun. 2000.
- OU DOT, A. et al. Combination of BAY 60-4552 and vardenafil exerts proerectile facilitator effects in rats with cavernous nerve injury: A proof of concept study for the treatment of phosphodiesterase type 5 inhibitor failure. **European Urology**, v. 60, n. 5, p. 1020–1026, 2011.
- PETERS, S. et al. cGMP Imaging in Brain Slices Reveals Brain Region-Specific Activity of NO-Sensitive Guanylyl Cyclases (NO-GCs) and NO-GC Stimulators. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2313, 7 ago. 2018.
- PEZZONE, M. A. et al. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 284, n. 5, p. F925-9, maio 2003.
- PICKARD, R. S.; POWELL, P. H.; ZAR, M. A. The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, n. 3, p. 755–759, nov. 1991.
- PRIETO, D. et al. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (KCa) channels are involved in the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1–3, p. 232–237, fev. 2006.
- PRIETO, D. Physiological regulation of penile arteries and veins. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, n. 1, p. 17–29, 2008.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 181–187, set. 1987.
- RAJFER, J. et al. Nitric Oxide as a Mediator of Relaxation of the Corpus Cavernosum in Response to Nonadrenergic, Noncholinergic Neurotransmission. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 2, p. 90–94, 9 jan. 1992.
- SANDNER, P.; BECKER-PELSTER, E. M.; STASCH, J. P. Discovery and development of sGC stimulators for the treatment of pulmonary hypertension and rare diseases. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 77, n. March, p. 88–95, 2018.
- SCHERMULY, R. T. et al. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 4, p. 881–891, 14 maio 2008.
- SECCIA, T. M. et al. ROCK (RhoA/Rho Kinase) in Cardiovascular–Renal Pathophysiology: A Review of New Advancements. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1328, 2 maio 2020.
- SEIDLER, M. et al. In Vitro Effects of a Novel Class of Nitric Oxide (NO) Donating Compounds on Isolated Human Erectile Tissue. **European Urology**, v. 42, n. 5, p. 523–528, nov. 2002.
- SHAFIK, A.; SHAFIK, I.; SHAFIK, A. A. Archives of Andrology INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN ERECTILE DYSFUNCTION. v. 5016, 2009.
- SHAH, J. Erectile dysfunction through the ages. **BJU International**, v. 90, n. 4, p. 433–441, 14 ago. 2002.

- SILVA, L. F. G. et al. Phentolamine relaxes human corpus cavernosum by a nonadrenergic mechanism activating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. **International Journal of Impotence Research**, v. 17, n. 1, p. 27–32, 2005.
- SOORIYAMOORTHY, T.; LESLIE, S. W. **Erectile Dysfunction**. [s.l: s.n.].
- SOPKO, N. A.; HANNAN, J. L.; BIVALACQUA, T. J. Understanding and targeting the Rho kinase pathway in erectile dysfunction. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 11, p. 622–628, 14 nov. 2014.
- SOUSA, C. M. et al. The Relaxation Induced by Uroguanylin and the Expression of Natriuretic Peptide Receptors in Human Corpora Cavernosa. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 11, p. 3610–3619, nov. 2010.
- STIEF, C. G. et al. Preliminary report on the effect of the nitric oxide donor SIN-1 on human cavernous tissue in vivo. **World Journal of Urology**, v. 9, n. 4, dez. 1991.
- 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. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p. 654–661, fev. 2006.
- TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Effects of 5-Cyclopropyl-2- [ 1- ( 2-fluoro-benzyl ) -1 H - on Smooth Muscle Tone , Soluble Guanylyl Cyclase Activity , and NADPH Oxidase Activity / Expression in Corpus Cavernosum from Wild-Type , Neuronal , and Endothelial Nitric-Oxide Synthase Null Mic. v. 322, n. 3, p. 1093–1102, 2007.
- THOONEN, R. et al. Cardiovascular and pharmacological implications of haem-deficient NO-unresponsive soluble guanylate cyclase knock-in mice. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–12, 2015.
- THORNBURY, K. D.; HOLLYWOOD, M. A.; SERGEANT, G. P. Ion Channels and Intracellular Calcium Signalling in Corpus Cavernosum. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. v. 1124p. 171–194.
- TOQUE, H. A. et al. Comparative Relaxing Effects of Sildenafil, Vardenafil, and Tadalafil in Human Corpus Cavernosum: Contribution of Endogenous Nitric Oxide Release. **Urology**, v. 74, n. 1, p. 216–221, jul. 2009.
- TRIGO-ROCHA, F. et al. Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 264, n. 2, p. H419–H422, 1 fev. 1993.
- UVIN, P. et al. Additive effects of the Rho kinase inhibitor Y-27632 and vardenafil on relaxation of the corpus cavernosum tissue of patients with erectile dysfunction and clinical phosphodiesterase type 5 inhibitor failure. **BJU International**, v. 119, n. 2, p. 325–332, 2017.
- VENKATESWARLU, K. et al. 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. **Journal of Urology**, v. 168, n. 1, p. 355–361, 2002.
- VIDEBAEK, L. M.; AALKJAER, C.; MULVANY, M. J. Pinacidil opens K<sup>+</sup>-selective channels causing hyperpolarization and relaxation of noradrenaline contractions in rat mesenteric resistance vessels. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 103–108, set. 1988.
- VLACHOPOULOS, C. V et al. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Circulation. Cardiovascular quality and outcomes**, v. 6, n. 1, p. 99–109, 1 jan. 2013.
- WALDERS-HARBECK, B. et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. **FEBS Letters**, v. 529, n. 2–3, p. 275–280, 9 out. 2002.

- WIERASZKO, A. et al. The influence of NO-containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. **Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 1535–1544, fev. 2001.
- XIAO, S. et al. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. p. 1544–1557, 2019.
- YAFI, F. A. et al. Erectile dysfunction. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16003, 2016.
- YIEE, J. H.; BASKIN, L. S. Penile embryology and anatomy. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 1174–9, 29 jun. 2010.
- ZHAO, Y. et al. Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase by ODQ †. **Biochemistry**, v. 39, n. 35, p. 10848–10854, set. 2000.
- ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **JournalofPharmacologicalSciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

**APÊNDICE – TERMO DE CONSENTIMENTO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Dados de identificação**

**Título do Projeto:**

**Pesquisador Responsável:**

**Nome do participante:**

**Data de nascimento:**

**R.G.:**

**Responsável legal (quando for o caso):**

**R.G.:**

**Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, do projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RELAXAMENTO DO COMPOSTO IWP-051, EM FAIXAS DE TECIDOS DE CORPO CAVERNOSO HUMANO de responsabilidade do (a) pesquisador (a) ALEXANDRE SABOIA LEITÃO JUNIOR**

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade

Pelo presente termo de consentimento, eu \_\_\_\_\_ (Responsável/familiar),  
 \_\_\_\_\_ (naturalidade) \_\_\_\_\_ (identidade),  
 \_\_\_\_\_ (estado civil), residente a  
 \_\_\_\_\_ (endereço), cidade de  
 \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ (parentesco) do \_\_\_\_\_  
 (doador), internado no Hospital \_\_\_\_\_ no dia \_\_\_\_\_,  
 prontuário: \_\_\_\_\_, que teve sua morte encefálica às \_\_\_\_\_ do dia  
 \_\_\_\_\_, e após exames clínicos e complementares por equipe médica especializada,  
 autorizo, de minha livre e espontânea vontade, a remoção de fragmentos (pedaços) de cerca  
 de 1cm de corpo cavernoso (pequeno pedaço da parte interna do pênis), os quais serão  
 utilizados para fins de pesquisa científica nos termos da lei nº 8.489 de 18 de novembro de  
 1992, regulamentada pelo decreto nº 879 de 22 de julho de 1993 e também o DECRETO Nº  
 9.175, DE 18 DE OUTUBRO DE 2017, que regulamenta a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997,  
 para tratar da disposição de órgãos, tecidos, células e partes do corpo humano para fins de

transplante e tratamento. 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-estudo em laboratório). A publicação dos resultados deste estudo não terá identificação do doador.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

ass: \_\_\_\_\_

(Parente responsável pela doação)

Testemunhas:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Dr.Alexandre Saboia Leitão Júnior  
 Pesquisador Responsável Universidade Federal do Ceará Tel 85 8890 1044 e-mail:  
 alex\_leitao@hotmail.com

Aprovado pelo CEP/UFC PROPESQ de acordo com a resolução 466/12  
 ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta- feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos., CEP/UFC/PROPESQ 3366-8346

Aprovado pelo Comitê em Ética em Pesquisa com Seres Humanos CEP/IJF

Tel:85-32555093

Título da Pesquisa: Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RELAXAMENTO DO COMPOSTO IWP-051, EM FAIXAS DE TECIDOS DE CORPO CAVERNOSO HUMANO.

Propósito: Projeto institucional Informações:

O Presente trabalho justifica-se pela nova busca na procura de novas medicações para o tratamento da Disfunção erétil (impotência sexual). Estima-se que a disfunção erétil atinja cerca de 150 milhões de homens (McKinlay, 2000). No Brasil, as estimativas apontam que mais de 40% dos brasileiros entre 40 e 70 anos sofram desta condição (Moreira *et al.*, 2001) e que pelo menos um milhão de novos casos surjam por ano nesta mesma faixa etária (Moreira, 2002 a e b). Apesar dessa condição não ser fatal, não deve ser considerada um distúrbio benigno, uma vez que pode ter um efeito extremamente negativo na relação conjugal do paciente, em sua auto-estima, comprometendo seu bem estar e qualidade de vida.

A hipótese de trabalho sugerida neste estudo é que a substância IWP-051 pode promover a ereção por aumentar o fluxo sanguíneo no pênis(possui propriedades vasodilatadoras importantes no endotélio vascular e na musculatura lisa de corpos cavernosos).

A obtenção (retirada) do fragmento (pedaço) de corpo cavernoso (parte interna do pênis) é realizada com a dissecação retropúbica (retirada através do abdômen) do corpo cavernoso, através da mesma incisão (corte) da captação dos outros órgãos (xifopubiana). Os benefícios dessa pesquisa é descobrir novas medicações para o tratamento da disfunção erétil (impotência) . Não há riscos para os doadores, pois não altera a característica externa, ou seja não dá para notar por fora. Não serão divulgados nem nome nem característica do doador, sendo utilizada apenas a amostra de corpo cavernoso para estudo in vitro.

**Vale ressaltar que não há compensação financeira relacionada à participação. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa e seus procedimentos.**

Eu discuti com Alexandre Sabóia Leitão Júnior sobre a minha decisão em participar. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

**ANEXO A – MATERIAL CIRÚRGICO USADO NOS EXPERIMENTOS**

---


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


## ANEXO B – LIBERAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

– DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RELAXAMENTO DO COMPOSTO IWP-051, EM TIRAS DE CORPO CAVERNOSO HUMANO  
**Pesquisador Responsável:** alexandre saboia leitão júnior  
**Área Temática:**  
**Versão:** 2  
**CAAE:** 12932419.0.3001.5047  
**Submetido em:** 22/08/2019  
**Instituição Proponente:** Instituto Dr. José Frota - IJF/ Prefeitura de Fortaleza  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_1388202

– DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações										
<div style="display: flex;"> <div style="width: 30%; border-right: 1px solid #ccc; padding-right: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Versão Atual Aprovada (POC) - Versão 2               <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Documentos de Centro Coordenador                   <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Pareceres</li> <li>▶ Documentos do Projeto                       <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Comprovante de Recepção - Submi</li> <li>▶ Cronograma - Submissão 4</li> <li>▶ Declaração de Instituição e Infraestr</li> <li>▶ Declaração de Pesquisadores - Sub</li> <li>▶ Folha de Rosto - Submissão 4</li> <li>▶ Informações Básicas do Projeto - Si</li> <li>▶ Orçamento - Submissão 4</li> <li>▶ Outros - Submissão 4</li> <li>▶ Parecer Anterior - Submissão 4</li> <li>▶ Projeto Detalhado / Brochura Invest</li> <li>▶ TCLE / Termos de Assentimento / Jk</li> </ul> </li> <li>▶ Pendência de Parecer (POC) - Versão 2                       <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Documentos do Projeto                           <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Comprovante de Recepção - Submi</li> <li>▶ Folha de Rosto - Submissão 2</li> <li>▶ Informações Básicas do Projeto - Si</li> <li>▶ Outros - Submissão 2</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </div> <div style="width: 70%; padding-left: 5px;"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr style="background-color: #f2f2f2;"> <th style="width: 40%;">Tipo de Documento</th> <th style="width: 15%;">Situação</th> <th style="width: 15%;">Arquivo</th> <th style="width: 15%;">Postagem</th> <th style="width: 15%;">Ações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="height: 200px;"> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>					Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações					
Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações										



