



**Universidade Federal do Ceará**  
**Departamento de Cirurgia Geral**  
**Faculdade de Medicina**

**JOÃO BATISTA GADELHA DE CERQUEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO  
RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA E DA  
AORTA DE COELHO, INDUZIDO POR DOADORES DE ÓXIDO  
NÍTRICO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO**

**Fortaleza**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO BATISTA GADELHA DE CERQUEIRA

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO RELAXAMENTO DA  
MUSCULATURA LISA CAVERNOSA E DA AORTA DE COELHO, INDUZIDO  
POR DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO

Tese submetida à Coordenação do  
Programa de Pós-Graduação *Stricto  
Sensu* em Cirurgia da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio  
Gonzaga-Silva

FORTALEZA

2008

C394a Cerqueira, João Batista Gadelha de

Avaliação dos mecanismos envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa e endotélio vascular da aorta de coelho induzido por doadores de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio/ João Batista Gadelha de Cerqueira; orientador: Lucio Flávio Gonzaga Silva. – Fortaleza, 2008.

126. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2008.

1. Óxido Nítrico – antagonista e inibidores 2 Dibutilil GMP Cíclico – antagonistas e inibidores 3. Pênis – irrigação sanguínea 4. Pênis – Efeitos de drogas 5. Endotélio Vascular - efeitos de drogas 6. Compostos de Rutênio - metabolismo I. Silva, Lucio Fávio Gonzaga (orient.) II. Título

CDD: 615.2632

JOÃO BATISTA GADELHA DE CERQUEIRA

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA E DA AORTA DE COELHO, INDUZIDO POR DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO DO COMPLEXO NITROSIL-RUTÊNIO

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

**Aprovada em: 06/05/2008**

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Sidney Glina  
Universidade de Campinas-UNICAMP

---

Prof. Dr. Sílvio Tucci Júnior  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

---

Prof. Dr. Luís Gonzaga França Lopes  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará-UECE

**A Deus**

A meus pais, Washington e Maria das Dores, pela crença, amor e incentivo constante.

A minha mulher, Marta, simplesmente por existir, pela certeza do seu amor.

Aos nossos filhos, Natália e João Victor: a vida tem todo sentido.

A meus irmãos e irmãs: Júnior, Andréa, Adriana e Flávius, pela torcida e orgulho do irmão.

A meu sogro, José Victor (*in memoriam*) e minha sogra Maria Alfa, que me aceitaram como filho e me deram o maior presente.

A todos os cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, que fazem uma família de muito amor.

Ao doador desconhecido, a quem coube amar o próximo como a si mesmo.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga-Silva, orientador e amigo, um exemplo de ética, lealdade e moral.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos pela oportunidade de desenvolver este trabalho no programa de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, o qual, com amizade, competência e humildade tentou me ensinar os caminhos da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, que me convidou e incentivou desde o princípio a assumir este trabalho.

À Prof.a Dra. Cláudia Ferreira Santos, pelo apoio constante, preparação e diluição de todas as substâncias utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles, que permitiu a utilização da estrutura do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará para realização de boa parte deste trabalho.

Ao Prof. João Vianney Campos de Mesquita, da UFC e Academia Cearense de Língua Portuguesa, pela revisão ortográfica e gramatical deste ensaio.

Ao Dr. Clauber Mota de Sousa, Dr. Francisco José Arnaud Batista e à Dr.a Karina Moreira de Alencar Cunha, pela amizade, companheirismo e incentivo. Pela ajuda imensa em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ícaro de Souza Moreira e ao Prof. Dr. Luís Gonzaga França Lopes que confiaram e acreditaram na realização desta experiência e forneceram as substâncias Rut-Caf e Rut-By, objetos deste estudo.

Ao Prof. Dr. Sidney Glina e ao Prof. Dr. Sílvio Tucci Júnior por concordarem em fazer parte desta banca.

À enfermeira Lisiane Furtado Paiva e a todas as enfermeiras e funcionários da central de transplante que apesar de todas as dificuldades sempre se dispuseram a ajudar na captação de corpos cavernosos, utilizados no curso do presente ensaio.

Às famílias dos doadores, pelo ato de amor e solidariedade da doação e pelo desprendimento na colaboração a este experimento.

Ao meu amigo, Dr. Ailson Gurgel Fernandes pela grande ajuda durante meus períodos de ausência.

Aos residentes de Urologia: Rommel Prata Regadas, Danilo Gurgel Pinheiro, George Rafael Martins Lima, Frederico Costa dos Santos, Francisco Hidelbrando Alves Mota e Marcelo Leite Fernandes que entenderam minha ausência temporária e sempre se prontificaram a ajudar.

Aos colegas do Serviço de Urologia: Leocácio Vinícius Barroso, Paulo Henrique Moura Reis, Rômulo Augusto Silveira e Marcos Flávio Holanda Rocha pelo apoio e incentivo.

Aos estudantes Thiago Camelo Mourão, Suzana Lia Cavalcante e Paula Priscila Correa Costa pela grande ajuda durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru pela avaliação e revisão estatística dos resultados aqui apresentados.

Aos técnicos de laboratório Adriano Santos da Silva e Francisco Evanir Gonçalves de Lima pela ajuda constante.

Ao funcionário do Biotério, Francisco Bento de Oliveira, pelo cuidado com os animais utilizados nos experimentos.

Às bibliotecárias Rosane Maria Costa e Maria Josineide Silva Góes, pela orientação na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica..

À funcionária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Maria Luciene Vieira de Oliveira, pela disponibilidade para resolução dos inúmeros entraves burocráticos.

## RESUMO

Disfunção endotelial provoca 56% de resistência ao tratamento da disfunção erétil pelos inibidores da PDE-5. Novas formas de tratamento são necessárias para este grupo de pacientes.

O estudo avaliou o relaxamento, *in vitro*, induzido por novas substâncias doadoras de óxido nítrico (NO) do complexo nitrosil-rutênio (Rut-By, Rut-Caf) na musculatura lisa de corpos cavernosos humanos e de coelho e em anéis de aorta de coelho e do nitroprussiato de sódio (SNP). Os tecidos, imersos em sistemas de banhos isolados em solução de KHS (pH 7,4; 37°C), foram pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1µM) e curvas de concentração-resposta ( $10^{-12}$ M a  $10^{-4}$ M) foram obtidas. Para esclarecer o mecanismo de ação envolvido no relaxamento induzido pelos agentes, foram adicionadas aos banhos as substâncias: ODQ (3µM, 10µM, 30µM e 100µM), inibidor da guanilatociclase solúvel; oxí-hemoglobina (3µM e 10µM), removedor extracelular do NO; L-cisteína (100µM), removedor intracelular do ânion nitroxil; hidroxocobalamina (100µM), removedor de radical livre do NO; glibenclamida, bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente ( $K_{ATP}$ ); iberiotoxina, bloqueador de canais de potássio de alta e média condutividade ( $K_{CA}$ ); apamina, bloqueador de canais de potássio de baixa condutividade ( $K_{CA}$ ). Amostras dos tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido para mensurar a quantidade de GMPc e AMPc produzido no relaxamento.

Todas as substâncias provocaram relaxamento estatisticamente significativo da musculatura lisa dos anéis de aorta. Na musculatura lisa cavernosa, só Rut-By não conseguiu induzir relaxamento significativo (efeito máximo= 30%). Neste tecido a Rut-Caf e SNP provocaram relaxamento dose-dependente, com efeito máximo de 80% e 100% e  $pEC_{50}$  4,2 e 5,2, respectivamente. Todas as substâncias mostraram atividade mediante a ativação da enzima guanilatociclase solúvel (GCs), pois a adição do ODQ 100µM aos banhos, inibiu totalmente o efeito relaxante. A oxí-hemoglobina em anéis de aorta de coelho na dose de 3µM, diminuiu o efeito máximo das substâncias em média 26% e, na dose de 10µM, houve uma redução adicional de 50% ( $p<0,05$ ). A L-cisteína falhou em alterar o relaxamento induzido pelos agentes estudados. A hidroxocobalamina em anéis de aorta e em corpo cavernoso de coelho aboliu o efeito relaxante da Rut-Caf (Efeito máximo: 112% x 10%;  $p<0,005$ ). A adição de glibenclamida em corpos cavernosos de coelho aumentou a potência da substância Rut-Caf (4,09 x 7,9;  $p<0,005$ ), sem alterar o efeito máximo. Não houve alteração de potência ou efeito máximo das substâncias com a adição de outros bloqueadores de canais de íons. A remoção do endotélio não alterou a potência e o efeito máximo da substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho. As substâncias liberaram GMPc em maior intensidade no corpo cavernoso do que em anéis de aorta.

As substâncias doadoras de NO do complexo nitrosil-rutênio são potentes vasodilatadores e uma delas (Rut-Caf), demonstrou relaxamento significativo no tecido cavernoso animal e humano. As substâncias atuam ativando a enzima guanilatociclase solúvel produzindo GMPc, liberam NO e radical livre do NO durante o relaxamento, mas não o ânion nitrosil. Os agentes não atuam diretamente nos canais de íons potássio. A substância Rut-Caf atua independentemente da integridade endotelial.

**Palavras chave:** Óxido Nítrico – antagonista e inibidores; Dibutilil GMP Cíclico – antagonistas e inibidores; Pênis – irrigação sanguínea e Efeitos de drogas;. Endotélio Vascular - efeitos de drogas; Compostos de Rutênio - metabolismo

## ABSTRACT

Endothelial dysfunction makes 56% of patients with erectile dysfunction decline treatment with PDE-5 inhibitors. New forms of treatment are necessary for this group of patients.

The present study evaluates the relaxation *in vitro* induced in rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic rings by sodium nitroprusside (SNP) and by two new NO-donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex: Rut-Byp and Rut-Caf. Tissues immersed in isolated baths of Krebs-Henseleit solution (37°C; pH 7.4) were precontracted with 1µM phenylephrine (PE). Relaxation concentration/response curves were plotted for all concentrations ( $10^{-12}$  to  $10^{-4}$  M). To explore the mechanisms involved in induced relaxation, the following substances were added: 3µM, 10µM, 30µM or 100µM ODQ (soluble guanylate cyclase-specific inhibitor), 3 µM or 10 µM oxyhemoglobin (extracellular NO scavenger), 1 mM L-cysteine (nitrosyl anion-specific scavenger), 100µM hydroxycobalamin (NO free radical scavenger), glibenclamide (ATP-dependent potassium channel blocker), iberiotoxin (medium and high-conductance potassium channel blocker) and apamin (low-conductance potassium channel blocker). The tissue samples were frozen in liquid nitrogen in order to quantify GMPc and AMPc produced during relaxation.

All the substances tested produced a significant level of relaxation in the aortic vascular endothelium. Similar results were found for corpus cavernosum smooth muscle, with the exception of Rut-Byp (Emax 30%). In this tissue, Rut-Caf e SNP induced dose-dependent relaxation with a potency (pEC50) of 4.2 and 5.2, and a maximum effect (Emax) of 100% and 80%, respectively. All substances acted through the activation of soluble guanylate cyclase (sGC); therefore, the addition of 100µM ODQ inhibited the relaxation effect completely in all cases. Oxyhemoglobin reduced relaxation induced by all substances. At 3µM, the maximum effect (Emax) was reduced by 26% on the average, and at 10µM the effect was reduced by another 50% ( $p<0.05$ ), though not completely neutralized. L-cysteine failed to affect relaxation, but hydroxycobalamin abolished Rut-Caf-induced relaxation in aortic rings (Emax: 112% vs 10%;  $p<0.005$ ). A significant reduction was observed in corpus cavernosum smooth muscle relaxation, though not as intense as in aortic rings. The addition of glibenclamide to the baths increased the potency of Rut-Caf significantly (4.09 vs. 7.9;  $p<0.005$ ) with no significant change in maximum effect. Potency and maximum effect remained unchanged with the other ion channel blockers. The agents released cGMP in both tissues studied.

NO-donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex were shown to be potent vasodilators. One substance (Rut-Caf) induced significant relaxation in animal corpus cavernosum. The substances tested in the study act through the activation of soluble guanylate cyclase producing intracellular GMPc. During relaxation they release NO and its free radical intracellularly, but not nitrosyl. They do not act directly upon potassium ion channels. Rut-Caf acts independently of the endothelial integrity.

**Key words:** Nitric Oxide – antagonistic and inhibitors; Cyclic GMP – antagonistic and inhibitors; Penile – arterial irrigation and drugs effects; Vascular endothelium – drugs effects; Ruthenium compounds – metabolism.

## Lista de Tabelas e Figuras

<b>Tabelas/Figuras</b>	<b>página</b>
Figura 1 - Anatomia artériovenosa peniana. Corte transversal.....	3
Figura 2 - Anatomia artériovenosa pélvica.....	4
Figura 3 - Neuroanatomia peniana.....	5
Figura 4 - Ereção peniana. Corte transversal.....	6
Figura 5 - Ereção peniana. Expansão vascular.....	7
Figura 6 - Farmacologia da ereção peniana.....	9
Figura 7 - Ação de canais de íon potássio na musculatura lisa.....	17
Figura 8 - Estrutura química do Cis-[Ru(bpy) <sub>2</sub> (SO <sub>3</sub> )(NO)] PF <sub>6</sub> (RutByp).....	21
Figura 9 - Trans-[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (cafeína)(NO)] C13 (Rut-Caf).....	21
Figura 10 - Pênis de coelho.....	24
Figura 11 - Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos.....	25
Figura 12 - Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo.....	25
Figura 13 - Segmento de corpo cavernoso e uretra.....	25
Figura 14 - Tira do corpo cavernoso de coelho.....	26
Figura 15 - Tiras de corpos cavernosos em sistema de banhos isolados .....	26
Figura 16 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações de Rut-Caf, Rut-Byp e SNP em corpos cavernosos de coelho.....	32
Tabela 1- Determinação dos parâmetros pEC <sub>50</sub> e E <sub>max</sub> para as substâncias Rut-Caf, Rut-Byp e SNP em corpos cavernosos de coelho.....	32
Figura 17 - Traçado fisiográfico representativo do efeito da Rut-Caf, em tiras de corpos cavernosos de coelho na presença de estímulo elétrico.....	33
Figura 18 - Traçado fisiográficos representativos do efeito da Rut-Caf (10 <sup>-11</sup> a 10 <sup>-4</sup> M) em tiras de corpos cavernosos humanos.....	34

Figura 19 - Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em tiras de corpos cavernosos de coelho na ausência ou presença L-cisteína (Cist).....	35
Tabela 2- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Caf e Rut-Caf + L-cisteína em corpos cavernosos de coelho.....	35
Figura 20 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho considerando a presença e ausência de oxihemoglobina (Rut-Caf + Oxi-Hemo).....	36
Tabela 3- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Caf e Rut-Caf+Oxi-Hemo em corpos cavernosos de coelho.....	36
Figura 21 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações de Rut-Caf, Rut-Byp e SNP em anel de aorta de coelho.....	37
Tabela 4- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Caf, Rut-Byp e SNP em anéis de aorta de coelho.....	37
Figura 22 - Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na ausência ou presença de oxi-hemoglobina.....	38
Tabela 5- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Caf , Rut-Caf+Oxi-Hemo3 e Rut-Caf+Oxi-Hemo10 em anéis de aorta de coelho.....	39
Figura 23- Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações de Rut-Byp em anel de aorta de coelho, considerando a presença e ausência de oxihemoglobina (Rut-Byp=Oxi-Hemo).....	40
Tabela 6- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Byp e Rut-Byp +Oxi-Hemo em anéis de aorta de coelho.....	40
Figura 24- Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na ausência ou presença de L-cisteína.....	41
Tabela 7- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> para Rut-Caf e Rut-Caf + L-cisteína em anéis de aorta de coelho.....	42
Tabela 8 - Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em corpos cavernosos de coelho.....	43
Figura 25 - Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em corpos cavernosos de coelho.....	43

Figura 26 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+glib em corpos cavernosos de coelho.....	44
Tabela 9 - Determinação dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em corpos cavernosos de coelho.....	45
Tabela 10 - Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho na presença e ausência de ibero+apamina.....	46
Figura 27 - Quantificação do Relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ibero-apamina em corpos cavernosos de coelho.....	47
Figura 28 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ibero-apamina em corpos cavernosos de coelho.....	48
Tabela 11 - Determinação dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ibero-apamina em corpos cavernosos de coelho.....	48
Tabela 12 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho, medidos em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor da glibenclamida.....	49
Figura 29 - Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em anéis de aorta de coelho.....	50
Figura 30 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em anéis de aorta de coelho.....	51
Tabela 13 - Determinação dos parâmetros $E_{max}$ e $pEC_{50}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + glibenclamida em anéis de aorta de coelho.....	51
Tabela 14 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na presença e ausência de ibero-apamina.....	52
Figura 31 - Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ibero-apamina em anéis de aorta de coelho.....	53
Figura 32 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf +ilbero-apamina em anéis de aorta de coelho.....	54
Tabela 15 - Determinação dos parâmetros $E_{max}$ e $pEC_{50}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ibero-apamina em anéis de aorta de coelho.....	54
Tabela 16 - Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho submetidos à remoção prévia do endotélio.....	55
Figura 33 - Curva concentração-resposta relativa ao relaxamento induzido por Rut-Caf em anéis de aorta de coelho sem endotélio.....	56

Tabela 17 - Medidas dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ relativos ao efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho sem endotélio.....	57
Tabela 18 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicoalamina.....	57
Figura 34 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + hidroxicoalamina em corpos cavernosos de coelho.....	58
Tabela 19- Determinação dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + Hidroxicoalamina em corpos cavernosos de coelho.....	58
Tabela 20 - Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicoalamina.....	59
Figura 35 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + hidroxicoalamina em anéis de aorta de coelho.....	60
Tabela 21 – Parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + hidroxicoalamina em anéis de aorta de coelho.....	60
Tabela 22 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10 $\mu$ M.....	61
Tabela 23 - Determinação dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10 $\mu$ M em corpos cavernosos de coelho .....	62
Figura 36- Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10 $\mu$ M em corpos cavernosos de coelho.....	63
Tabela 24 - Efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10 $\mu$ M.....	64
Figura 37 - Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10 $\mu$ M em anéis de aorta de coelho.....	65
Tabela 25 - Determinação dos parâmetros $pEC_{50}$ e $E_{max}$ nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10 $\mu$ M em anéis de aorta de coelho.....	66
Tabela 26 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 30 $\mu$ M.....	66

Figura 38 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30 $\mu$ M em anéis de aorta de coelho.....	67
Tabela 27- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30 $\mu$ M em anéis de aorta de coelho.....	67
Tabela 28- Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpos Cavernosos de coelho considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3 $\mu$ M.....	68
Figura 39- Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido Por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3 $\mu$ M em corpos cavernosos de coelho.....	69
Tabela 29- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3 $\mu$ M em corpos cavernosos de coelho.....	70
Tabela 30- Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3 $\mu$ M.....	70
Tabela 31- Determinação dos parâmetros pEC50 e E <sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3 $\mu$ M em anel de aorta de coelho.....	71
Figura 40- Liberação GMPc em anel de aorta de coelho.....	71
Tabela 32- Dados relativos à liberação de GMPc em anel de aorta de coelho.....	72
Figura 41- Liberação de GMPc em corpo cavernoso de coelho.....	72
Tabela 33- Dados relativos à liberação de GMPc em corpos cavernosos de coelho.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC: Adenilato ciclase

Ach: Acetilcolina

AMP: Adenosina monofosfato cíclico

AUA: American Urological Association

DE: Disfunção éretil

EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio

EFS: estímulo de campo elétrico transmural

$E_{max}$ : Percentual máximo de relaxamento induzido pelas substâncias estudadas

ET: Endotelinas

g: grama

GCs: Enzima guanililciclase solúvel

Glib: Glibenclamida

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

GNSO: S-nitroso-glutathione

GTP: Guanosina tri fosfato

Ibx: Iberotoxina

$K_{ATP}$ : canais de íon potássio dependentes de ATP ativados metabolicamente.

$K_{CA}$ : canais de íon potássio da alta, média e baixa condutividade ativados pelo cálcio.

KCl- Cloreto de potássio

L-cist: L-cisteína.

L-NAME: N-ômega-nitro-L-arginina metil éster.

MMAS: Massachusetts Male Aging Study.

mmHg: Milímetros de mercúrio.

mN: miliNewton

NIH: National Institute Health.

NO: Óxido nítrico.

NOR: Noradrenalina

NOSe; Enzima óxido nítrico sintase endotelial.

NOSn; Enzima óxido nítrico sintase neuronal.

ODQ; 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-ona.

PDE-5: Fosfodiesterase específica do GMPc.

pEC<sub>50</sub>: cologarítimo da concentração da substância que provoca 50% do efeito máximo.

PGE-1: Prostaglandina E-1.

PHE: Fenilefrina

PI3: Inositol Tri-fosfato.

PKG: Proteína quinase G.

RbCC: corpos cavernosos de coelho

Rut-Byp ou FONO1: Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> .

Rut-Caf ou LLNO1: Trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(cafeína)(NO)]C13.

SIN-1: Linsodimina.

SNACET: S-nitroso N-acetilcisteína.

SNAP: S-nitroso N-acetilpenicilamina.

SNP: Nitroprussiato de sódio.

UFC: Universidade Federal do Ceará.

## Sumário

<b>Tópicos</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. DEFINIÇÃO.....	1
1.2. ANATOMIA.....	2
1.3 FISIOFARMACOLOGIA DA EREÇÃO.....	5
1.4. PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO e GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NA EREÇÃO PENIANA.....	7
1.5. TRATAMENTO: Realidade, pesquisa e perspectivas.....	10
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MÉTODO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Animais.....	20
3.2. Corpos cavernosos humanos.....	20
3.3. Substâncias estudadas.....	20
3.4. Material cirúrgico e laboratorial.....	22
3.5. Preparação dos tecidos.....	
3.6. Protocolos experimentais.....	
3.7. Análise estatística.....	
<b>4. RESULTADOS</b> .....	
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>88</b>
<b>8. APÊNDICE</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DEFINIÇÃO

Do início da sociedade humana até a década de 1990 os distúrbios da função sexual masculina eram conhecidos com a denominação de impotência sexual. A partir de 1993, com o advento do relatório do consenso do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, passou-se a utilizar a expressão disfunção erétil. Definiu-se, pois, disfunção erétil (DE) como a incapacidade persistente de obter ou manter uma ereção suficiente que possibilite a penetração vaginal e uma atividade sexual satisfatória (NIH, 1993).

O primeiro relato de casos de disfunção erétil data de 2000a.C e foi encontrada em um papiro egípcio. Dois tipos eram descritos: a impotência natural e a sobrenatural, atribuída a seres malignos. Na Grécia Antiga, Hipócrates descreveu muitos casos de impotência entre os habitantes ricos da província de Scythia, provavelmente em razão do hábito dos mesmos de locomoverem-se a cavalo. Os pobres não apresentavam impotência porque andavam a pé. Aristóteles descreveu três nervos que proporcionavam espírito e energia para o pênis e propôs que o mecanismo de ereção envolvia o influxo de ar para o pênis (BRENOT, 1994). A teoria de Aristóteles permaneceu válida até o ano de 1504 quando Leonardo da Vinci observou uma grande quantidade de sangue no pênis ereto de homens mortos por enforcamento.

A primeira descrição detalhada da anatomia peniana foi efetuada somente em 1585 por Ambroise Pare (1509-1590) no compêndio intitulado *Livro da Reprodução*. Foi também Paré que realizou a primeira descrição da fisiologia da ereção: “Quando o homem se inflama de desejo o sangue invade seu pênis e o torna ereto” (BRENOT, 1994).

A incidência da disfunção erétil aumenta com a idade. Kinsey *et al.* já demonstravam que somente 1 em cada 50 homens abaixo de 40 anos apresentava queixas de impotência sexual quando comparados aos homens acima de 60 anos, onde, um em cada quatro referia tais queixas (KINSEY, POMEROY, MORTIN, 1948).

Estudos atuais, realizados no *Massachussets Male Aging Study* (MMAS), mostraram que a probabilidade do homem apresentar DE acentuada aumenta de 5,1% para 15% quando a idade varia de 40 para 70 anos (JOHANNES, ARAÚJO, FELDMAN, 2000). Tais dados epidemiológicos motivaram grande número de pesquisadores na busca de novos fármacos com eficácia no tratamento da disfunção erétil.

Breve resumo da anatomia neurovascular peniana se faz necessário para ensejar melhor compreensão do mecanismo de ação dos vários fármacos utilizados no tratamento desse distúrbio.

## 2. ANATOMIA

**Irrigação arterial:** a artéria pudenda interna é a principal fonte de irrigação peniana. Após enviar um ramo para o períneo, ela se torna artéria peniana comum que se divide em três ramos: peniana dorsal, bulbo-uretral e cavernosa (LUE, 2002). (Figuras 1 e 2).

**Drenagem venosa:** as pequenas veias dos espaços sinusoidais, abaixo da túnica albugínea, unem-se dorsalmente formando a veia dorsal profunda. No corpo cavernoso principal e na crura essa veia drena para as veias cavernosas e crurais que se unem à veia uretral formando a veia pudenda interna (LUE, 2002). (Figuras 1 e 2).

**Neuroanatomia:** a inervação peniana divide-se em: autonômica, simpática e parassimpática; e somática, sensitiva e motora. A inervação sensitiva começa em receptores na pele do pênis, glândula, uretra e dentro do corpo cavernoso. Esses receptores convergem para formar o nervo dorsal do pênis, que se une aos nervos pélvicos, formando o nervo pudendo interno. As fibras deste nervo ascendem através do feixe espinotalâmico até o tálamo e córtex sensitivo. A inervação autonômica parassimpática localizada na medula sacral é a responsável pela liberação, nas terminações nervosas no corpo cavernoso dos neurotransmissores, NO e GMPc, que provocarão relaxamento da musculatura lisa cavernosa, vasodilatação arteriolar e ereção peniana. A inervação simpática origina-se da décima primeira vértebra torácica à segunda vértebra lombar, em fibras que se unem no plexo hipogástrico e liberam como neurotransmissores a

norepinefrina e a noradrenalina, responsáveis pela fase de detumescência peniana (LUE, 2002). (Figura 3).

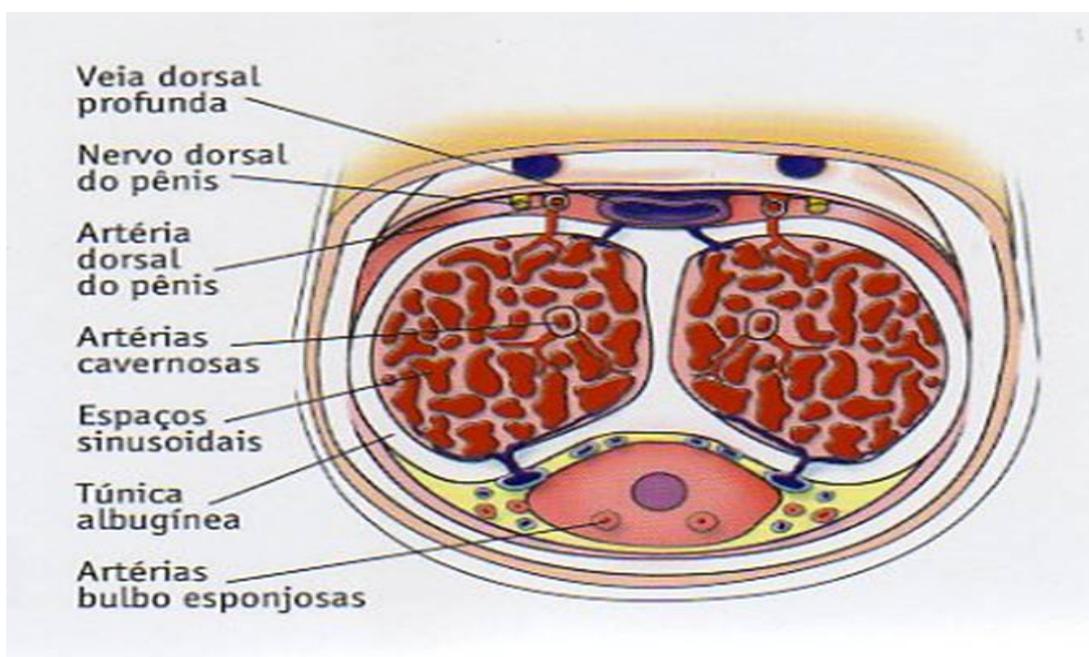


Figura 1 - Anatomia arterial e venosa peniana. Corte transversal. Retirado de Glina, S. *et al.*, *Disfunção Sexual Masculina*, 2002.

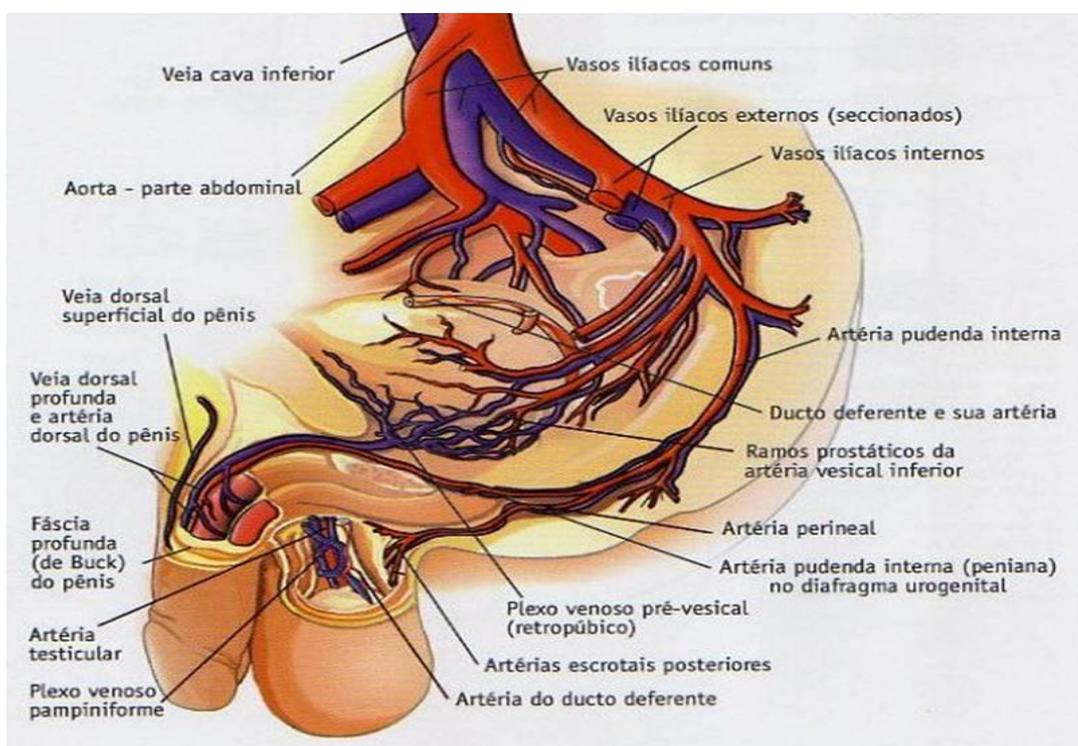


Figura 2 - Anatomia arterial e venosa pélvica. Retirado de Glina, S. *et al.*, *Disfunção Sexual Masculina*, 2002.

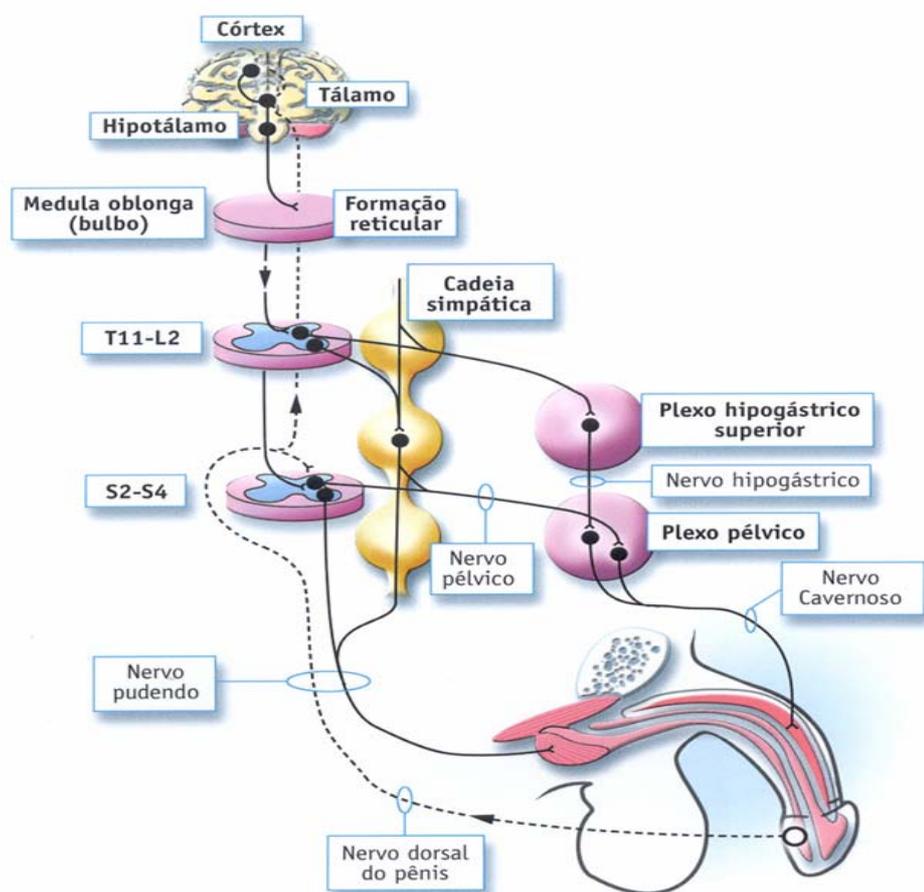


Figura 3 - Neuroanatomia peniana. Retirado de Glinn, S et al., *Disfunção Sexual Masculina*, 2002.

### 1.3. FISIOFARMACOLOGIA DA EREÇÃO

A musculatura lisa cavernosa, arterial e arteriolar peniana, constitui-se no principal componente tecidual envolvido na ereção peniana. No estado flácido a musculatura lisa está tonicamente contraída permitindo que o fluxo sanguíneo arterial desempenhe apenas papel nutricional. Isso pode ser evidenciado após a injeção de fenilefrina em modelos experimentais de tiras de órgãos (LAU & ADAIKAN, 2006). O estímulo sexual e a liberação de neurotransmissores nos terminais dos nervos cavernosos provocam a seqüência de relaxamento que se segue (Figuras 4 e 5):

1. dilatação arteriolar e arterial por aumento do fluxo sanguíneo nas fases sistólica e diastólica;
2. expansão sinusoidal, aumentando o fluxo sanguíneo cavernoso;
3. compressão do plexo venoso da túnica albugínea interna contra os sinusóides periféricos, reduzindo o efluxo venoso;
4. compressão das veias emissoras entre as camadas interna e externa da túnica albugínea, tornando o efluxo venoso mínimo;
5. aumento da pressão intracavernosa (100mmHg) e ereção peniana; e
6. ereção rígida, provocada pela compressão dos corpos cavernosos pela musculatura ísqueocavernosa (LUE, 2000).

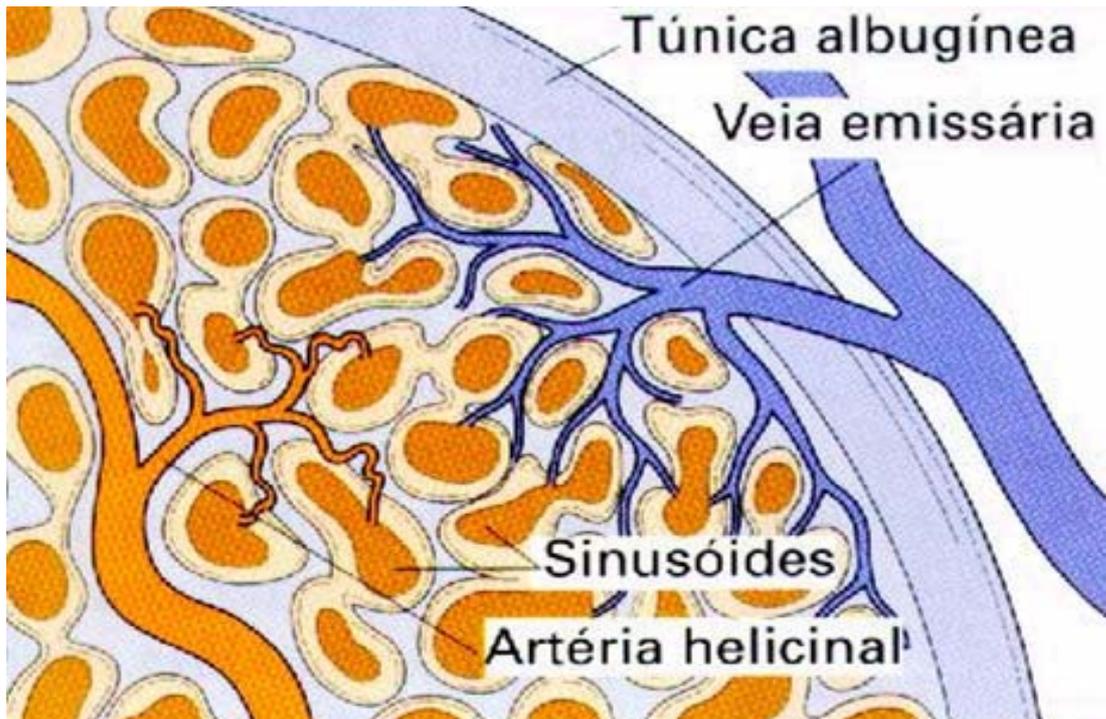


Figura 4 - Ereção peniana. Corte transversal. Retirado de Glina, S *et al.*, *Disfunção Sexual Masculina*, 2002.

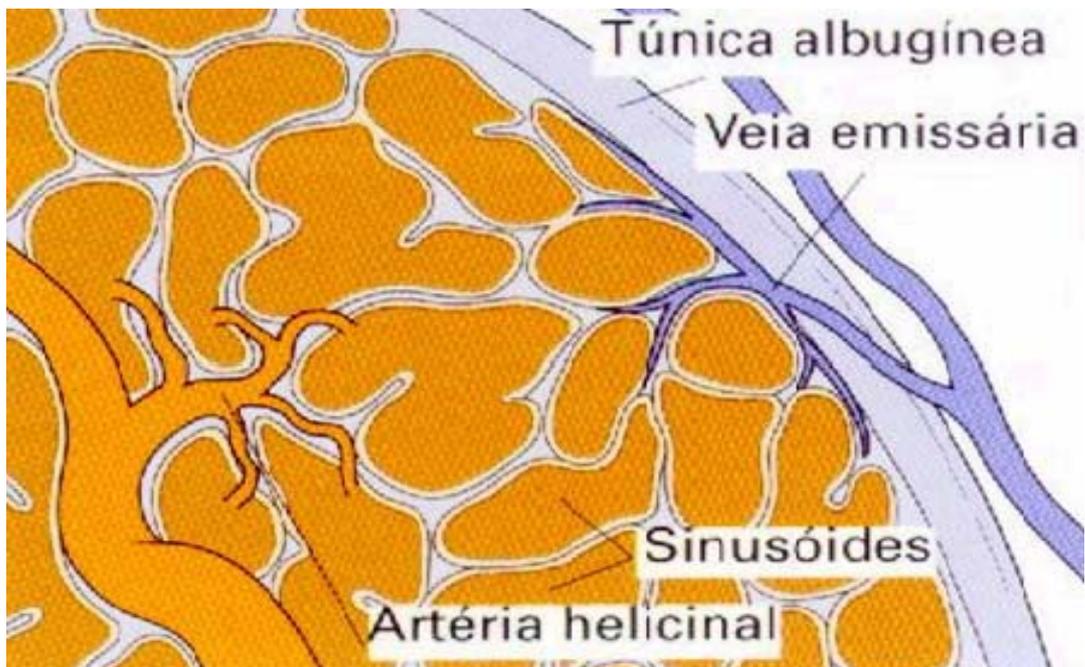


Figura 5 - Ereção peniana: expansão arterial, sinusoidal e compressão venosa. Retirado de Glina, S *et al.* *Disfunção Sexual Masculina*, 2002.

#### **1.4. PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) e da GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPc) NA EREÇÃO PENIANA**

O estudo da fisiofarmacologia peniana credita-se em grande parte ao trabalho pioneiro de Vane utilizando tiras isoladas de órgãos na técnica da superfusão em cascata. Nesta técnica, a amostra passa seqüencialmente por uma série de preparações de teste escolhida para estabelecer a diferença entre constituintes ativos na amostra (VANE, 1969).

Os primeiros estudos eletrofisiológicos com fragmentos isolados de corpo cavernoso foram conduzidos por Mandrek em 1994 utilizando o coelho como modelo animal. Esse estudioso demonstrou a presença de atividade miogênica espontânea, com 6 a 30 contrações por minuto, as quais aumentavam sua frequência e intensidade quando o tecido era superfundido com bloqueadores de canais de íon potássio (cloreto de tetraetilamônio) e noradrenalina. A administração de nitroprussiato de sódio (SNP) provocava efeito oposto (MANDREK, 1994).

Estudo conduzido pelos pesquisadores Hedlund & Andersson demonstrou a presença de fibras alfa-adrenérgicas e seus receptores nas trabéculas dos corpos cavernosos e ao redor das artérias cavernosas, sendo a norepinefrina o principal neurotransmissor responsável pelo controle da flacidez e detumescência peniana (HEDLUND & ANDERSSON, 1985).

Pesquisas desenvolvidas por Andersson demonstraram que acetilcolina liberada em resposta a estímulo elétrico provoca a liberação de óxido nítrico de terminais nervosos não colinérgicos, não adrenérgicos, induzindo o aumento de síntese de GMPc provocando o relaxamento da musculatura lisa cavernosa (ANDERSSON, 2001).

A síntese de óxido nítrico, com estímulo neuronal, com suporte na arginina sob a ação da enzima óxido nítrico síntase-neuronal (NOSn), e sua ligação com a enzima guanililciclase solúvel (GCs) constitui passo essencial para o início e manutenção do processo erétil. Tanto o endotélio quanto os nervos cavernosos podem ser fonte de óxido nítrico. Não existem dúvidas sobre a presença da enzima óxido nítrico sintase- neuronal nos nervos cavernosos, suas terminações e, nos ramos da artéria peniana dorsal (HEDLUND *et al.*, 2000).

A síntese de óxido nítrico também ocorre no endotélio cavernoso sem o estímulo neuronal, através da enzima óxido nítrico sintase-endotelial (NOSe), cuja presença foi demonstrada na musculatura lisa cavernosa e artérias helicinais intracavernosas (BURNETT *et al*, 1996).

Após sua síntese o NO se liga à enzima guanilatociclase solúvel promovendo a síntese de GMPc com base na GTP (guanosina trifosfato). O GMP induz a ativação de uma proteína quinase específica do GMPc, a PKG. 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. Estes eventos provocam inativação da enzima miosinaquinase de cadeia leve, levando à dissociação das fibras de actina e miosina, o que apresenta, como resultado final, relaxamento da musculatura lisa cavernosa, aumento do influxo sanguíneo e ereção (CORBIN; FRANCIS, 1999).

Tanto o aumento da síntese do GMPc a partir do NO quanto a diminuição de sua hidrólise desde a inibição da fosfodiesterase específica do GMPc (PDE-5) constituem alvos terapêuticos interessantes na pesquisa do tratamento da disfunção erétil. As fosfodiesterases foram inicialmente detectadas por Berthet , Sutherland e Rall (1957). A PDE-5 constitui-se na enzima específica para a hidrólise do GMPc. Ela apresenta um sítio de fosforilação ativado pela PKG, o que aumenta sua atividade em cerca de 50% a 70%, dois sítios alostéricos e um sítio catalítico de ligação para o GMPc. A ligação do GMPc ao sítio catalítico da enzima estimula a ligação do GMPc aos sítios alostéricos aumentando a fosforilação da PDE-5 pela PKG e a hidrólise do GMPc (CORBIN *et al.*, 2000) (Figura 6).

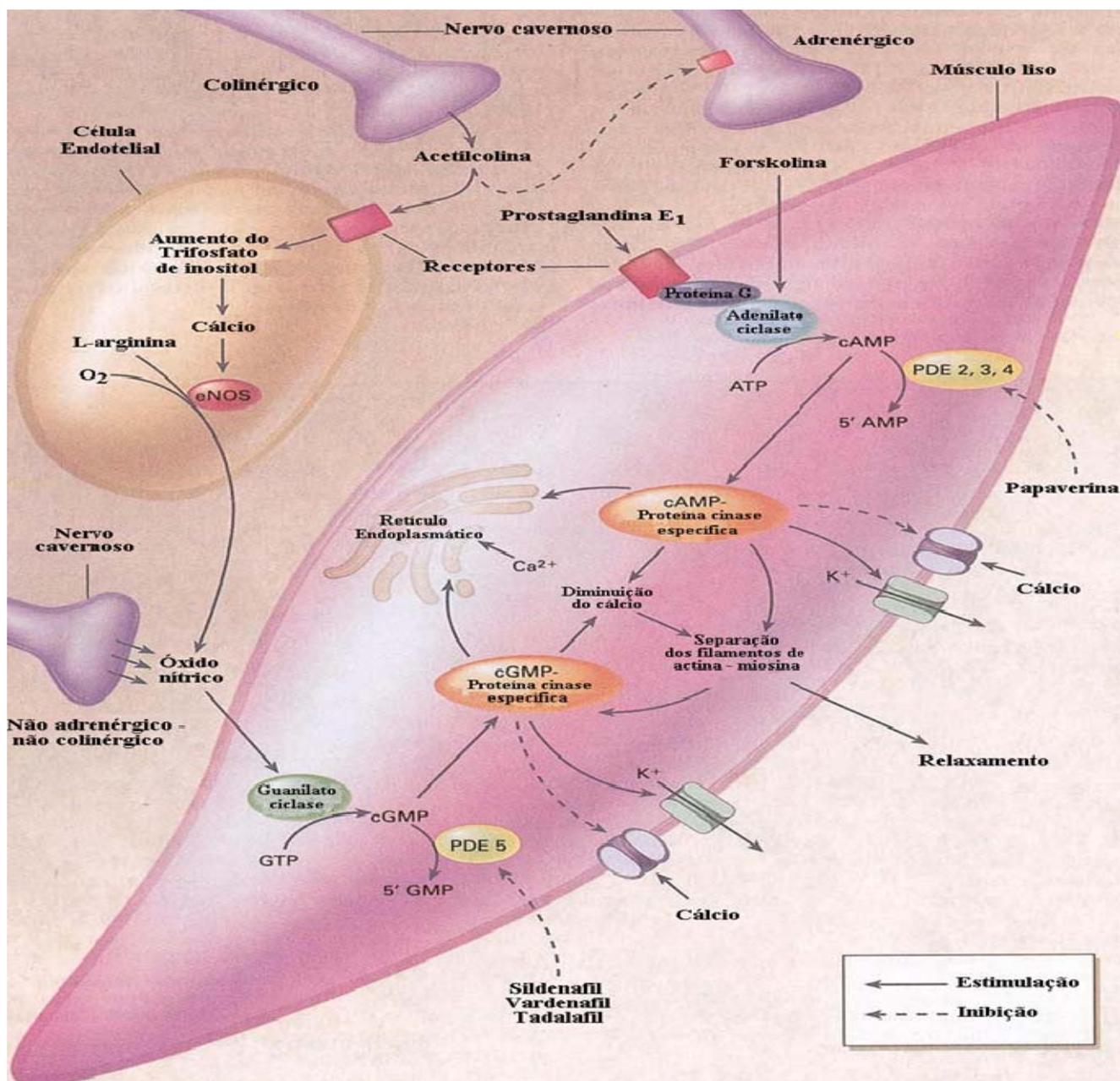


Figura 6- Farmacologia da ereção peniana. Fosfodiesterase-5 (PDE-5).

Adaptada de Broderick & Lue, in: Campbell's Urology, 8ª. Edição, 2002

Um passo decisivo para a síntese dos fármacos ora utilizados no tratamento da disfunção erétil foi a descoberta da PDE-5 como um dos alvos da sinalização do GMPc. A PDE-5 é uma enzima específica para a degradação do GMPc. Os níveis intracelulares de GMPc são regulados por meio de sua síntese pela ação da enzima guanilatociclase, como descrito há pouco e sua hidrólise

pela enzima PDE-5. A ligação do GMPc ou sildenafil ao sítio catalítico dessa enzima estimula a ligação do GMPc ao seu sítio alostérico, o que leva à fosforilação do domínio regulatório da PDE-5 pela enzima PKG, uma quinase específica do GMPc. A fosforilação do domínio regulatório aumenta em 50% a 70% a atividade enzimática, acrescentando também a degradação do GMPc. O sildenafil e demais inibidores da PDE-5 são estruturalmente semelhantes ao GMPc e competem com este na ligação ao sítio catalítico da enzima levando a uma diminuição da hidrólise do GMPc (CORBIN, FRANCIS, WEBB, 2002). São escassos na literatura estudos com os outros inibidores da PDE-5, principalmente exames comparativos *in vitro* da ação dos 3 fármacos disponíveis (MULHALL; MONTORSI, 2006). Além do mecanismo regulatório pela proteína quinase G (PKG) da síntese e degradação do GMPc, esta enzima atua também na fosforilação e ativação de canais de íon potássio provocando hiperpolarização celular e relaxamento muscular. Esta ação é realizada mediante inibição do influxo intracelular de cálcio pela ativação de canais de potássio. A utilização de inibidores da PKG em tecido cavernoso de coelhos reverteu o relaxamento (PRIETO *et al*, 2006). Pelo menos um ensaio *in vitro*, realizado com anéis de aorta de coelho, apontou que uma das substâncias utilizadas na prática da clínica, o vardenafil, além de atuar inibindo a PDE-5, tem uma ação secundária através do bloqueio de canais de cálcio, demonstrando que ainda há espaço para novas pesquisas que possam demonstrar ações alternativas dos inibidores da PDE-5 (TEIXEIRA, PRIVIERO, WEBB, 2006).

## **1.5. TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL: Realidade, Pesquisas e Perspectivas**

Assim como o relato da ocorrência de disfunção erétil data de 2000 a.C através dos papiros egípcios, seu tratamento também remonta a épocas distantes. Podemos dizer que o início do tratamento medicamentoso para DE começou com a idade dos remédios naturopatas. Geralmente constavam de fármacos que tratavam todos os distúrbios de origem sexual com formulação Galênica. Ainda hoje medicações “milagrosas” não submetidas ao rigor dos testes

farmacêuticos são disponibilizadas à venda pela rede internacional de computadores (Web). O grande problema destas preparações é que a grande maioria destes fármacos é composta por extratos vegetais com grande quantidade de hormônio e ausência de ensaios clínicos e pré-clínicos que comprovem sua eficácia e segurança (BRODERICK & LUE, 2002).

A utilização de modelos *in anima vili* que tenham características fisiológicas semelhantes *in anima nobili* é importante para aumentar a credibilidade destes estudos. Nos estudos de substâncias para o tratamento da disfunção erétil o coelho como modelo animal é amplamente utilizado por duas características teciduais principais: a primeira, é que receptores adrenérgicos alfa tipo 1 do trato genitourinário do coelho são semelhantes aos encontrados nos tecidos humanos correspondentes (KAVA *et al*, 1998); a segunda característica é a semelhança da ação provocada pelo citrato de sildenafil em corpos cavernosos de coelhos e humanos (WANG *et al*, 2001).

Na área da fitoterapia, é importante apresentar os resultados de estudos sobre três princípios ativos extraídos de plantas que já mereceram a atenção de pesquisadores e foram avaliados em ensaios clínicos e pré-clínicos. Em 1997, um diperteno, *forskolin*, extraído da raiz da erva *Coleus forskolin*, uma planta muito comum na Índia, foi utilizado com sucesso em ensaios clínicos e pré-clínicos. Essa substância mostrou-se ser potente ativador da adenilato ciclase (AC), atuando no seu domínio catalítico e aumentando os níveis intracelulares de AMP cíclico no corpo cavernoso humano. Os ensaios pré-clínicos com *forskolin* utilizando-se tiras de corpos cavernosos humanos mostraram um relaxamento de 100% das tiras após pré-contracção destas com fenilefrina. Quando os corpos foram tratados com prostaglandina E1 (PGE-1), que possui o mesmo mecanismo de ação do *forskolin*, aquela substância só produziu 70% de relaxamento com a mesma concentração. Estudos clínicos realizados demonstraram que o *forskolin* aumentava de 47% para 80% a rigidez peniana e o tempo de ereção de 20 minutos para 67 minutos nos pacientes submetidos previamente a injeção intracavernosa de PGE1, fentolamina e papaverina (MULHALL *et al*, 1997). Recentemente um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará publicou os resultados de ensaio pré-clínico com um alcalóide extraído da raiz da *Aspidosperma ulei*, uma árvore do gênero Apocyanaceae muito comum no

Nordeste brasileiro. Nos estudos realizados com ratos, o alcalóide provocou ereção em 11 dos 16 animais estudados, enquanto o placebo não provocou ereção em nenhum dos animais. Aparentemente, a ação do alcalóide se faz por intermédio de bloqueio de receptores alfa 2 adrenérgicos, pois sua ação foi antagonizada pela clonidina, um agonista alfa-adrenérgico (CAMPOS *et al.*, 2006).

O primeiro fármaco utilizado por via oral para o tratamento da disfunção erétil submetido a rigorosa avaliação clínica foi a ioimbina, um alcalóide extraído do caule da árvore *Corynanthe yohimbe*. Como demonstrado em trabalhos realizados por Morales *et al.* (1987), a ioimbina atua bloqueando receptores alfa2 adrenérgicos e apresentava resultados, principalmente em disfunção erétil de causa psicogênica. Em 1996, a Associação Americana de Urologia (AUA) publicou seu *guideline* para o tratamento da disfunção erétil e ficou estabelecido que a ioimbina não era superior ao placebo para o tratamento de causas orgânicas de disfunção erétil. Alguns estudos, no entanto, demonstraram sua eficácia no tratamento de casos de disfunção erétil associada ao uso de antidepressivos, como a paroxetina e a fluoxetina, reservando-se a utilização da ioimbina neste grupo de pacientes (SEFTEL & ALTHOF, 2000).

## **Drogas de ação central**

### **a) Drogas serotoninérgicas**

Trazodone é um fármaco comumente prescrito para quadros de depressão leve e moderada. Vários pequenos ensaios clínicos demonstraram efeito positivo da droga na potencialização da ereção peniana noturna e na ereção sexualmente estimulada. O mecanismo de ação proposto é um efeito alfa-bloqueador central e inibidor da recaptção de serotonina (MONTORSI *et al.*, 1994).

### **b) Agonistas dopaminérgicos**

A apomorfina é um agonista dopaminérgico que atua no núcleo paraventricular cerebral, ativando receptores D1 e D2. A atividade dopaminérgica pró-erétil sem alteração da libido foi observada inicialmente em pacientes tratados para doença

de Parkinson (DANJOU *et al.*, 1988). Um grande ensaio clínico multicêntrico de fase 3 realizado nos Estados Unidos, em 1996, comparando doses de apomorfina por via sublingual de 2mg, 4mg e 6mg, com doses idênticas de placebo, mostraram melhora significativa das queixas de disfunção nos pacientes tratados com apomorfina. A presença de náuseas foi um efeito colateral importante observado em mais de 40% dos pacientes (UPRIMA, TAP HOLDINGS, INC, 1996).

## **Drogas de ação periférica**

### **a) Antagonistas adrenérgicos**

A fentolamina foi o antagonista adrenérgico mais utilizado nos estudos para o tratamento da disfunção erétil. A fentolamina é um antagonista alfa inespecífico, atuando igualmente em receptores alfa1 e alfa 2. Esta dualidade de ação explicaria por que a fentolamina aplicada por via intracavernosa não provoca rigidez peniana, pois sempre haverá receptores alfa livres para serem ocupados pela noradrenalina liberada endogenamente. Ensaio clínico realizado com a fentolamina mostraram eficácia apenas de leve a moderada no tratamento da disfunção erétil (ZORNIOTTI, 1994). Os ensaios clínicos foram suspensos quando estudos em ratos demonstraram aumento importante da carcinogênese nestes animais (LUE, 2002).

### **b) Inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5)**

O tratamento e a avaliação diagnóstica do paciente com disfunção erétil podem ser divididos em duas fases: antes e após a introdução da primeira droga realmente efetiva, por via oral, para o tratamento da disfunção erétil: o inibidor da PDE-5 sildenafil. Até a década de 1990, homem de 50 anos com disfunção erétil e fatores de risco associados como hipertensão, *Diabetes mellitus*, doença vascular periférica, dislipidemia e fumo, constituíam cerca de 40% a 50% do atendimento urológico de consultório (GOLDSTEIN *et al.*, 1998). Após a introdução do sildenafil no mercado, este mesmo paciente passou a ser tratado por clínicos,

endocrinologistas e cardiologistas que hoje são responsáveis por 80% das prescrições médicas de sildenafil e outros inibidores da PDE-5. Cerca de 60% a 70% dos pacientes com DEI são responsivos ao tratamento com inibidores da PDE-5. Isso demonstra que ainda há grande número de pacientes refratários a este tipo de tratamento e pesquisas para produção de novos fármacos com outros alvos terapêuticos se fazem necessárias para o tratamento desta disfunção (AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION, 1996).

Os estudos que culminaram com a síntese do sildenafil iniciaram-se em 1980, quando Furchgott e Zawadski demonstraram que o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) ativava a produção de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais vasculares. O EDRF foi demonstrado por esses pesquisadores em aorta de coelho. A adição de acetilcolina (Ach), em anéis de aorta previamente contraídas com noradrenalina, provocava relaxamento nestes, quando o endotélio estava intacto. Após a remoção do endotélio, o relaxamento não ocorria (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

Em 1987, Palmer *et al.* demonstraram que o EDRF liberado das células endoteliais de anéis de aorta de coelho pela acetilcolina apresentava o mesmo efeito sobre o espectro de absorção da desoxi-hemoglobina que o NO, sugerindo que o EDRF era bioquimicamente indistinguível do NO (PALMER, FERRIDGE, MONCADA, 1987).

Ainda em 1987, Ignarro estabeleceu que o NO endógeno age no sistema vascular, mediante o estímulo à síntese de outro mensageiro intracelular, o GMP cíclico (GMPc). Esta molécula, semelhante ao AMP cíclico, era formada pela hidrólise da Guanosina trifosfato por meio da enzima guanilatociclase solúvel (IGNARRO *et al.*, 1990) (ARNOLD *et al.*, 1977).

Os estudos de Hobbs demonstrando que substâncias precursoras do óxido nítrico como L-arginina e S-nitroso N-acetilpenicilamina (SNAP) potencializavam o relaxamento muscular liso-arterial, e que inibidores da enzima guanilatociclase como 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ), revertiam esse efeito, reforçavam o papel da cascata de sinalização intracelular: NO-guanilatociclase solúvel-GMPc. Esses estudos deram origem a vários ensaios pré-clínicos, *in vivo* e *in vitro*, avaliando fármacos que poderiam potencializar o

efeito relaxante do GMPc com base no estímulo da guanilatociclase solúvel pelo NO (HOBBS, 1997).

O primeiro fármaco avaliado por meio de superfusão de tiras de corpos cavernosos humanos foi o citrato de sildenafil, em estudos conduzidos por Ballard *et al.* em 1998. Nesse trabalho, os autores demonstraram que a droga potencializava o relaxamento de corpos cavernosos humanos estimulados eletricamente, após estes terem sido pré- contraídos com fenilefrina, e que esse relaxamento era inibido quando as tiras eram pré-tratadas com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase-endotelial (L-NAME) ou da guanilatociclase solúvel (ODQ).

### **c) Precursor e Doadores de Óxido Nítrico**

#### **L-Arginina**

Estudo realizado por Chen *et al.* (1999) em 50 homens com queixas de disfunção erétil e tratados com L-arginina mostrou taxa de resposta objetiva de apenas 30%. Os pacientes que apresentaram alguma melhora possuíam níveis urinários aumentados de nitrato e nitrito, o que levou os pesquisadores a questionar se haveria um sub- grupo de pacientes com DE e níveis urinários alterados de nitritos, que poderiam apresentar melhor resposta ao tratamento com L-arginina e inibidores da PDE-5.

Existem estudos demonstrando que substâncias doadoras de óxido nítrico são capazes de aumentar a produção basal de GMPc, potencializando o relaxamento da musculatura lisa vascular. Utilizando vesículas seminais humanas, Machtens *et al* demonstraram que doadores de óxido nítrico, como nitroprussiato de sódio, S-nitroso-glutationa (GSNO), S-nitroso-N-acetilcisteína (SNACET) e linsidomina (SIN-1), provocavam relaxamento dose-dependente dos tecidos após pré- contração destes pelo efetor adrenérgico, fenilefrina (MACHTENS *et al*, 2003). O nitroprussiato de sódio apresenta o ferro como metal interagindo com cinco íons cianeto. No sistema vascular, a formação de NO a partir do nitroprussiato leva à liberação de cianeto que pode provocar toxicidade para os tecidos vasculares (BATES *et al*, 1991). Desta maneira, compostos que,

por meio da liberação de NO, potencializam a produção de GMPc intracelular sem provocar toxicidade tecidual, podem se tornar atrativos nos estudos para o tratamento da disfunção erétil.

### **Complexo nitrosil-rutênio**

Em estudos iniciais realizados em hipocampo de ratos, Wierasko *et al.* (2001) avaliaram a geração de potenciais de ação provocados por doadores de NO do complexo nitrosil-rutênio nesta região anatômica. Os autores demonstraram que a ação destas substâncias depende da liberação de óxido nítrico pela ação de um agente redutor e que a incubação de tecidos com oxihemoglobina, um removedor extracelular de NO, elimina os efeitos neurofisiológicos destas substâncias. Por causa da meia vida excessivamente curta, a ação de NO em sistemas biológicos é de duração muito limitada, além do que sua degradação fotoquímica e liberação de cianeto com efeitos tóxicos importantes limitam seu uso clínico. Recentemente, novos compostos doadores de NO, que apresentam maior estabilidade química e menor toxicidade, têm sido objeto de pesquisa. Um grupo destas substâncias, S-nitroso-glutationa (GNSO) e S-nitroso-N acetilcisteína (SNACET), utilizadas em estudos, com tiras de corpos cavernosos humanos, montadas em sistemas de banhos isolados, apresentaram promissor potencial de relaxamento tecidual (SEIDLER *et al.*, 2002).

Outro grupo de doadores de NO, que tem como metal o rutênio, são solúveis em água e liberam NO, principalmente sob a ação de agentes redutores, foi utilizado para avaliar seu potencial de relaxamento na musculatura lisa vascular. Estas substâncias são quimicamente estáveis e solúveis em água, o que favorece sua utilização em sistemas biológicos animais (BONAVENTURA *et al.*, 2007). Utilizando aorta de rato, estes pesquisadores demonstraram potente efeito relaxante do endotélio vascular por parte deste grupo de doadores de NO. Utilizando anéis de aorta de camundongo, as substâncias promoveram também um relaxamento vascular semelhante ao induzido pelo nitroprussiato de sódio. A pesquisa demonstrou também que as substâncias promoviam liberação de NO intracelular, ativavam a enzima guanilatociclase solúvel e, ao contrário do nitroprussiato sódico, que atua apenas por intermédio da liberação de óxido

nítrico livre, também promoviam liberação do ânion nitroxil, o que pode potencializar seu efeito relaxante. Em estudo realizado por Christ em corpos cavernosos humanos, foi comprovado outro mecanismo de ação adicional destas substâncias por meio da ativação de canais de potássio no relaxamento daquela estrutura tecidual (CHRIST, 2000). Esse autor demonstrou que os principais tipos de canais de K envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa eram canais sensíveis ao cálcio ( $K_{CA}$ ) e canais de potássio ativados metabolicamente ( $K_{ATP}$ ). Estudo realizado por Venkateswarlu *et al*, (2002) demonstrou 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 ( $K_{CA}$ ) (Figura 7). Em outro estudo, desenvolvido por Prieto *et al.*(2006), os autores demonstraram que o bloqueio de canais de potássio ativados metabolicamente ( $K_{ATP}$ ) por um inibidor específico, glibeclamida, reduzia significativamente o relaxamento produzido em artérias de resistência peniana pelo inibidor específico da PDE-5, citrato de sildenafil. No estudo de Bonaventura *et al.* (2007), há pouco mencionado, a incubação dos tecidos com um bloqueador inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio, reduziu significativamente o relaxamento induzido pelas substâncias do complexo nitrosil-rutênio. Esses achados demonstram a variedade de mecanismos envolvidos na ação destas substâncias e justifica a realização de estudos adicionais para avaliar seu potencial terapêutico.

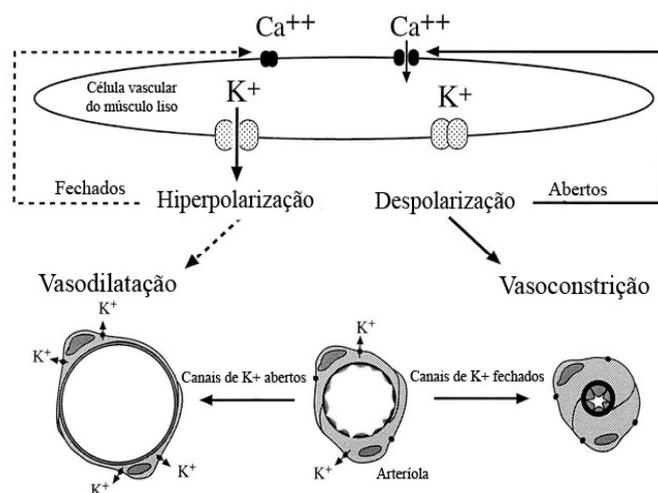


Figura 7 - Ação de canais de íon potássio na musculatura lisa vascular. Adaptado de Jackson, William F. (*Íon channels and vascular tone, Hypertension, 2000*)

## Tratamento invasivo

### Drogas intra-cavernosas

Quando não há resposta ao tratamento via oral da DE, a alternativa não cirúrgica eficaz é a aplicação intracavernosa de drogas vasodilatadoras. Dentre as opções disponíveis, o fármaco mais eficaz e seguro é a prostaglandina E1 (PGE-1).

As prostaglandinas foram descobertas em 1930 por Kurzok e Lieb que demonstraram a contração de tiras de músculo uterino humano quando expostos ao sêmen humano. A ação músculo-relaxante da PGE-1 é realizada pela elevação do AMPc intracelular por ativação da enzima adenilciclase. A injeção

intracavernosa de 20ug de PGE-1 é o tratamento-padrão utilizado atualmente (STACKL, HASUN, MARBERGER, 1988).

Em 1996, o American Urologic Association *guideline* para DE considerou o alprostadil, formulação sintética da PGE-1, por via intra-cavernosa, como o tratamento de primeira escolha para diagnóstico e tratamento da DE na falha ou contra-indicação ao emprego da medicação por via oral.

Apesar da revolução que ocorreu no tratamento da DE, ainda há uma percentagem significativa de pacientes que não se beneficiam das formulações disponíveis. A busca de novos fármacos deve incentivar os pesquisadores e a descoberta de princípios ativos de plantas, substâncias doadoras de óxido nítrico, ativadores da guanilatociclase solúvel parece ser um promissor campo de pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL:

\_ Identificar os mecanismos envolvidos no relaxamento da musculatura lisa de corpos cavernosos e da aorta de coelho, provocado por substâncias doadoras de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio.

### ESPECÍFICOS:

\_ Avaliar ação dos compostos do rutênio em canais de íon potássio dependentes de ATP.

\_ Avaliar ação dos compostos do rutênio em canais de íon potássio ativados pelo cálcio.

\_ Caracterizar a atuação das substâncias no sistema de sinalização celular NO-GMPc.

\_ Determinar a quantidade de GMPc e AMPc disponibilizado pelas substâncias no processo de relaxamento.

### 3 MÉTODO

#### 3.1 Animais

O estudo foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), projeto de Lei 1153-95, e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Federal do Ceará em novembro de 2007, sob número de registro 055\07.

Foram utilizados quarenta coelhos machos, adultos, com peso entre 2,0 a 3,0Kg, da raça Nova Zelândia obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais ficaram acomodados em gaiolas de alumínio sob regime de ciclos claro-escuro de doze horas, sendo alimentados com dieta padrão de laboratório (Purina Chow) e água à vontade.

#### 3.2 Corpos cavernosos humanos

A retirada de segmentos de corpos cavernosos humanos foi realizada em pacientes não vivos, vítimas de traumatismo crânio-encefálico, doadores de órgãos para transplante, por meio de consentimento livre e esclarecido assinado pelos parentes. O protocolo de pesquisa relativo a retirada de corpos cavernosos foi aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa da UFC, na reunião de 31 de agosto de 2006, sob o número de registro 186\06 e seguiu as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos da Resolução 196-96 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde- Ministério da Saúde( Anexo 1).

#### 3.3 Fármacos - Substâncias

As duas substâncias testadas em comparação com o nitroprussiato de sódio foram substâncias do complexo nitosil-rutênio com a seguinte formulação química:

**Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> (Rut-Bpy) e Trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(cafeína)(NO)]Cl<sub>3</sub> (Rut-Caf).** (Figura 7 e 8).

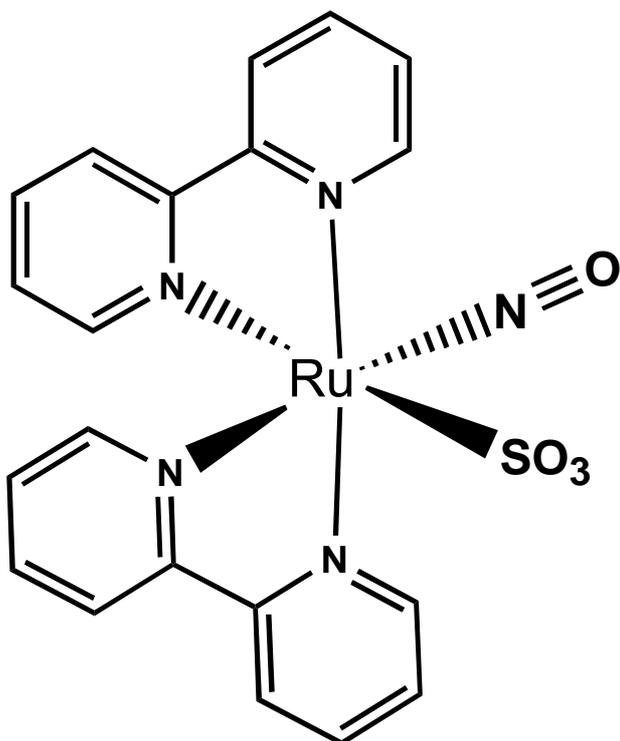


Figura 8 - Estrutura química do Cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> (Rut-Bpy).

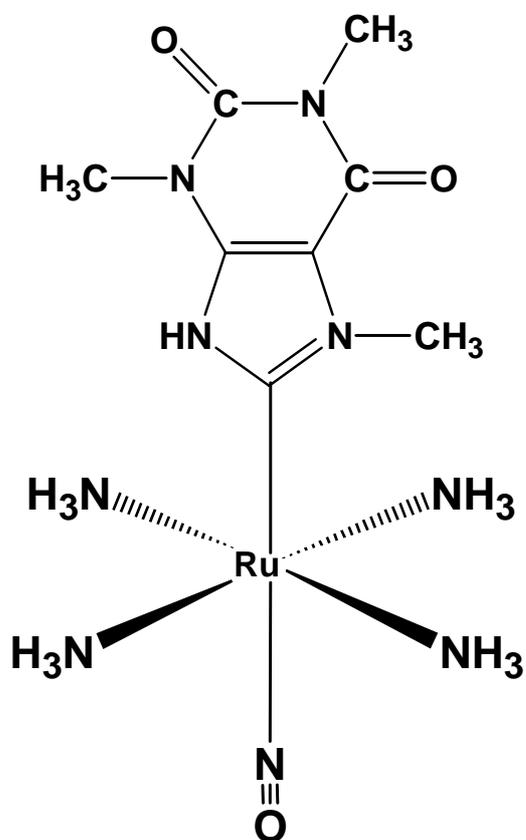


Figura 9 - Trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(cafeína)(NO)]Cl<sub>3</sub> (Rut-Caf)

As substâncias (Rut-Caf e Rut-Bpy) foram sintetizadas no laboratório do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, conforme técnica descrita por Lopes, Wieraszco e El-Sherif (2001). (APÊNDICE 1).

As outras substâncias utilizadas nos experimentos foram: fenilefrina (Phe) (Sigma, EUA), nitroprussiato de sódio (SNP) (Sigma, EUA), acetilcolina (Ach) (Sigma, EUA), L-arginina (L-NAME) (Sigma, EUA), ODQ (Sigma, EUA), oxihemoglobina (Sigma, EUA), L-cisteína (L-cist) (Sigma, EUA), hidroxicobalamina (Sigma, EUA), glibenclamida (Glib) (Sigma, EUA), tetraetilamônio (Sigma, EUA), tiopental sódico (Cristália, Brasil), cloreto de potássio (KCL) (Cristália, Brasil), iberotoxina (Ibx) (Sigma, EUA), Kit ELISA GMPc e AMPc.

A solução de Krebs-Henseleit, com pH ajustado para 7,4 foi preparada 24 horas antes dos procedimentos sem  $\text{Ca}^{++}$  e glicose, que era adicionada à solução momentos antes dos experimentos (APÊNDICE 2).

### 3.4 Material cirúrgico e laboratorial

O material cirúrgico e de laboratório utilizados nos experimentos estão discriminados no Apêndice 3.

### 3.5 Preparação dos tecidos

**Vasos e corpos cavernosos de coelho (RbCC):** após anestesia com fenobarbital sódico (40mg/Kg, EV), os animais foram exangüinados pela artéria carótida, tendo sido realizada penectomia à altura da crura peniana, sendo o tecido imediatamente colocado em solução nutritiva de Krebs-Henseleit. O tecido cavernoso foi então dissecado com a remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Cada pênis forneceu dois fragmentos de corpo cavernoso, que foram montados em banhos isolados de 10ml, contendo solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37° e borbulhada com carbogênio na concentração de 95% de  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Foi retirada também a aorta torácica e dividida em 6 fragmentos,

montados em sistema de banhos isolados, à semelhança do realizado com os corpos cavernosos (Figura 10). Para cada experimento foram utilizados 4 a 8 fragmentos de tecidos.



Figura 10 - Pênis de coelho

**Corpos cavernosos humanos:** segmentos de 3 cm de corpos cavernosos humanos foram retirados na região infra- púbica ao final da cirurgia de retirada múltipla de órgãos. O pênis era mobilizado acima do osso púbico e os dois corpos cavernosos, juntamente com uretra, veia dorsal do pênis e artéria dorsal profunda, eram dissecados e seccionados. O tecido era mantido envolto pela túnica albugínea, depois colocado imerso em solução de Krebs-Henseleit e condicionado em gelo. Os tecidos eram utilizados nos experimentos no máximo 12 horas após a retirada. Antes do início dos experimentos, a túnica albugínea e os tecidos conectivos eram retirados e tiras de corpos cavernosos eram colocadas no sistema de banhos isolados. Cada corpo cavernoso fornecia 6 tiras de tecido de 2x2x1cm (Figura 11, 12 e 13).



Figura 11 - Incisão para retirada de corpos cavernosos humanos



Figura 12 - Corpos cavernosos dissecados do tecido subcutâneo

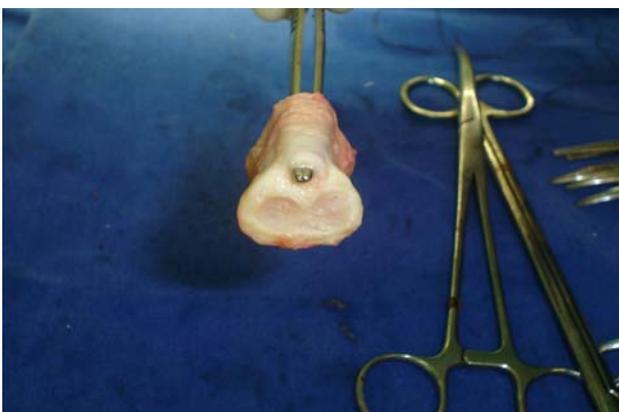


Figura 13 - Segmento de corpo cavernoso e uretra

### 3.6 Protocolos Experimentais

Os tecidos foram suspensos entre duas pontas de metal em “L” e uma das pontas foi conectada a um transdutor de força isométrica, enquanto a outra foi fixada a uma unidade móvel, permitindo o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos era de 10 mN. Os tecidos foram 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 mecânica e elétrica foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema MacLab de aquisição de dados (Software versão 4.0, AD Instruments, MA, Estados Unidos) (Figuras 14 e 15).



Figura 14 - tira de corpo cavernoso de coelho



Figura 15 - tiras de corpos cavernosos em sistema de banhos isolados.

### **3.6.1 Avaliação do efeito relaxante das substâncias SNP, Rut-Bpy e Rut-Caf na musculatura lisa cavernosa de coelho.**

Após 60 minutos de estabilização, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (PE, 0,1  $\mu$ M). Os experimentos com as substâncias foram iniciados após a estabilização do período de contração, que variava de cinco a dez minutos.

Para avaliar o relaxamento induzido pelas substâncias estudadas, foram realizadas curvas de relaxamento com crescentes concentrações das três substâncias (SNP:  $10^{-12}$   $\mu$ M a  $10^{-4}$   $\mu$ M, cis-[Ru (NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (cafeína) (NO)] Cl<sub>3</sub> (Rut-Caf) e cis-[RU(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub> nas mesmas concentrações (Rut-Bpy).

### **3.6.2 Avaliação do estímulo neurogênico pré-sináptico no relaxamento induzido por Rut-Caf em RbCC.**

A indução do relaxamento nitrérgico foi realizada por estímulo de campo elétrico transmural após estabilização da resposta contrátil à fenilefrina. O estímulo foi realizado através de eletrodos de platina durante 10s (EFS; 20V; 20Hz; 10s).

### **3.6.3 Avaliação do efeito relaxante de Rut-Caf em corpos cavernosos humanos.**

O mesmo procedimento descrito anteriormente em corpos cavernosos de coelho foi realizado em quatro tiras de corpos cavernosos humanos.

### **3.6.4 Avaliação do efeito inibitório da oxi-hemoglobina e L-cisteína sobre o relaxamento produzido pela Rut-Caf em RbCC.**

Após o término de cada experimento os tecidos retornavam à tração de repouso e eram lavados com solução de Krebs-Ringer de cinco em cinco minutos durante um período de repouso de 20 minutos quando se iniciava o novo procedimento. Neste ensaio, a oxi-hemoglobina (10  $\mu$ M), um removedor extracelular do NO, ou a L-cisteína (1mM), um removedor do ânion nitroxil, eram adicionados aos banhos, 30 minutos antes da adição de fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Após a estabilização do período de contração, curvas respostas de relaxamento com crescentes concentrações da Rut-Caf foram obtidas.

### **3.6.5 Efeito relaxante das substâncias SNP, Rut-Caf e Rut-Bpy em anéis de aorta de coelho.**

O mesmo método descrito anteriormente em RbCC foi utilizado em anéis de aorta de coelho para avaliar o efeito relaxante das substâncias estudadas.

### **3.6.6 Avaliação da ação do remevedor extracelular de NO, oxi-hemoglobina, nas doses de 3 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, no efeito relaxante da substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho.**

Neste ensaio, a oxi-hemoglobina (3 $\mu$ M) (10 $\mu$ M), era adicionada aos banhos, 30 minutos antes da adição de fenilefrina (0,1 $\mu$ M). Após a estabilização do período de contração, curvas-respostas de relaxamento com crescentes concentrações da Rut-Caf (10<sup>-12</sup>  $\mu$ M a 10<sup>-4</sup>  $\mu$ M) foram obtidas.

### **3.6.7 Avaliação da ação do remevedor extracelular de NO, oxi-hemoglobina, na dose de 10 $\mu$ M, no efeito relaxante da substância Rut-Bpy em anéis de aorta de coelho.**

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado com a substância Rut-Bpy.

### **3.6.8 Avaliação do efeito inibitório da L-cisteína (1mM), sobre o relaxamento produzido pela Rut-Caf em anéis de aorta de coelho.**

O experimento realizado em RbCC foi repetido em anéis de aorta de coelho.

### **3.6.9 Efeito de bloqueadores de canais de potássio, ativados metabolicamente (K<sub>ATP</sub>) no efeito relaxante induzido pela substância Rut-Caf na musculatura lisa cavernosa.**

Para avaliar a contribuição dos canais de potássio, ativados metabolicamente (K<sub>ATP</sub>) no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf, um bloqueador de canais de potássio ativados metabolicamente (K<sub>ATP</sub>), glibenclamida (100 $\mu$ M), foi adicionado aos banhos 30 minutos antes da pré-contração tecidual

com fenilefrina (0,1 $\mu$ M). Após esse período curvas de concentração-respostas com crescentes concentrações da substância foram novamente realizadas.

### **3.6.10 Efeito de bloqueadores de canais de potássio, de baixa, média e alta condutividade, ativados pelo cálcio no efeito de relaxamento induzido pela substância Rut-Caf na musculatura lisa cavernosa.**

Para avaliar a contribuição dos canais de potássio de alta e baixa condutividade ativados pelo cálcio ( $K_{CA}$ ), no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf, um bloqueador de canal de potássio de média e alta condutividade, iberotoxina (1 $\mu$ M), e um bloqueador de canal de potássio de baixa condutividade, apamina (0,1 $\mu$ M), foram adicionados aos banhos trinta minutos antes da pré-contracção com fenilefrina (0,1 $\mu$ M). Após esse tempo, curvas de concentração-resposta foram realizadas com crescentes concentrações da substância estudada.

### **3.6.11 Efeito de bloqueadores de canais de potássio, ativados metabolicamente ( $K_{ATP}$ ) no efeito relaxante induzido pela substância Rut-Caf na musculatura lisa da aorta de coelho.**

O mesmo procedimento descrito em RbCC foi realizado em anéis de aorta.

### **3.6.12 Efeito de bloqueadores de canais de potássio, de baixa, média e alta condutividade, ativados pelo cálcio no efeito de relaxamento induzido pela substância Rut-Caf na musculatura lisa de aorta de coelho.**

Procedimento semelhante ao realizado em RbCC.

### **3.6.13 Avaliação do papel do endotélio no relaxamento induzido pela substância Rut-CAF em anéis de aorta de coelho**

Para avaliar se havia influência do endotélio no relaxamento induzido pelas substâncias estudadas nos anéis de aorta, o endotélio dos tecidos foi removido por ação mecânica por meio de escovação da luz dos tecidos. Os tecidos eram pré-contraídos com fenilefrina na mesma concentração utilizada nos estudos anteriores, e, após o período de estabilização da contracção, a substância

acetilcolina era adicionada aos banhos, na concentração de 1 $\mu$ M. A ausência de relaxamento após a adição de acetilcolina configurava a ausência de endotélio. Todos os procedimentos anteriores foram então repetidos nos vasos, com ausência de endotélio.

#### **3.6.14 Efeito do removedor do radical livre de óxido nítrico, hidroxicobalamina, no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf, na musculatura lisa cavernosa e de aorta.**

Para investigar qual a forma de óxido nítrico que está envolvida no relaxamento induzido por Rut-Caf, hidroxicobalamina (0,1mM), um removedor do radical livre do óxido nítrico (NO $\cdot$ ), foi adicionado aos banhos, 30 minutos antes da pré-contração com fenilefrina (0,1 $\mu$ M). Após esse período, curvas de concentração-respostas foram realizadas com as substâncias, de acordo com o método descrito há pouco.

#### **3.6.15 Efeito do inibidor da guanilatociclase solúvel (ODQ) no relaxamento induzido por Rut-Caf na musculatura lisa cavernosa e de anel de aorta.**

Após o término do procedimento anterior e lavagem dos tecidos como há instantes, adicionava-se o inibidor da guanilatociclase solúvel (ODQ) em concentrações de 3 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M e 100 $\mu$ M aos banhos, 30 minutos antes da pré-contração com fenilefrina (0,1 $\mu$ M). Subseqüentemente, eram obtidas curvas-resposta de relaxamento com crescentes concentrações da substância Rut-Caf.

#### **3.6.16 Dosagem de GMPc tecidual**

Em presença de sildenafil (1 $\mu$ M), inibidor seletivo da fosfodiesterase V, responsável pela degradação de GMPc, foram realizados os protocolos na seqüência delineada:

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

Após o período de estabilização, aproximadamente 1 hora, os anéis de aorta e tiras de corpos cavernosos foram congelados em nitrogênio líquido.

##### ***Medida de GMPc após pré-contração com Phe (0,1 $\mu$ M)***

Após o período de estabilização, os anéis e as tiras de corpos cavernosos foram pré-contraídos com Phe (0,1 $\mu$ M). Após 10 minutos da adição dos agonistas

contráteis, a contração atingiu seu platô e os tecidos foram congeladas em nitrogênio líquido.

#### ***Medida de GMPc após a exposição aos doadores de NO***

Após o período de estabilização e pré-contração com Phe (0,1 $\mu$ M) foram adicionados os doadores de NO: SNP, Rut-Caf e Rut-Bpy. Após a obtenção dos efeitos máximos que ocorreu: para o SNP em cinco minutos, para Rut-Caf em dez minutos e para Rut-Bpy em 20 minutos; os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido.

#### ***Homogeneização do tecido e dosagem de proteínas***

O tecido congelado foi homogeneizado em solução de Krebs-Henseleit gelada. Após completa maceração do tecido, alíquotas de todas as amostras foram separadas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976).

#### ***Preparação da amostra***

Todas as amostras de tecidos foram mantidas a -20°C até o dia do experimento. 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. Removeu-se o sobrenadante e descartou-se o precipitado. O sobrenadante foi lavado com éter dietílico saturado de água (em um volume 4 vezes maior do que o volume da amostra) e a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens foram secadas as amostras em atmosfera de nitrogênio a 60°C e re-suspensas no tampão de ensaio do “kit” imunoenzimático para dosagem de GMPc. Empregou-se o método de acetilação da amostra para dosagem de GMPc, em picomoles de GMPc por poço. Posteriormente, calculou-se a concentração de GMPc por mg de proteína.

#### **3.6.17 Dosagem AMPc**

O mesmo processo descrito acima foi realizado na presença de papaverina para medir a quantidade de AMPc.

### 3.7 Análise estatística

O efeito relaxante das substâncias foi medido a partir do plateau de contração máxima induzida pela fenilefrina (PE;1 $\mu$ M) e expresso como o percentual de diminuição da contração provocada pela fenilefrina. Para construir as curvas concentração-resposta, realizou-se 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 relaxamento calculados para as seguintes concentrações: 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>. Para tanto, tomou-se como base o modelo que utiliza uma função sigmóide

do tipo:  $y = a + \frac{b - a}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)}}$ , onde  $a$  corresponde ao valor mínimo (resposta mínima),  $b$  ao valor máximo (resposta máxima). O efeito máximo ( $E_{max}$ ) foi considerado como a resposta de amplitude máxima induzida pelos agentes relaxantes nas curvas de concentração-resposta. , conforme a seguinte expressão:

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

Onde:

$T_F$  e  $T_S$  são, respectivamente, as tensões decorrentes da ação da fenilefrina e de uma dada substância (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003).

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 como o logaritmo negativo ( $pEC_{50}$ ) dos valores de cada tecido (4 a 8 experimentos), utilizando regressão não linear. Para comparar dois grupos em relação às variáveis  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$ , utilizou-se o teste  $t$  de *Student* para variáveis não emparelhadas. Foi utilizado para os cálculos estatísticos o software GraphPad Prism versão 5.0 (Graph Pad Software Corporation San Diego, CA-USA, 2007).

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Em cada grupo de experimentos  $n$  indica o número de tecidos estudados. Diferenças entre os valores médios foram avaliados através de análise de variância one-way

(ANOVA), seguida pelo teste de Tukey-Kramer, sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### Avaliação do relaxamento produzido pelas substâncias estudadas em corpos cavernosos de coelho

O efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em corpos cavernosos de coelho submetidos à pré-contracção com fenilefrina está demonstrado na figura 16. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

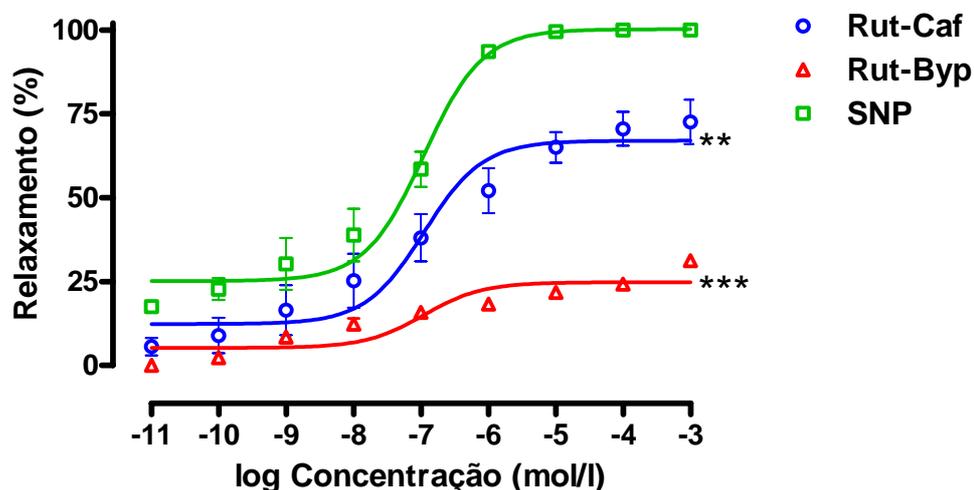


Figura 16 - Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP (nitroprussiato de sódio) em corpo cavernoso de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos

A determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em corpos cavernosos de coelho é mostrada na Tabela 1. A partir das curvas de regressão, calcularam-se os valores da  $pEC_{50}$  (definida como o logaritmo negativo de  $EC_{50}$ :  $pEC_{50} = -\log EC_{50}$ ) para as substâncias Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP, os quais foram, respectivamente, iguais a:  $6,895 \pm 0,231$ ;  $7,692 \pm 0,471$  e  $6,968 \pm 0,121$ . Comparando-se os valores da  $pEC_{50}$  das três substâncias, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ( $P =$

0,8501). Em relação ao parâmetro  $E_{max}$ : \*\*\*  $P < 0,001$ : Rut-Bpy menor que SNP e Rut-Caf; \*\*  $P < 0,01$ : Rut-Caf menor que SNP (teste de Tukey).

TABELA 1 – Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  para as substâncias Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em corpos cavernosos de coelho

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Bpy</b>	<b>SNP</b>
$pEC_{50}$	6,895 ± 0,231	7,692 ± 0,471	6,968 ± 0,121
$E_{max}$ (%)	72,600 ± 6,633	31,177 ± 0,832	100,000 ± 0,000

Traçados fisiográficos representativos do efeito da Rut-CAF ( $10^{-11}$  a  $10^{-4}$ M) em tira de corpo cavernoso de coelho mantido em solução de Krebs-Henseleit (37 ° C; pH 7,4; aerado com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) sob tensão de 1g e pré-contraídos com fenilefrina (PE; 1µM) são mostrados na Figura 17. Após estabilização da resposta contrátil à fenilefrina foi realizado um controle interno através da indução de relaxamento nitrérgico por estimulação durante 10s com campo elétrico transmural (EFS; 20 V; 20Hz; 0,5s) através de eletrodos de platina em duplo anel. Os pontos mostram os locais de aplicação da Rut-CAF e os números indicam a concentração no banho como logaritmo negativo da concentração molar final. Notar que após lavagem a preparação tem recuperação normal da atividade mecânica espontânea. Não houve potencialização do relaxamento nitrérgico por estimulação elétrica após aplicação da substância Rut-Caf.

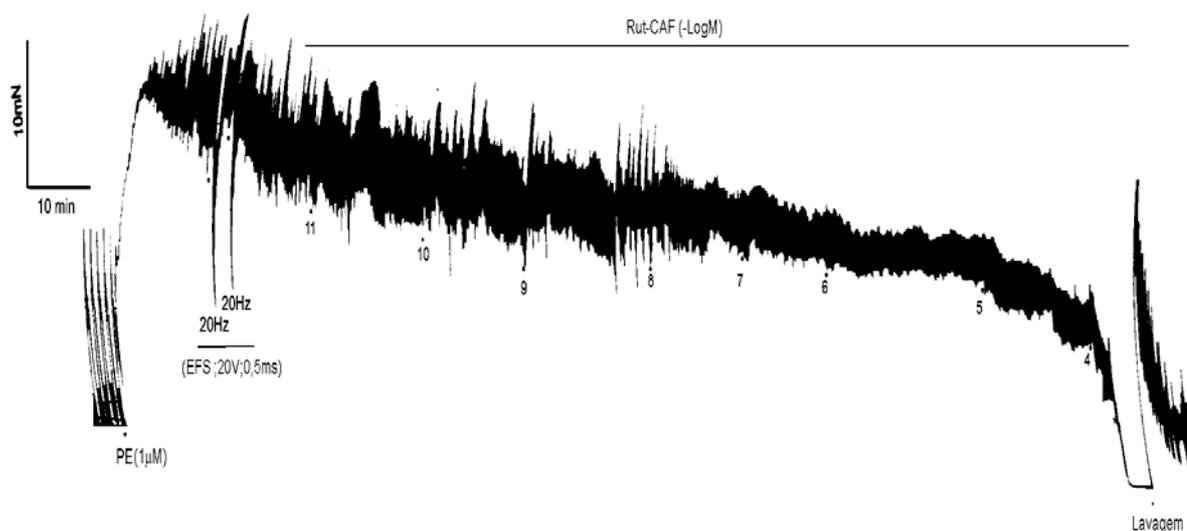


Figura 17 - Traçados fisiográficos representativos do efeito da Rut-CAF ( $10^{-11}$  a  $10^{-4}$ M) em tiras de corpos cavernosos de coelho mantido em solução de Krebs-Henseleit ( $37^{\circ}\text{C}$ ; pH 7,4; aerado com 95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) sob tensão de 1g e pré-contraídos com fenilefrina, na presença de estímulo elétrico (EFS).

Escala vertical=10mN e escala horizontal=10 min.

Traçados fisiográficos representativos do efeito da Rut-Caf ( $10^{-11}$  a  $10^{-4}$ M) em tira de corpo cavernoso obtido de doador cadáver humano mantido em solução de Krebs-Henseleit ( $37^{\circ}\text{C}$ ; pH 7,4. aerado com 95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) sob tensão de 1g e pré-contraídos com fenilefrina (PE;  $10\ \mu\text{M}$ ) são mostrados na Figura 18. Os pontos mostram os locais de aplicação da Rut-Caf e os números indicam a concentração no banho como logaritmo negativo da concentração molar final. Notar que após lavagem a preparação tem recuperação normal da atividade mecânica espontânea. O relaxamento obtido em corpo cavernoso humano é de intensidade semelhante ao observado em corpos cavernosos de coelho.

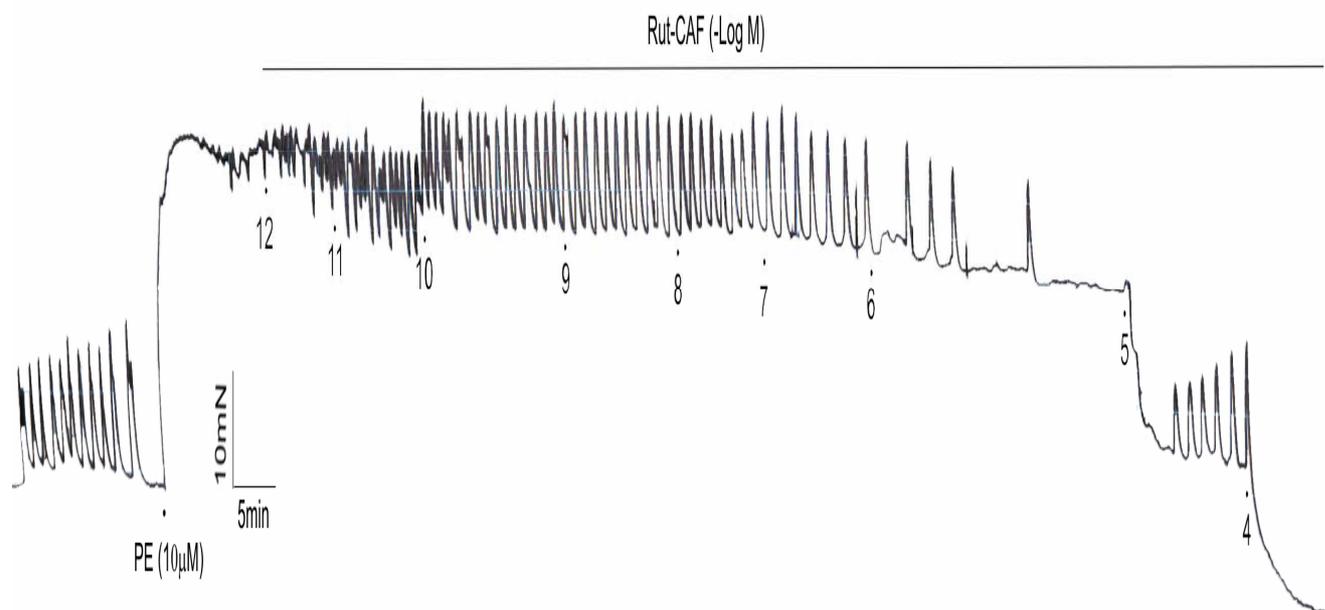


Figura 18 -Traçados fisiográficos representativos do efeito da Rut-Caf ( $10^{-11}$  a  $10^{-4}$  M) em tiras de corpos cavernosos obtidos de doador cadáver humano mantido em solução de Krebs-Henseleit (37 °C; pH 7,4, aerado com 95%  $O_2$  e 5%  $CO_2$ ) sob tensão de 1g e pré-contraídos com fenilefrina.

Escala vertical=10mN e escala horizontal=5 min. Notar diminuição da atividade espontânea adrenérgica após concentração de  $10^{-6}$ .

### **Efeito do removedor extracelular de NO (oxi-hemoglobina) e do removedor do ânion nitrosil (L-cisteína) no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho**

A curva de relaxamento induzida pela Rut-Caf foi deslocada para baixo em todas as concentrações em tecidos pré-tratados com oxi-hemoglobina  $10\mu M$ . ( $p < 0,05$ ) (Figura 20). A incubação dos tecidos com o removedor do ânion nitrosil ( $NO^-$ ) L-cisteína (L-cist;  $100\mu M$ ) não diminuiu o efeito de relaxamento induzido por Rut-Caf e, embora não tenha sido significativo, houve pequena potencialização do efeito de relaxamento (Figura 19).

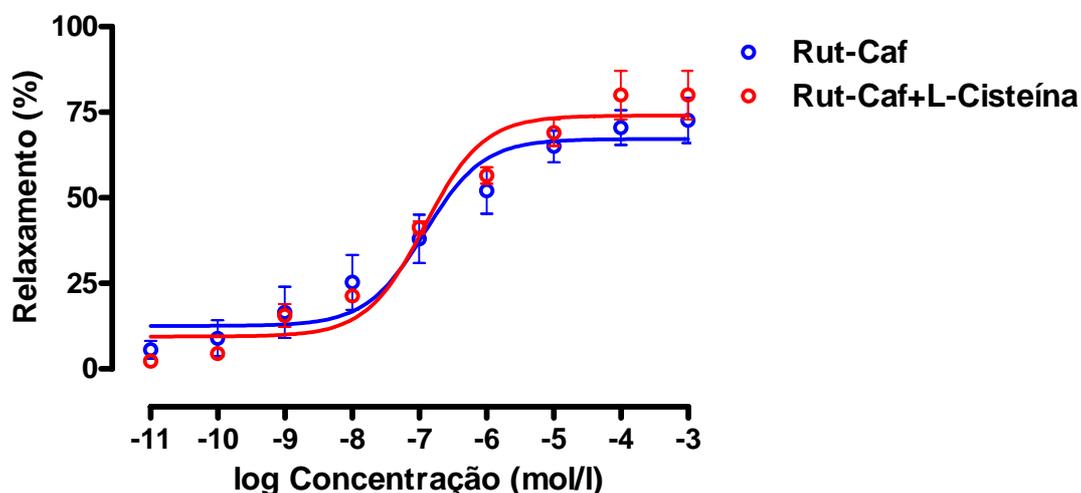


Figura 19- Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em tiras de corpos cavernosos de coelho na ausência ou presença de L-Cisteína (Cist). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

A determinação dos parâmetros  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  dos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + L-cisteína está demonstrada na tabela 2. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois compostos tanto em relação à  $pEC_{50}$  ( $P = 0,9155$ ) como em relação à variável  $E_{max}$  ( $P = 0,4752$ ).

TABELA 2 – Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  para Rut-Caf e Rut-Caf+L-Cisteína em corpos cavernosos de coelho. N= 4 experimentos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+L-Cisteína</b>	<b>Significância (valor P)</b>
$pEC_{50}$	$6,895 \pm 0,231$	$6,940 \pm 0,224$	0,9155
$E_{max}$ (%)	$72,600 \pm 6,633$	$80,000 \pm 7,100$	0,4752

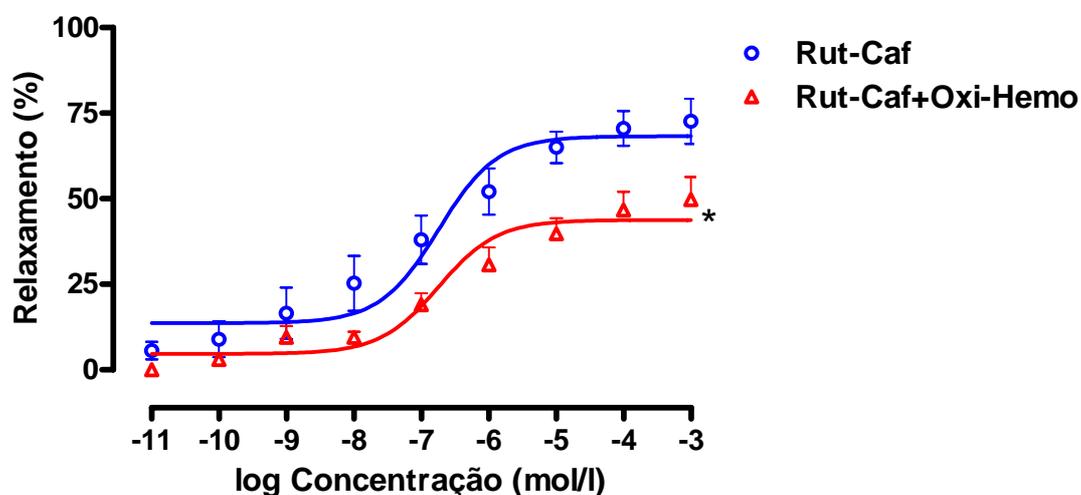


FIGURA 20 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho, considerando a presença e ausência de oxi-hemoglobina (Rut-Caf+Oxi-Hemo). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

A determinação dos parâmetros  $E_{max}$  e  $pEC50$  dos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + oxi-hemoglobina está demonstrada na tabela 3. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois compostos em relação à  $pEC50$  ( $P = 0,3608$ ). Todavia, o valor de  $E_{max}$  relativo a Rut-Caf+Oxi-Hemo foi significativamente menor que o referente a Rut-Caf ( $P = 0,0495$ ).

TABELA 3 – Determinação dos parâmetros  $pEC50$  e  $E_{max}$  para Rut-Caf e Rut-Caf+Oxi-Hemo em corpos cavernosos de coelho. N= 4 experimentos

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+Oxi-Hemo</b>	<b>Significância (valor P)</b>
$pEC50$	$6,895 \pm 0,231$	$6,406 \pm 0,243$	0,3608
$E_{max}$ (%)	$72,600 \pm 6,633$	$49,800 \pm 6,500$	0,0495

### Avaliação do relaxamento induzido pelas substâncias estudadas em anéis de aorta de coelho

As curvas representativas do relaxamento provocado por Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em anéis de aorta de coelho submetidos a pré-contracção com fenilefrina estão demonstradas na figura 21. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 (Rut-Bpy e SNP) ou 6 (Rut-Caf) experimentos.

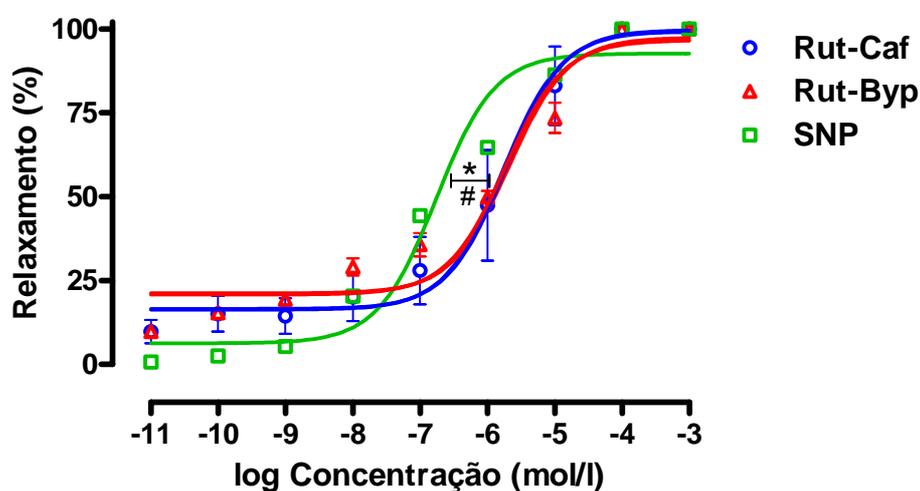


Figura 21- Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP (nitroprussiato de sódio) em anel de aorta de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 (Rut-Bpy e SNP) ou 6 (Rut-Caf) experimentos.

Os dados referentes aos parâmetros  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  dos grupos Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em anéis de aorta de coelho estão apresentados na tabela 4. Comparando-se os valores da  $pEC_{50}$  das três substâncias, verificou-se que aquela referente a SNP foi significativamente maior que as relativas a Rut-Caf (\* $P = 0,0110$ ) e Rut-Bpy (# $P = 0,0361$ ). O efeito máximo foi semelhante para as três substâncias.

TABELA 4 – Determinação dos parâmetros pEC50 e E<sub>max</sub> para as substâncias Rut-Caf, Rut-Bpy e SNP em anéis de aorta de coelho

<i>Parâmetro</i>	<i>Rut-Caf</i>	<i>Rut-Bpy</i>	<i>SNP</i>
pEC50	4,770 ± 0,109	5,674 ± 0,239	6,759 ± 0,211
E <sub>max</sub> (%)	100,000 ± 0,000	100,000 ± 0,000	100,000 ± 0,000

**Avaliação do efeito do removedor extracelular de NO (oxi-hemoglobina) em concentrações de 3µM e 10µM no relaxamento provocado pelas substâncias estudadas em anéis de aorta de coelho.**

A incubação das substâncias com o removedor extracelular de NO, oxi-hemoglobina, na concentração de 3µM não alterou significativamente o poder de relaxamento da substância Rut-Caf. A diminuição do efeito máximo da substância Rut-Caf foi maior na musculatura lisa da aorta do que no tecido de corpos cavernosos. Já na concentração de 10µM houve redução significativa do efeito máximo da substância Rut-Caf. Estes dados estão representados na figura 22. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.

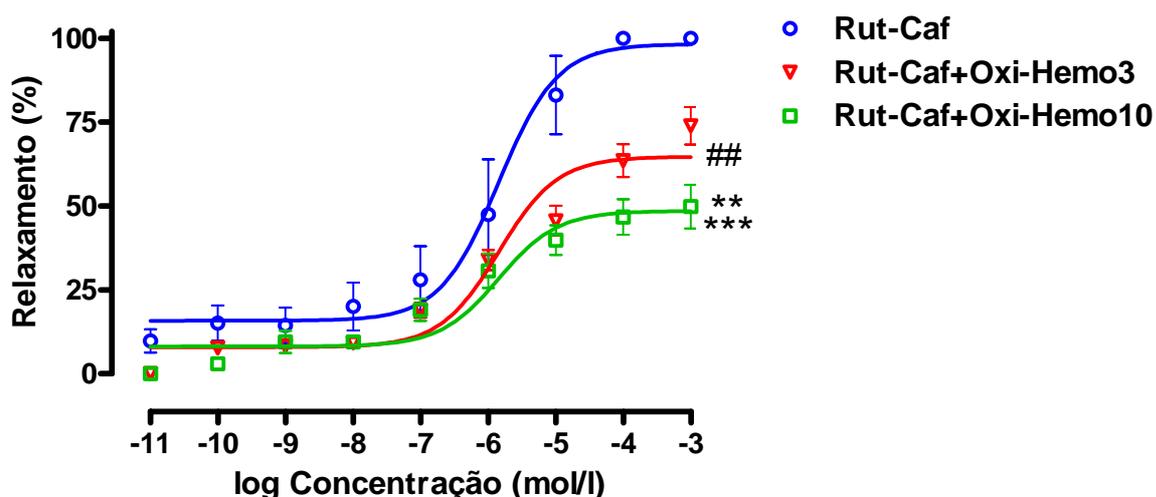


Figura 22- Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na ausência ou presença de oxi-hemoglobina (oxi-hemo). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.

Os dados referentes aos parâmetros  $E_{max}$  e  $pEC50$  dos grupos Rut-Caf, Rut-Caf+Oxi-Hemo3 e Rut-Caf + Oxi-Hemo10 em anéis de aorta de coelho estão apresentados na tabela 5. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os três compostos em relação à  $pEC50$  ( $P = 0,3145$ ). Todavia, em relação a Rut-Caf, verificou-se uma redução significativa de  $E_{max}$  com a associação de Rut-Caf+Oxi-Hemo3 ( $P < 0,01$ ) e Rut-Caf+Oxi-Hemo10 ( $P < 0,001$ ). Igualmente, o valor de  $E_{max}$  relativo a Rut-Caf+Oxi-Hemo10 foi significativamente menor que aquele referente a Rut-Caf+Oxi-Hemo3 ( $P < 0,01$ ).

TABELA 5 – Determinação dos parâmetros  $pEC50$  e  $E_{max}$  para Rut-Caf, Rut-Caf+Oxi-Hemo3 e Rut-Caf+Oxi-Hemo10 em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+Oxi-Hemo3</b>	<b>Rut-Caf+Oxi-Hemo10</b>
$pEC50$	$5,770 \pm 0,109$	$5,773 \pm 0,260$	$6,406 \pm 0,243$
$E_{max}$ (%)	$100,000 \pm 0,000$	$73,900 \pm 5,600$	$49,800 \pm 6,500$

A substância Rut-Bpy, após a adição de oxi-hemoglobina aos banhos na concentração de  $10\mu M$ , apresentou redução significativa do seu efeito máximo. A curva de relaxamento foi deslocada para baixo em todas as concentrações estudadas. As curvas de relaxamento concentração-resposta relativas a este experimento estão apresentadas na figura 23. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

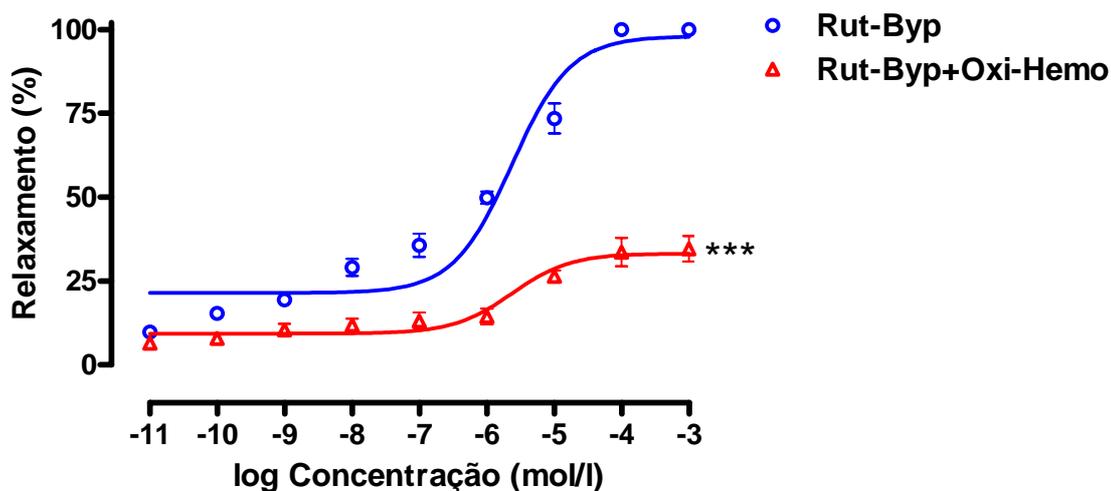


FIGURA 23 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por diferentes concentrações Rut-Bpy em anel de aorta de coelho, considerando a presença e ausência de oxi-hemoglobina (Rut-Bpy+Oxi-Hemo). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

Os dados referentes aos parâmetros  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  dos grupos Rut-Bpy e Rut-Bpy+Oxi-Hemo são apresentados na tabela 6. O valor de  $E_{max}$  relativo a Rut-Bpy+Oxi-Hemo foi significativamente menor que o referente a Rut-Bpy ( $P = 0,0004$ ).

TABELA 6 – Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  para Rut-Bpy e Rut-Bpy+Oxi-Hemo em anéis de aorta de coelho

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Bpy</b>	<b>Rut-Bpy+Oxi-Hemo</b>	<b>valor P</b>
$pEC_{50}$	$5,674 \pm 0,239$	$5,337 \pm 0,174$	0,6124
$E_{max}$ (%)	$100,000 \pm 0,000$	$34,600 \pm 3,800$	0,0004

### Efeito da ação do removedor do ânion nitrosil ( $\text{NO}^-$ ), L-cisteína, no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho.

A incubação dos tecidos com o removedor do ânion nitrosil ( $\text{NO}^-$ ) L-cisteína (L-cist; 100  $\mu\text{M}$ ) novamente provocou pequena potencialização do efeito de relaxamento induzido por Rut-Caf, à semelhança do efeito provocado em corpos cavernosos (Figura 24). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 3 (Rut-Caf+L-Cisteína) ou 6 (Rut-Caf) experimentos

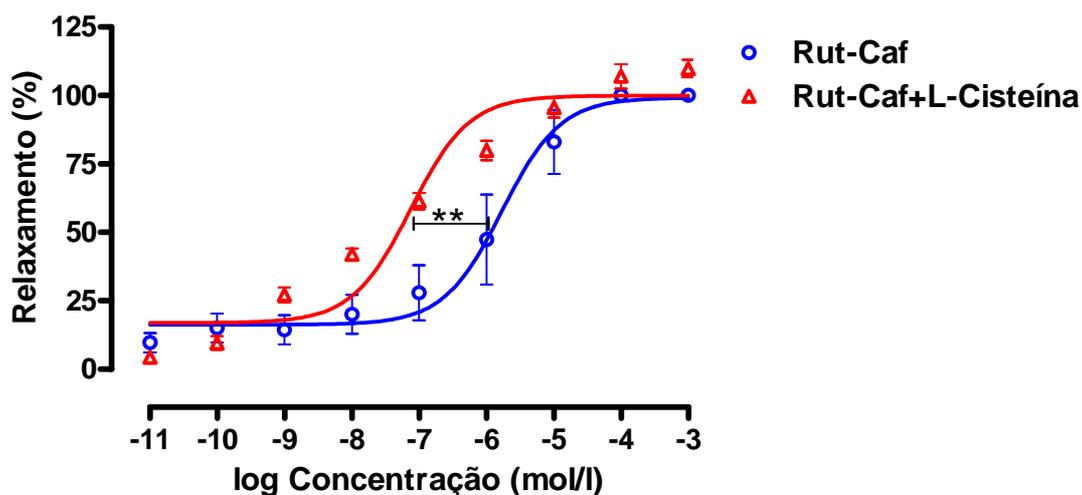


Figura 24- Efeito do complexo nitrosil-rutênio Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na ausência ou presença de L-cisteína. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 3 (Rut-Caf+L-Cisteína) ou 6 (Rut-Caf) experimentos

Os dados relativos aos parâmetros  $E_{\text{max}}$  e  $p\text{EC}_{50}$  dos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+L-cisteína estão apresentados na tabela 7. A  $p\text{EC}_{50}$  referente a Rut-Caf ( $5,770 \pm 0,109$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf+L-Cisteína ( $7,127 \pm 0,276$ ), sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0054$ ).

TABELA 7 – Determinação dos parâmetros pEC<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> para Rut-Caf e Rut-Caf+L-Cisteína em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+L-Cisteína</b>	<b>Significância (valor P)</b>
pEC <sub>50</sub>	5,770 ± 0,109	7,127 ± 0,276	0,0054
E <sub>max</sub> (%)	100,000 ± 0,000	109,800 ± 3,200	0,0921

## **CORPO CAVERNOSO**

### **Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente (K<sub>ATP</sub>), glibenclamida no relaxamento induzido pela substância Rut-CAF em corpos cavernosos de coelho**

A adição da substância glibenclamida aos banhos aumentou a potência do agente estudado, Rut-Caf, de maneira significativa. A pEC<sub>50</sub> aumentou de 4,9±0,2 para 7,4±0,2 (p<0,001). Não houve alteração significativa no efeito máximo de relaxamento induzido pela substância estudada (86% x 95%; p 0,06).

### **Rut-Caf versus Rut-Caf + Gib**

O efeito de concentrações diferentes de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor glibenclamida (Rut-Caf + Glib) está mostrado na Tabela 8 e na Figura 25. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos. O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar Rut-Caf (28,198 ± 7,226%) e Rut-Caf+Glib (49,527 ± 9,735%), não se havendo constatado diferença estatisticamente significativa (P = 0,1004).

Tabela 8: Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf e Rut-Caf + glibeclamida em corpos cavernosos de coelho.

<i>log</i> <i>[RutCaf]</i>	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf + Glib</i>		<i>valor p</i>
	Média	EPM	Média	EPM	
-11	4,009	1,436	11,697	2,141	0,0114
-10	10,510	3,320	20,689	4,335	0,0869
-9	16,791	4,299	32,881	5,178	0,0341
-8	22,087	5,616	43,729	6,205	0,0238
-7	27,510	6,602	54,793	7,873	0,0210
-6	32,724	6,778	64,956	8,790	0,0132
-5	43,834	8,153	75,739	9,529	0,0257
-4	68,116	8,987	91,730	7,043	0,0609

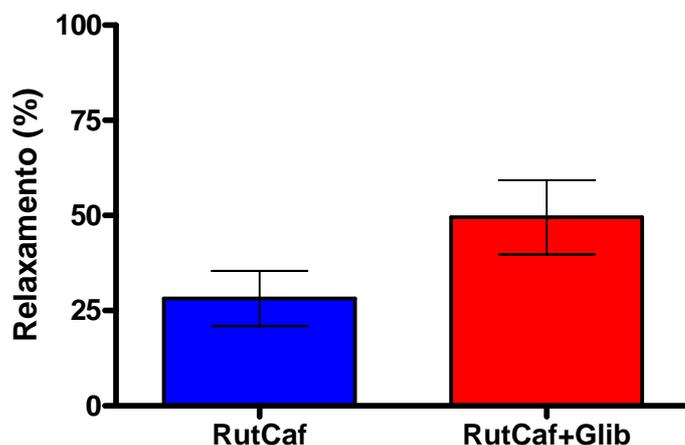


Figura 25 – Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Glib em corpos cavernosos de coelho.

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + Glib são mostradas na figura 26. Dados expressos como

média e erro- padrão da média (EPM) das medições efetuadas em sete experimentos. A pEC50 referente a Rut-Caf ( $4,940 \pm 0,296$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf+Glib ( $7,434 \pm 0,226$ ), sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

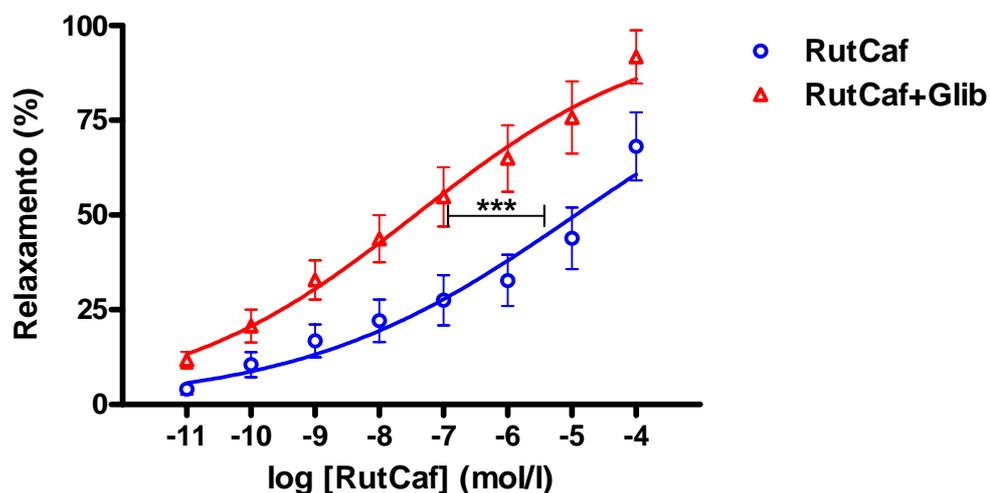


Figura 26 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + Glib em corpos cavernosos de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos.

A determinação dos parâmetros pEC50 e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + Glib em corpos cavernosos de coelho é mostrada na Tabela 9.

Tabela 9: Determinação dos parâmetros pEC50 e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+Glib em corpos cavernosos de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf + Glib</b>	<b>valor p</b>
pEC50	$4,940 \pm 0,296$	$7,434 \pm 0,226$	$< 0,0001$
$E_{max}$	$68,116 \pm 8,987\%$	$91,730 \pm 7,043\%$	0,0609

### Rut-Caf *versus* Rut-Caf + iberotoxina + apamina

**Efeito dos bloqueadores de canais de íons potássio de alta, média e baixa condutividade, dependentes do cálcio ( $K_{CA}$ ), iberiotoxina e apamina, respectivamente, no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho.**

Os efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência de iberotoxina+apamina, são mostrados na Tabela 10. Dados representativos de oito experimentos. A adição dos agentes iberotoxina e apamina aos banhos não alterou o efeito máximo de relaxamento (50% nas duas situações) ou a potência das substâncias ( $pEC_{50}$  de 4,0), nas duas situações.

TABELA 10 – Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho na presença e ausência de iberotoxina+apamina.

<i>log</i> [RutCaf]	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf + Ibero + Apamin</i>		<i>valor p</i>
	Média	EPM	Média	EPM	
-11	3,831	1,495	1,666	1,666	0,3499
-10	3,473	1,331	6,290	2,326	0,3110
-9	5,081	1,802	13,238	6,140	0,2232
-8	6,358	1,273	20,690	6,078	0,0368
-7	8,045	1,974	22,636	6,001	0,0367
-6	11,279	3,109	25,673	5,535	0,0397
-5	22,130	4,768	29,900	5,722	0,3145
-4	47,243	8,107	53,678	8,008	0,5812

A quantificação do relaxamento médio induzido por parte de Rut-Caf e Rut-Caf + iberó + apamin, expresso como média e erro-padrão da média (EPM) dos valores médios do percentual de relaxamento, foi calculada para as diferentes concentrações de Rut-Caf (Figura 27). O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar Rut-Caf ( $13,430 \pm 5,284\%$ ) e Rut-Caf + iberó + apamin ( $21,721 \pm 5,698\%$ ), não havendo sido constatada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,3040$ ).

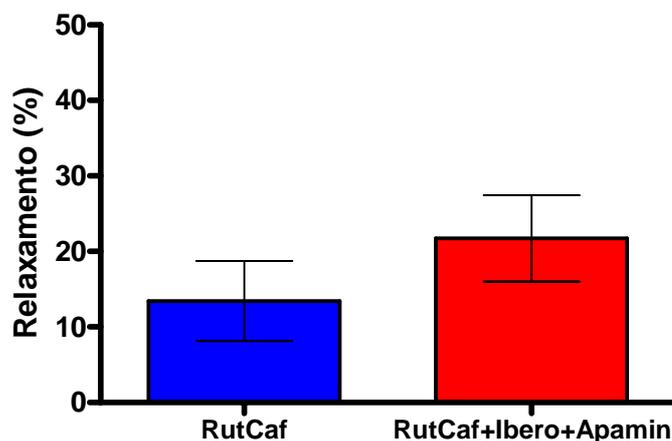


Figura 27 – Quantificação do relaxamento médio induzido por parte de Rut-Caf e Rut-Caf+iberó+apamin em corpos cavernosos de coelho.

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por parte de Rut-Caf e Rut-Caf+iberó+apamin são mostradas na Figura 28. As curvas foram obtidas conforme explicado anteriormente. Os dados são expressos como média e erro-padrão da média (EPM) das medições efetuadas em oito experimentos. A  $pEC_{50}$  referente a Rut-Caf ( $3,748 \pm 0,190$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf+iberó+apamin ( $3,757 \pm 0,453$ ), não tendo sido constatada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,9860$ ).

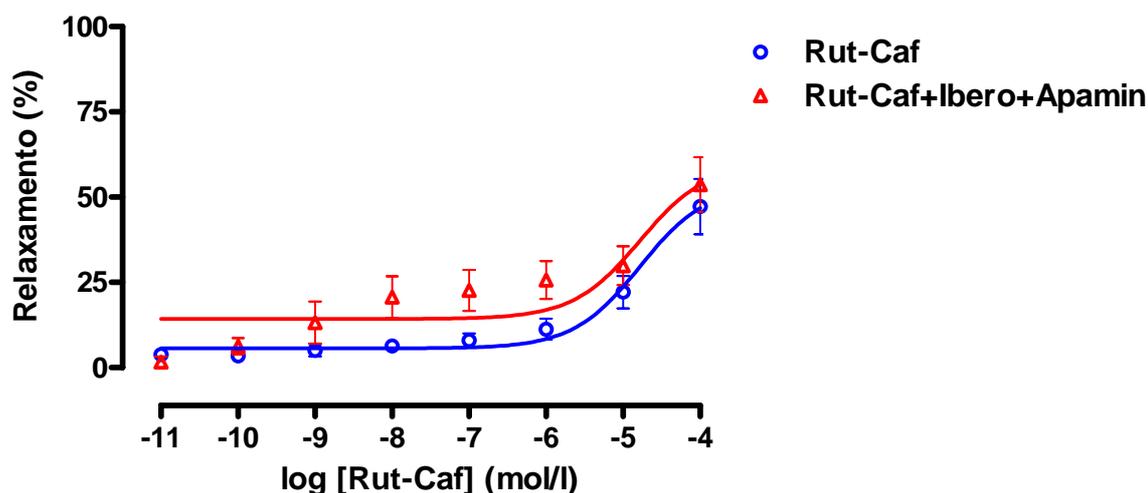


Figura 28– Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin em corpos cavernosos de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos.

A determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  ( $-\log EC_{50}$ ) e  $E_{max}$  (efeito máximo de relaxamento) nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11: Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos RutCaf e RutCaf+ibero+apamin em corpos cavernosos de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+ibero+apamin</b>	<b>valor p</b>
$pEC_{50}$	$3,748 \pm 0,190$	$3,757 \pm 0,453$	0,9860
$E_{max}$	$47,243 \pm 8,107\%$	$53,678 \pm 8,008\%$	0,5812

## ANEL DE AORTA

**Efeito do bloqueador de canais de íons potássio ATP-dependente ( $K_{ATP}$ ), glibenclamida no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho.**

### **Rut-Caf versus Rut-Caf+glib**

Os efeitos de concentrações diferentes de Rut-Caf em anel de aorta de coelho submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor glibenclamida (Rut-Caf+Glib) são apresentados na Tabela 12. Os dados são expressos como média e erro-padrão da média das medições efetuadas em quatro experimentos. Em anéis de aorta de coelho, não houve alteração do efeito máximo ( $E_{max}$ , 75% x 85%) ou da potência ( $pEC_{50}$   $4,5 \pm 0,3$ ), quando a substância glibenclamida foi adicionada.

Tabela 12: Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho, medidos em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor glibenclamida (Rut-Caf+Glib).

<i>log</i> <i>[RutCaf]</i>	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf+Glib</i>		<i>valor p</i>
	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	
-11	6,230	3,341	3,250	1,974	0,4716
-10	9,560	3,692	3,875	1,712	0,2120
-9	10,618	4,494	7,375	2,625	0,5562
-8	15,948	5,990	6,125	2,503	0,1811
-7	17,188	7,436	8,750	4,146	0,3599
-6	20,915	7,179	17,160	3,598	0,6566
-5	41,053	11,194	42,948	9,927	0,9033
-4	64,840	9,608	72,053	13,355	0,6764

A quantificação do relaxamento médio induzido por parte de Rut-Caf e Rut-Caf+Glib é demonstrada na Figura 29, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa (Rut-Caf:  $23,294 \pm 7,044\%$  e Rut-Caf+Glib:  $20,192 \pm 8,725\%$ ;  $p = 0,7861$ ).

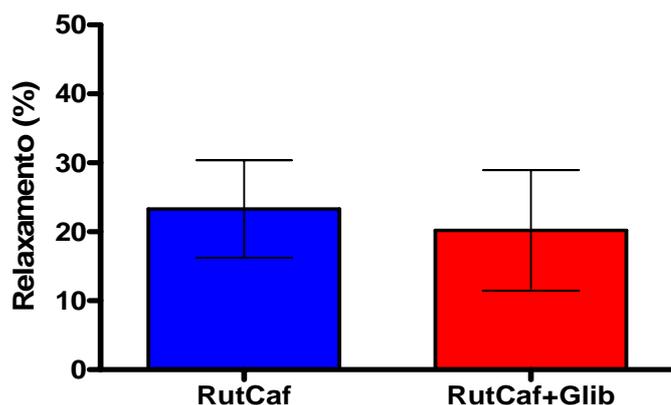


Figura 29 – Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Glib em anéis de aorta de coelho

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por parte de Rut-Caf e Rut-Caf+glib obtidas via regressão não linear, com assento nos valores médios do percentual de relaxamento calculados para diferentes concentrações de Rut-Caf são mostradas na Figura 30. Para tanto, tomou-se como base o modelo de função sigmóide, como explicado anteriormente. Os dados são expressos como média e erro padrão da média das medições em quatro experimentos. A  $pEC_{50}$  referente a Rut-Caf ( $4,552 \pm 0,307$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf+glib ( $4,770 \pm 0,147$ ), não tendo sido constatada diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,4896$ ).

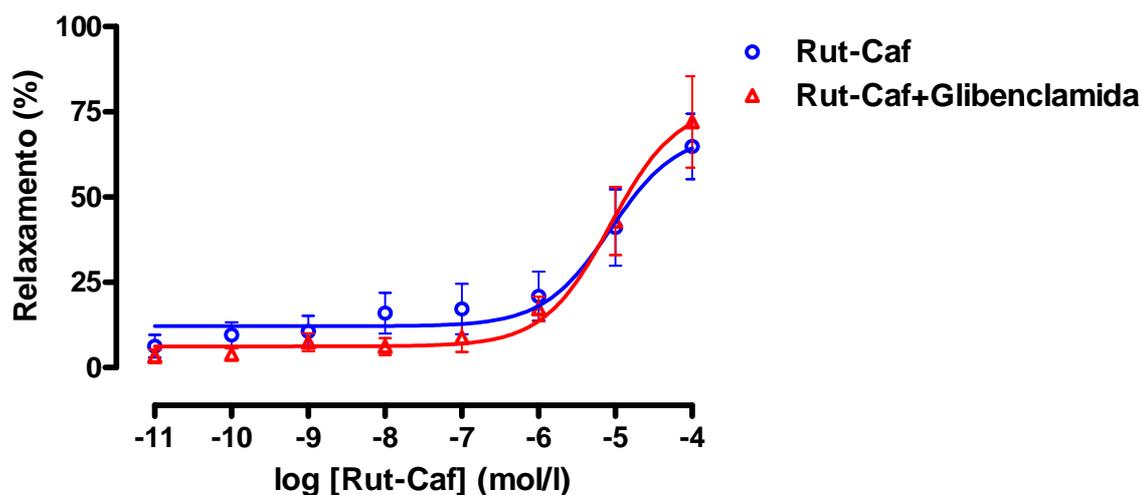


Figura 30 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Glib em anéis de aorta de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos

A determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+Glib é apresentada na Tabela 13, não se havendo encontrado diferença estatisticamente significativa.

Tabela 13: Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+Glib em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+Glib</b>	<b>valor p</b>
EC50	4,552 ± 0,307	4,770 ± 0,147	0,4896
E <sub>max</sub>	64,840 ± 9,608%	72,053 ± 13,355%	0,6764

### Rut-Caf versus Rut-Caf+ibero+apamin

#### Efeito dos bloqueadores de canais de íons potássio de alta, média e baixa condutividade, dependentes do cálcio ( $K_{CA}$ ), iberiotoxina e apamina, no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho

Os efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência de ibero+apamin, são mostrados na Tabela 14. Os dados são expressos como média e erro-padrão da média das medições efetuadas em dez experimentos. Não houve nenhuma alteração significativa no  $E_{max}$  ou na  $pEC_{50}$  após a adição dos bloqueadores de canais de íons potássio de alta, média e baixa condutividade dependentes do cálcio ( $K_{CA}$ ), iberiotoxina e apamina.

Tabela 14: Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho na presença e ausência de ibero+apamin.

<i>log [RutCaf]</i>	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut- Caf+Ibero+Apamin</i>		<i>valor p</i>
	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	
-11	11,007	1,883	7,029	2,202	0,1866
-10	14,844	3,535	10,909	4,305	0,4890
-9	7,636	1,642	11,607	4,213	0,3914
-8	5,842	1,884	10,371	3,074	0,2251
-7	6,483	2,375	9,480	1,806	0,3285
-6	2,496	1,024	9,137	2,085	0,0104
-5	40,086	8,338	29,961	9,603	0,4363
-4	71,184	7,856	65,705	8,561	0,6429

As medidas do relaxamento médio induzido pela substância Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin em anéis de aorta de coelho, expressos como média e erro-padrão da média dos valores médios do percentual de relaxamento, calculados para diferentes concentrações de Rut-Caf, são mostradas na Figura 31. Comparando-se Rut-Caf ( $19,947 \pm 8,423\%$ ) com Rut-Caf+Ibero+Apamin ( $19,275 \pm 7,105\%$ ), não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,9522$ ).

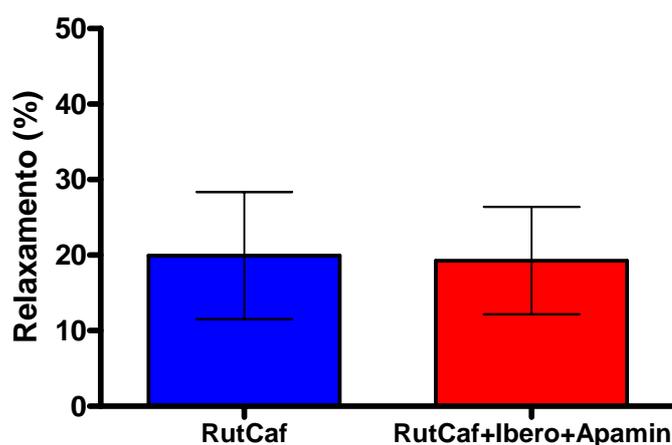


Figura 31 – Quantificação do relaxamento médio induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin em anéis de aorta de coelho.

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido pela substância Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin, obtidas via regressão não linear com esteio nos valores médios do percentual de relaxamento calculados para as diferentes concentrações de Rut-Caf são apresentadas na Figura 32. Os dados são expressos como média e erro-padrão da média das medições efetuadas em dez experimentos. A  $pEC_{50}$  referente a RutCaf ( $4,633 \pm 0,101$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf+ibero+apamin ( $4,428 \pm 0,138$ ), não se havendo constatado diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2199$ ).

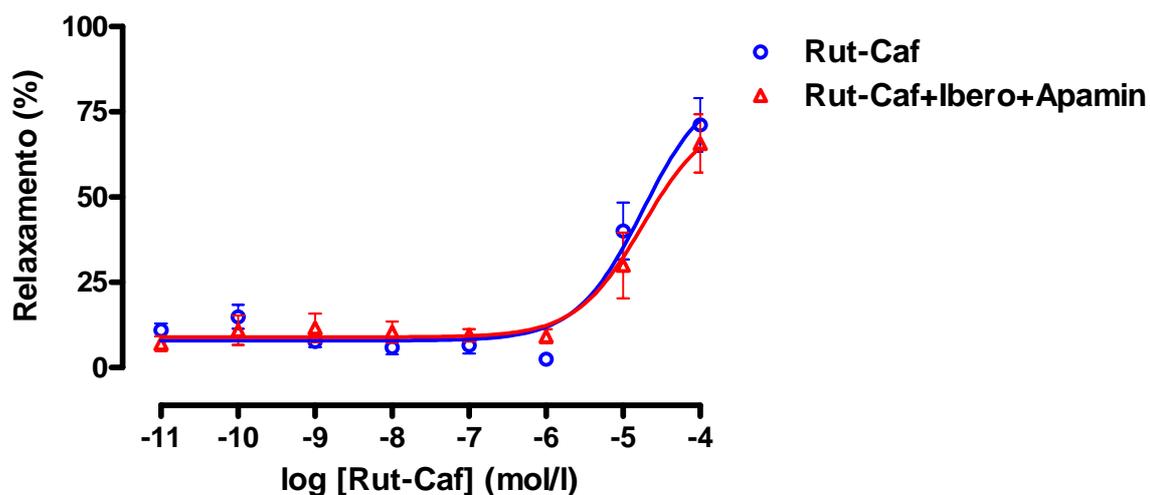


Figura 32 – Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+bero+apamin em anéis de aorta de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 10 experimentos

A determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin em anéis de aorta de coelho é mostrada na Tabela 15. A  $pEC_{50}$  foi calculada a partir da curva concentração-efeito obtida via regressão não linear. Não houve diferença estatisticamente significativa para os dois parâmetros.

Tabela 15 - Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+ibero+apamin em anéis de aorta de coelho.

<i>Parâmetro</i>	<i>Rut-Caf</i>	<i>Rut-Caf+Ibero+Apamin</i>	<i>Significância (valor P)</i>
$pEC_{50}$	$4,834 \pm 0,159$	$4,598 \pm 0,238$	0,3718
$E_{max}$ (%)	$71,184 \pm 7,856$	$65,705 \pm 8,561$	0,6429

## ANEL DE AORTA SEM ENDOTÉLIO

### Efeito da remoção do endotélio no relaxamento provocado pela substância Rut-Caf em anéis de aorta de coelho

A remoção do endotélio não provocou diminuição do efeito máximo nem da potência da substância estudada.

#### Rut-Caf

Os efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho submetido à remoção prévia do endotélio e à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, expressos como média e erro-padrão da média das medições efetuadas em oito experimentos, são mostrados na Tabela 16.

TABELA 16 – Efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho submetidos à remoção prévia do endotélio.

<i>log</i> <i>[Rut- Caf]</i>	<i>Rut-Caf</i>	
	<b>Média</b>	<b>EPM</b>
-11	7,620	3,250
-10	9,831	3,316
-9	13,061	3,732
-8	15,628	4,904
-7	18,604	4,541
-6	27,256	5,704
-5	58,689	7,808
-4	86,099	6,880
Média	29,598	9,917

A curva concentração-resposta relativa ao relaxamento induzido pela substância Rut-Caf em anel de aorta de coelho com e sem endotélio é mostrada na Figura 33.

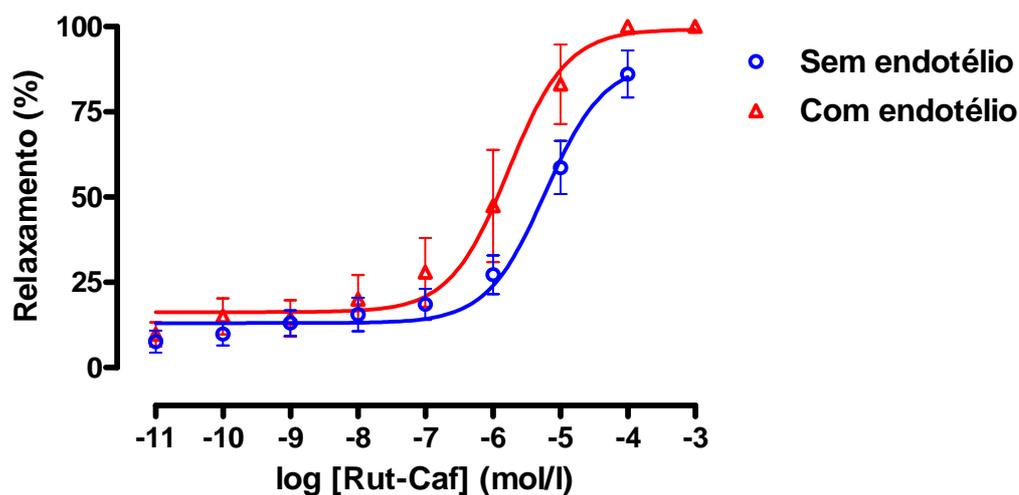


Figura 33 – Curva concentração-resposta relativa ao relaxamento induzido por Rut-Caf em anéis de aorta de coelho com e sem endotélio.

As medidas dos parâmetros pEC<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> relativos ao efeito de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho sem endotélio são mostradas na Tabela 17.

Tabela 17: Medidas dos parâmetros pEC<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> relativos ao efeito de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho sem endotélio

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>
pEC <sub>50</sub>	5,407 ± 0,152
E <sub>max</sub>	98,099 ± 6,880%

### Corpo cavernoso: Rut-Caf *versus* Rut-Caf + hidroxicoBALAMINA

Os efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicoBALAMINA, são demonstrados na Tabela 18. A adição de hidroxicoBALAMINA inibiu significativamente o relaxamento induzido por Rut-Caf em todas as concentrações. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos.

Tabela 18: Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicoBALAMINA.

<i>log</i> [RutCaf]	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut- Caf+HidroxicoBALAMINA</i>		<i>valor p</i>
	<b>Média</b>	<b>EPM</b>	<b>Média</b>	<b>EPM</b>	
-11	5,748	0,753	2,672	0,767	<b>0,0143</b>
-10	10,364	1,538	5,406	0,975	<b>0,0185</b>
-9	16,460	2,391	7,694	1,198	<b>0,0066</b>
-8	21,363	2,321	9,934	1,932	<b>0,0026</b>
-7	26,254	2,545	12,151	2,631	<b>0,0023</b>
-6	30,481	2,712	13,720	2,837	<b>0,0011</b>
-5	35,843	1,742	15,862	3,233	<b>0,0001</b>
-4	42,962	1,272	18,426	3,885	<b>0,0001</b>

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Hidroxicoalamina são mostradas na Figura 34.

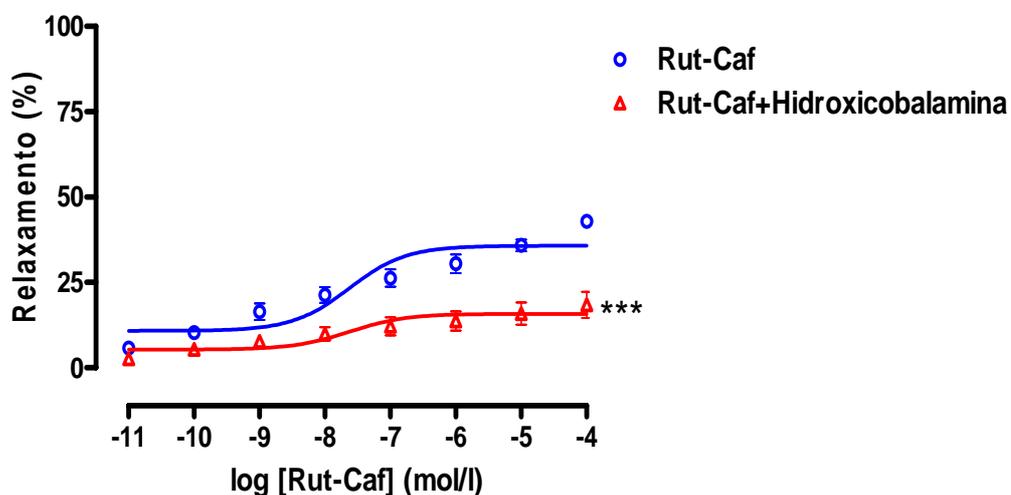


Figura 34- Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Hidroxicoalamina em corpos cavernosos de coelho. Dados referentes à realização de 7 experimentos.

Os dados de  $E_{max}$  e  $PEC_{50}$  dos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + hidroxicoalamina em corpos cavernosos de coelho estão demonstrados na tabela 19. A presença de hidroxicoalamina inibiu significativamente o relaxamento induzido pela Rut-Caf.

TABELA 19 – Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+Hidroxicoalamina em corpos cavernosos de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf+Hidroxicoalamina</b>	<b>valor P</b>
$pEC_{50}$	$7,532 \pm 0,210$	$7,876 \pm 0,437$	0,7680
$E_{max}$ (%)	$42,962 \pm 1,272$	$18,426 \pm 3,885$	$P < 0,0001$

### Anel de aorta: Rut-Caf versus Rut-Caf+Hidroxicobalamina

Os efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicobalamina (Rut-Caf+Hidroxi) são mostrados na Tabela 20. A adição do removedor específico do radical livre do óxido nítrico, hidroxicobalamina, aos banhos, inibiu significativamente o relaxamento do endotélio vascular provocado pela substância Rut-Caf ( $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos

Tabela 20: Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho considerando a presença e ausência do inibidor hidroxicobalamina (RutCaf+Hidroxi).

<i>log [RutCaf]</i>	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf+Hidroxi</i>		<i>valor p</i>
	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	
-11	6,046	2,814	0,000	0,000	–
-10	4,478	1,827	1,071	0,698	0,1071
-9	6,655	2,522	1,389	0,688	0,0670
-8	5,147	2,037	4,278	1,214	0,7202
-7	4,864	2,325	6,214	1,511	0,6350
-6	3,946	2,549	9,473	1,456	0,0841
-5	48,647	11,386	12,177	1,642	<b>0,0081</b>
-4	85,338	9,468	21,380	2,268	<b>&lt; 0,0001</b>

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido pela substância Rut-Caf e Rut-Caf+hidroxi em anel de aorta de coelho, obtidas via regressão não linear com suporte nos valores médios do percentual de relaxamento calculados para as diferentes concentrações de Rut-Caf, são mostradas na Figura 35. A pEC50 referente a Rut-Caf ( $4,927 \pm 0,092$ ) foi comparada com Rut-Caf+hidroxi ( $1,324 \pm 0,377$ ), havendo-se constatado diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos.

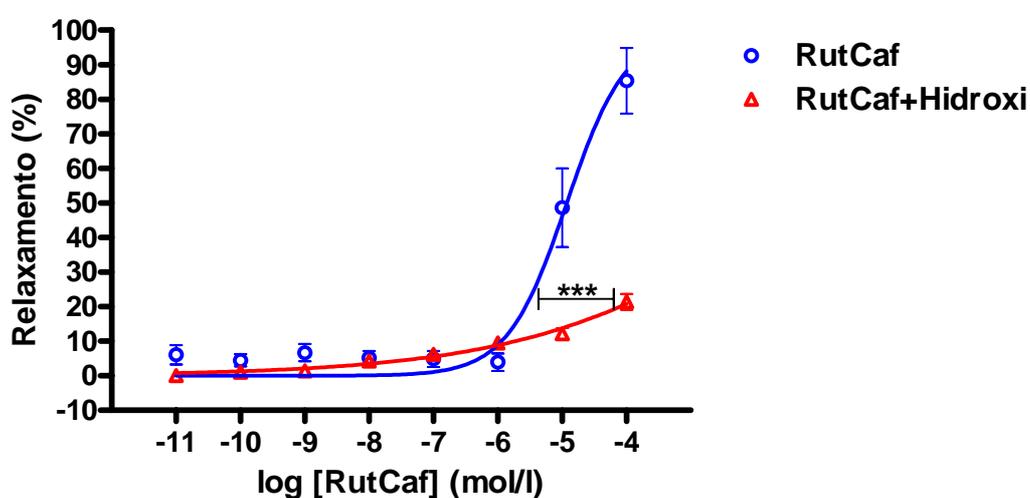


Figura 35 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+Hidroxycobalamina em anéis de aorta de coelho. Dados relativos à realização de sete experimentos.

Os parâmetros pEC50 e efeito máximo de relaxamento nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf+Hidroxi em anel de aorta de coelho são mostrados na Tabela 21, observando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dois parâmetros.

Tabela 21: Parâmetros pEC50 e  $E_{max}$  nos grupos RutCaf e RutCaf+Hidroxi em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>RutCaf</b>	<b>RutCaf+Hidroxi</b>	<b>valor p</b>
pEC50	$4,927 \pm 0,092$	$1,324 \pm 0,377$	$< 0,0001$
$E_{max}$	$85,338 \pm 9,468\%$	$21,380 \pm 2,268\%$	$< 0,0001$

### Corpo cavernoso: Rut-Caf versus Rut-Caf + ODQ 10 $\mu\text{M}$

Os efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho, medidos em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$ ), são apresentados na Tabela 22. A utilização do bloqueador seletivo da enzima guanilatociclase solúvel, ODQ, na dose 10 $\mu\text{M}$  reduziu significativamente o relaxamento provocado pela substância Rut-Caf na musculatura lisa do corpo cavernoso. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos.

Tabela 22 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$ ).

<i>log</i> <i>[Rut-Caf]</i>	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf + ODQ 10</i> <i><math>\mu\text{M}</math></i>		<i>valor p</i>
	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	<i>Média</i>	<i>EPM</i>	
-11	1,546	0,535	1,687	0,606	0,8639
-10	2,907	0,728	6,493	0,718	<b>0,0043</b>
-9	5,045	1,036	10,240	1,499	<b>0,0146</b>
-8	7,154	1,263	14,098	2,125	<b>0,0158</b>
-7	8,923	1,569	18,348	2,900	<b>0,0144</b>
-6	11,822	1,898	22,361	3,571	<b>0,0230</b>
-5	23,181	5,309	26,925	3,789	0,5765
-4	57,715	9,237	34,605	3,726	<b>0,0388</b>

A determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu M$  em corpo cavernoso de coelho é mostrada na Tabela 23. A adição de ODQ 10  $\mu M$  inibiu significativamente o relaxamento induzido pela Rut-Caf.

Tabela 23: Determinação dos parâmetros  $pEC_{50}$  e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu M$  em corpos cavernosos de coelho.

<i>Parâmetro</i>	<i>Rut-Caf</i>	<i>Rut-Caf+ODQ10</i>	<i>valor P</i>
$pEC_{50}$	$4,591 \pm 0,195$	$7,051 \pm 0,261$	0,0002
$E_{max}$ (%)	$57,715 \pm 9,237$	$34,605 \pm 3,726$	0,0388

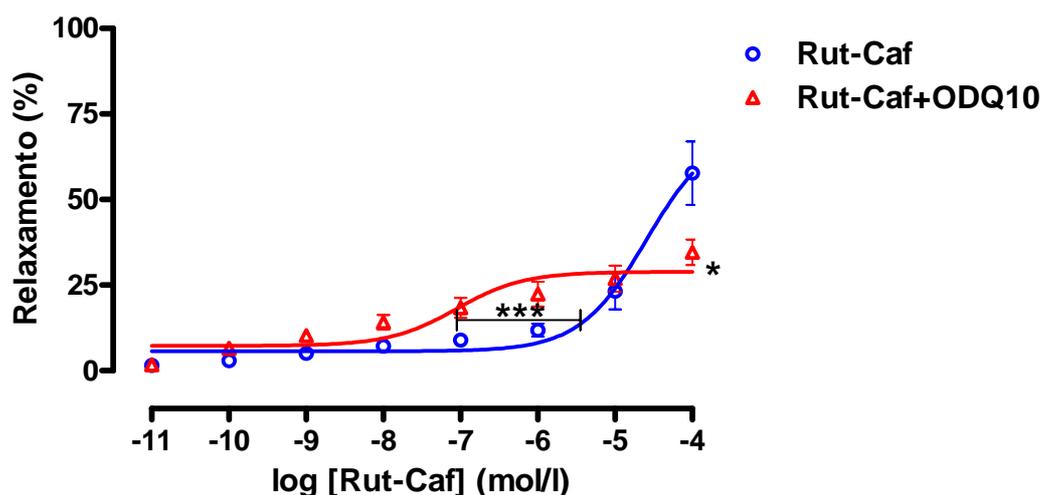


FIGURA 36 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf+ODQ10 em corpo cavernoso de coelho. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 7 experimentos.

### Anel de aorta: Rut-Caf *versus* Rut-Caf + ODQ 10 $\mu\text{M}$

Os efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho, medidos em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$ ), expressos como média e erro-padrão da média (EPM) das medições efetuadas em quatro experimentos, são mostrados na Tabela 24. O efeito do bloqueador específico da enzima guanilato- ciclase solúvel, ODQ, na dose de 10 $\mu\text{M}$  no endotélio vascular da aorta de coelho, provocou redução significativa do relaxamento induzido pela Rut-Caf.

Tabela 24 - Efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 10  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$ ).

<i>log</i> [RutCaf]	<i>RutCaf</i>		<i>RutCaf + ODQ 10</i> <i><math>\mu\text{M}</math></i>		<i>valor p</i>
	Média	EPM	Média	EPM	
-11	4,982	2,023	2,488	1,528	0,3633
-10	2,785	1,327	2,245	1,190	0,7723
-9	3,455	1,825	2,065	0,615	0,4975
-8	5,621	1,325	2,642	1,426	0,1768
-7	3,270	1,863	4,317	0,463	0,6050
-6	4,679	2,262	4,748	0,610	0,9776
-5	6,699	2,680	5,114	0,853	0,5937
-4	34,458	5,668	9,415	1,219	<b>0,0050</b>

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido pela substância Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho são mostradas na Figura 37 . A pEC50 referente a Rut-Caf ( $3,617 \pm 0,132$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$  ( $-4,992 \pm 2,001$ ), sendo constatada diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0001$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 4 experimentos.

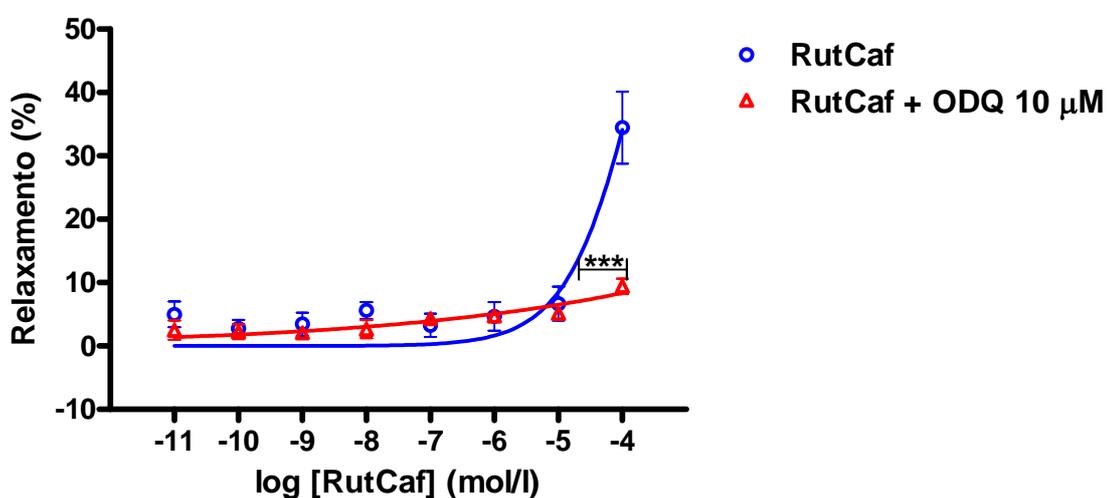


Figura 37 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$  em anéis de aorta de coelho. Dados relativos à realização de quatro experimentos.

A determinação dos parâmetros pEC50 e  $E_{\text{max}}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho é apresentada na Tabela 25. A presença do inibidor da enzima guanilatociclase solúvel (ODQ), inibiu significativamente o relaxamento e a potência da substância estudada, de maneira semelhante àquela observada em corpos cavernosos de coelho.

Tabela 25 - Determinação dos parâmetros pEC50 e E<sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 10  $\mu$ M em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf + ODQ 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>valor p</b>
pEC50	3,617 $\pm$ 0,132	-4,992 $\pm$ 2,001	0,0001
E <sub>max</sub>	34,458 $\pm$ 5,668%	9,415 $\pm$ 1,219%	0,0050

### **Anel de aorta: Rut-Caf versus Rut-Caf + ODQ 30 $\mu$ M**

Os efeitos de variadas concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 30  $\mu$ M (Rut-Caf + ODQ 30  $\mu$ M), expressos como média e erro-padrão da média (EPM) das medições efetuadas em oito experimentos, são mostrados na Tabela 26. Não houve diferença significativa na redução do efeito relaxante da substância estudada quando comparadas as doses de 10 $\mu$ M e 30 $\mu$ M do inibidor específico da guanilatociclase solúvel.

Tabela 26 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anéis de aorta de coelho, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 30  $\mu$ M (Rut-Caf + ODQ 30  $\mu$ M)

<b>log [RutCaf]</b>	<b>Rut-Caf</b>		<b>Rut-Caf + ODQ 30 <math>\mu</math>M</b>		<b>valor p</b>
	<b>Média</b>	<b>EPM</b>	<b>Média</b>	<b>EPM</b>	
-11	6,433	1,717	6,984	1,585	0,8167
-10	7,240	2,433	8,083	2,219	0,8017
-9	8,634	2,602	11,516	2,338	0,4237
-8	9,578	3,459	12,889	2,390	0,4440
-7	9,624	3,925	17,935	2,377	0,0916
-6	16,902	4,883	19,410	2,454	0,6534
-5	62,173	6,755	23,577	3,105	<b>0,0001</b>
-4	91,144	3,449	32,111	2,972	<b>&lt; 0,0001</b>

As curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido pela substância Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho são mostradas na Figura 38. A pEC<sub>50</sub> referente a Rut-Caf ( $5,251 \pm 0,079$ ) foi comparada com a relativa a Rut-Caf + ODQ 30  $\mu\text{M}$  ( $0,860 \pm 0,659$ ), havendo-se comprovado diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos.

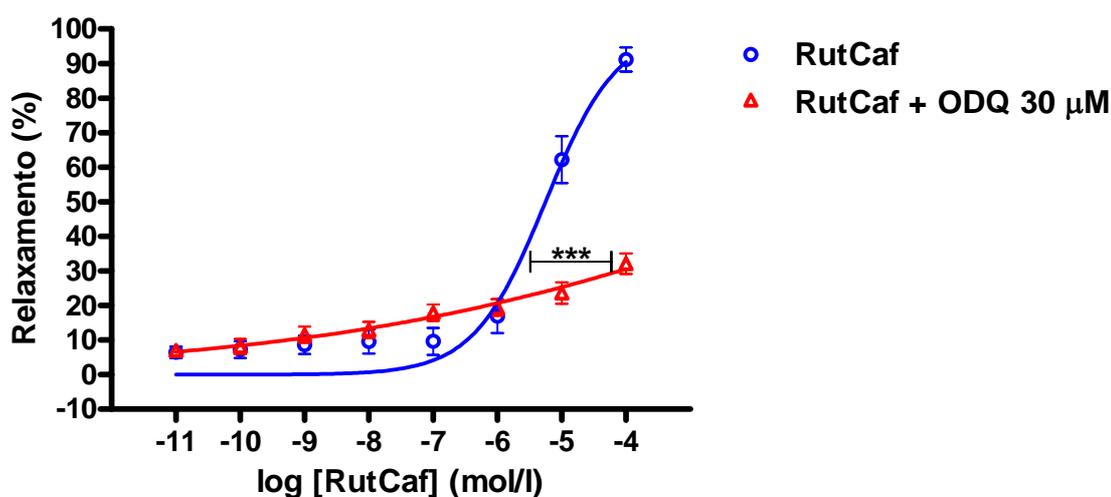


Figura 38 – Curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30  $\mu\text{M}$  em anéis de aorta de coelho. Dados relativos à realização de oito experimentos.

Os parâmetros pEC<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho são mostrados na Tabela 27. Como demonstrado anteriormente, o aumento da dose do inibidor da enzima guanilatociclase solúvel, ODQ de 10 $\mu\text{M}$  para 30 $\mu\text{M}$ , não induziu inibição adicional no relaxamento provocado pela Rut-Caf.

Tabela 27 - Determinação dos parâmetros pEC<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 30  $\mu\text{M}$  em anéis de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf + ODQ 30 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>valor p</b>
pEC <sub>50</sub>	5,251 ± 0,079	0,860 ± 0,659	< 0,0001
E <sub>max</sub>	91,144 ± 3,449%	32,111 ± 2,972%	< 0,0001

## ODQ 3 $\mu\text{M}$

### Corpo cavernoso: Rut-Caf versus Rut-Caf + ODQ 3 $\mu\text{M}$

Os efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpo cavernoso de coelho submetido à pré-contracção com fenilefrina, medido em termos de percentual de relaxamento, considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$ ) são mostrados na Tabela 28. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos

Tabela 28 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em corpos cavernosos de coelho considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$ ).

<i>log</i> [RutCaf]	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf + ODQ 3</i> <i><math>\mu\text{M}</math></i>		<i>valor p</i>
	Média	EPM	Média	EPM	
-11	1,064	0,697	3,993	1,261	0,0615
-10	1,407	0,714	10,486	1,874	<b>0,0005</b>
-9	9,170	3,195	13,857	2,505	0,2676
-8	20,788	9,620	15,736	2,262	0,6171
-7	23,021	9,855	18,574	2,312	0,6671
-6	26,414	8,674	20,907	2,673	0,5537
-5	34,591	7,986	31,253	5,505	0,7358
-4	57,580	6,921	47,350	5,880	0,2789

As curvas concentração-resposta relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em corpos cavernosos de coelho são apresentadas na Figura 39. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 8 experimentos.

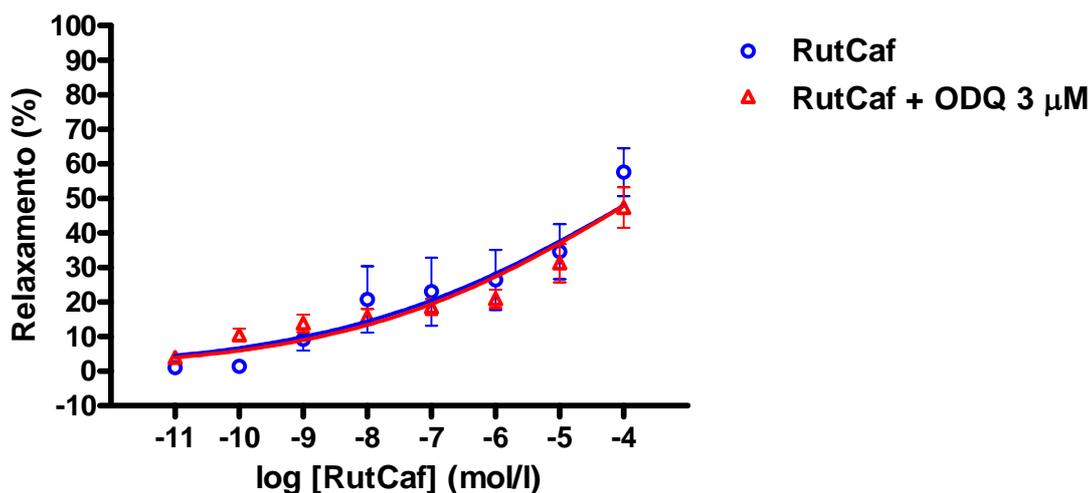


Figura 39 – Curvas concentração-respostas relativas ao relaxamento induzido por Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em corpos cavernosos de coelho. Dados relativos à realização de oito experimentos.

Os parâmetros  $\text{pEC}_{50}$  e  $E_{\text{max}}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em corpos cavernosos de coelho são mostrados na Tabela 29. Como demonstrado a dose de ODQ 3  $\mu\text{M}$  não induziu inibição no relaxamento provocado pela Rut-Caf.

TABELA 29 – Determinação dos parâmetros  $\text{pEC}_{50}$  e  $E_{\text{max}}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em corpos cavernosos de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf + ODQ 3 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>valor p</b>
$\text{pEC}_{50}$	4,234 $\pm$ 0,402	3,209 $\pm$ 0,370	<b>0,0904</b>
$E_{\text{max}}$	57,580 $\pm$ 6,921%	47,350 $\pm$ 5,880%	<b>0,2789</b>

### Anel de aorta: Rut-Caf *versus* Rut-Caf + ODQ 3 $\mu\text{M}$

Os efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$ ) são mostrados na Tabela 30. Dados expressos como média e erro padrão da média (EPM) das medições efetuadas em 6 experimentos.

Tabela 30 - Efeitos de diferentes concentrações de Rut-Caf em anel de aorta de coelho considerando a presença e ausência do inibidor ODQ 3  $\mu\text{M}$  (Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$ )

<i>log</i> [RutCaf]	<i>Rut-Caf</i>		<i>Rut-Caf + ODQ 3 <math>\mu\text{M}</math></i>		<i>valor p</i>
	Média	EPM	Média	EPM	
-11	6,170	1,780	0,926	0,926	<b>0,0259</b>
-10	6,077	1,817	4,278	3,633	0,6673
-9	5,539	2,051	8,073	5,322	0,6663
-8	1,111	1,111	11,611	6,889	0,1633
-7	1,111	1,111	15,353	7,485	0,0892
-6	1,649	1,133	18,354	9,383	0,1076
-5	34,985	4,724	54,606	8,664	0,0748
-4	71,640	6,631	73,983	7,685	0,8221

Os parâmetros pEC50 e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho são mostrados na Tabela 31. Como demonstrado a dose de ODQ 3  $\mu\text{M}$  não induziu inibição no relaxamento provocado pela Rut-Caf.

Tabela 31 – Determinação dos parâmetros pEC50 e  $E_{max}$  nos grupos Rut-Caf e Rut-Caf + ODQ 3  $\mu\text{M}$  em anel de aorta de coelho.

<b>Parâmetro</b>	<b>Rut-Caf</b>	<b>Rut-Caf + ODQ 3 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>valor p</b>
pEC50	4,569 $\pm$ 0,065	5,025 $\pm$ 0,177	0,0130
$E_{max}$	71,640 $\pm$ 6,631%	73,983 $\pm$ 7,685%	0,8221

#### **Anel de Aorta: GMPc**

Na figura 40 e na tabela 32 estão demonstrados os dados relativos à quantificação de GMPc liberado pelos agentes estudados em anel de aorta de coelho. Neste tecido a maior liberação de GMPc foi induzida por SNP, seguido por Rut-Caf e Rut-Bpy. Não houve diferença estatisticamente significante entre os agentes.

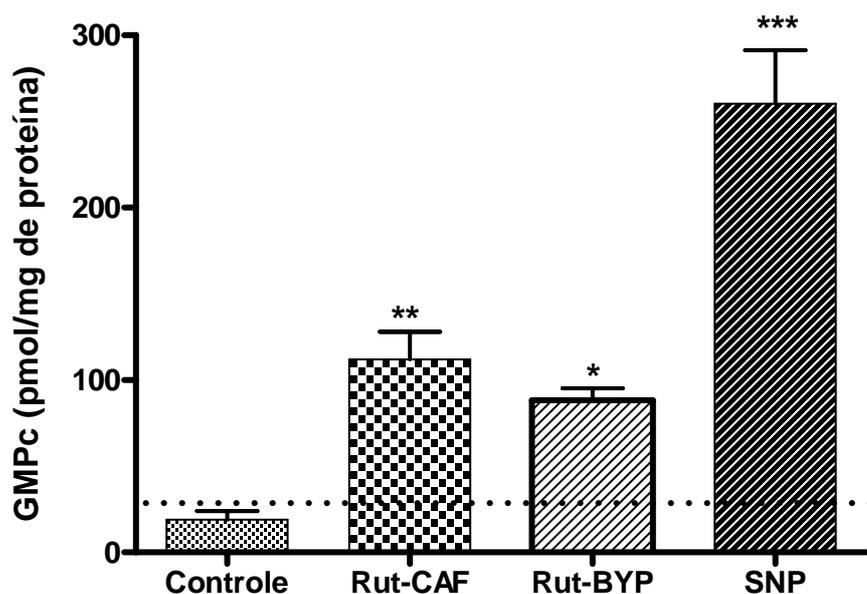


Figura 40 – Medidas de GMPc em anéis de aorta de coelho exposto a salina (controle), Rut-Caf 100 $\mu$ M, Rut-Bpy 100 $\mu$ M, ANP 1 $\mu$ M, SNP 3 $\mu$ M (doador de NO utilizado neste protocolo como controle positivo). Rut-Bpy:  $p < 0,05$ ; Rut-Caf:  $p < 0,01$ ; SNP:  $p < 0,001$  vs controle; N=4 (duplicata).

TABELA 32 - Dados relativos à liberação de GMPc em anel de aorta de coelho

<i>Parâmetro</i>	<i>Basal</i>	<i>Rut-Caf</i>	<i>Rut-Bpy</i>	<i>ANP</i>	<i>SNP</i>
Média	29,86435	112,0396	84,21498	49,42403	266,2945
Desvio padrão	11,13966	0	28,09485	8,620977	167,9754
Erro padrão da média	5,56983	0	14,04743	4,310489	83,98769

ANOVA:  $F = 5,218279$ ;  $P = 0,0099$

\*\*  $P < 0,01$ : SNP > Basal; \*  $P < 0,05$ : SNP > ANP (teste de Tukey).

### CORPO CAVERNOSO DE COELHO: GMPc

Na figura 41 e tabela 33 estão demonstrados dados relativos à liberação de GMPc em corpos cavernosos de coelho pelas substâncias estudadas. Em corpos cavernosos de coelho a maior liberação de GMPc foi provocada pela substância Rut-Bpy, seguida pela substância Rut-Caf e SNP. Não houve diferença estatisticamente significativa.

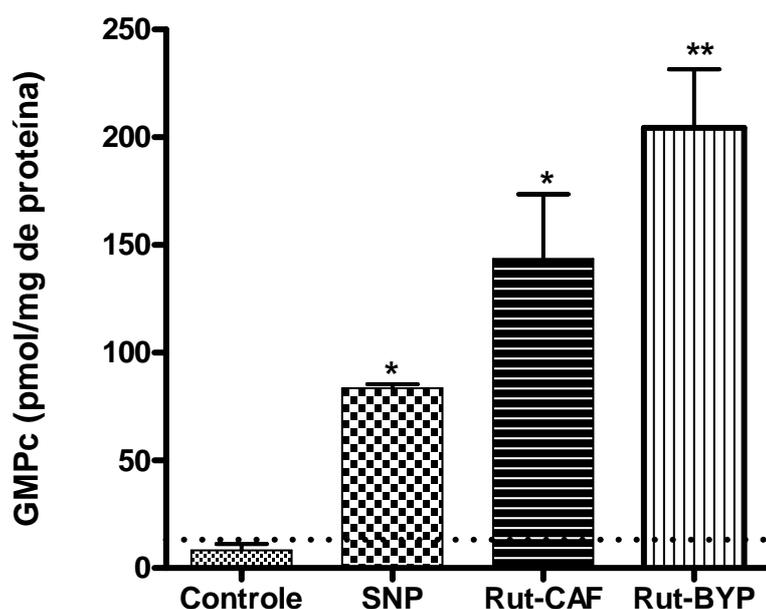


Figura 41 - Medidas de GMPc em corpos cavernosos de coelho exposto a salina (controle), Rut-Caf 100 $\mu$ M, Rut-Bpy 100 $\mu$ M, SNP 3 $\mu$ M (controle positivo). Rut-Caf e SNP:  $p < 0,05$ ; Rut-Bpy:  $p < 0,01$  vs controle. N=4 (duplicata).

TABELA 33 - Dados relativos à liberação de GMPc em corpo cavernoso de coelho

Parâmetro	Basal	Rut-Caf	Rut-Bpy	ANP	SNP
Média	8,262094	143,5236	204,4587	87,80543	43,58143
Desvio padrão	5,855401	158,0599	180,5431	78,74386	5,698577
Erro padrão da média	2,9277	49,98294	57,09275	24,901	1,802048

ANOVA: F = 1,901460; P = 0,1477

### AMPc- Anel de aorta de coelho

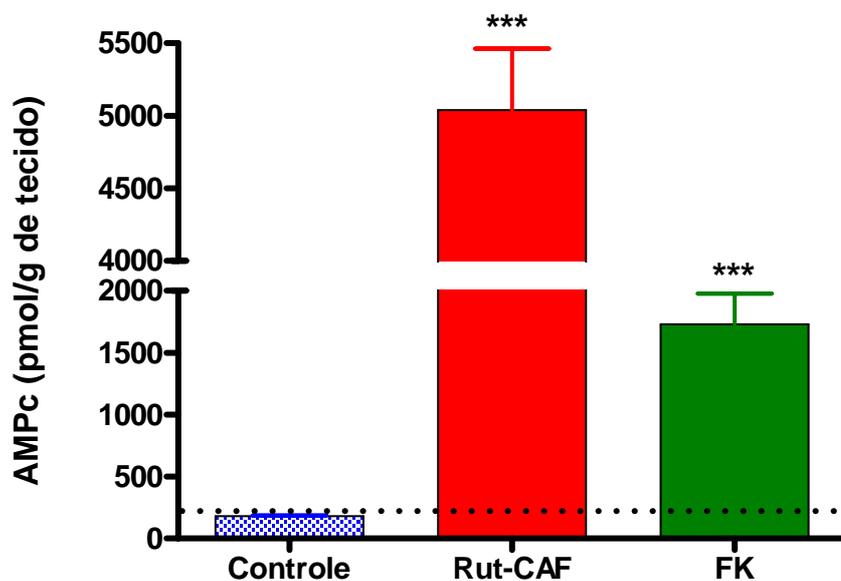


Figura 42- Medida de AMPc em anéis de aorta de coelho exposto a salina (controle), RUT-CAF (100  $\mu$ M) ou forskolina (10  $\mu$ M), um ativador de adenilato ciclase utilizado neste protocolo como controle positivo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. controle, ANOVA seguido de Tukey ( $n=4$  em duplicata). Os níveis de AMPc são expressos como média  $\pm$  SEM.

### AMPc- Corpo cavernoso de coelho

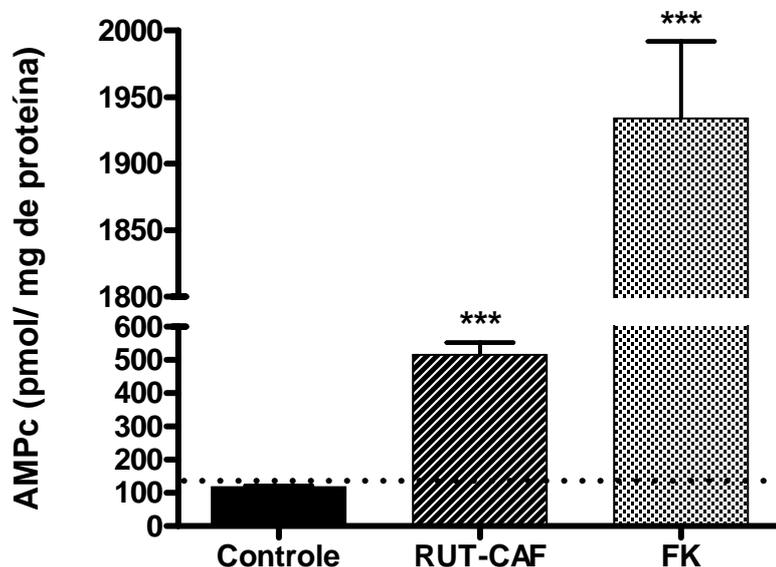


Figura 43. Medida de AMPc em tiras de corpo cavernoso de coelho exposto a salina (controle), RUT-CAF (100  $\mu$ M) ou forskolina (10  $\mu$ M), um ativador de adenilato ciclase utilizado neste protocolo como controle positivo. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. controle, ANOVA seguido de Tukey ( $n=4$  em duplicata). Os níveis de AMPc são expressos como média  $\pm$  SEM

## 5 DISCUSSÃO

A disfunção endotelial está presente em grande grupo de pacientes portadores de disfunção erétil e que exibem co-morbidades, como hipertensão arterial e diabetes. Esta síndrome caracteriza-se por uma deficiência na produção endógena de óxido nítrico (RENDELL *et al*, 1999). Cerca de 56% dos pacientes inscritos neste grupo apresentam resistência ao tratamento da disfunção erétil com os fármacos ora disponíveis no mercado, os inibidores da PDE-5. A pesquisa de novos fármacos que possibilitem aumento na disponibilidade do NO endógeno constitui desafio permanente. O óxido nítrico está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de vasos sanguíneos dependente do endotélio, comunicação química entre nervos periféricos e músculo liso e modificações na eficácia de sinapses no sistema nervoso central (ARNOLD *et al*, 1977). Em sua maior parte, os efeitos fisiológicos do óxido nítrico são mediados pela estimulação direta da guanilato ciclasesolúvel (GCs), que catalisa a formação de GMPc a partir do GTP (IGNARRO, 2002).

O presente estudo comparou os efeitos relaxantes de doadores de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio em corpos cavernosos e anéis de aorta de coelho com os mesmos efeitos induzidos pelo nitroprussiato de sódio. Após a pré-contracção com fenilefrina, todas as tiras de corpos cavernosos apresentaram contracção tônica, que superou em 100% a intensidade da contracção obtida quando em repouso. Isto demonstra a presença de receptores alfa-adrenérgicos nos tecidos estudados. Estes achados estão em concordância com estudos publicados que demonstraram a distribuição destes receptores em corpos cavernosos de coelho, semelhantes aos achados em corpos cavernosos humanos, o que justifica a utilização deste animal em pesquisas de novos agentes, relaxantes da musculatura lisa cavernosa (KAVA *et al*, 1998) ( Figura 17; Figura 18 ).

A adição dos agentes estudados aos banhos induziu relaxamento das tiras de tecidos de forma diretamente proporcional à concentração das doses administradas. O nitroprussiato de sódio alcançou a maior eficácia de relaxamento (100%); a substância Rut-Caf induziu relaxamento com potência e efeito semelhante ao do nitroprussiato (85%), demonstrando o potencial de

liberação de óxido nítrico desta substância e sua ação vasodilatadora (Figura 16) (Tabela 1).

Estudo utilizando o citrato de sildenafil no relaxamento de corpos cavernosos de coelho demonstra um efeito relaxante inferior a 30% na ausência de estímulo elétrico (CHUANG *et al*, 1998). Mesmo a substância Rut-Bpy, que não alcançou relaxamento estatisticamente significativo no presente ensaio, apresenta efeito relaxante de 35%, superior ao apresentado pelo citrato de sildenafil. Estes dados estão em concordância com outros estudos publicados, que mostram a dependência dos inibidores da PDE-5, da integridade endotelial e do estímulo neurogênico pré-sináptico para induzir relaxamento significativo. Sharabi *et al*, comparando o efeito de relaxamento do citrato de sildenafil com um doador de óxido nítrico, L-arginina, em corpos cavernosos de coelho, mostraram que, na ausência de estímulo elétrico, o citrato de sildenafil diminuía em cerca de 60% o tônus inicial induzido pela fenilefrina, e a L-arginina não conseguia reduzir em mais de 50%. De outra maneira o sildenafil potencializa o efeito do estímulo elétrico, reduzindo em 80% o tônus de contração inicial (SHARABI *et al*, 2004; TAKAGI *et al*, 2001). É importante ressaltar que o efeito relaxante induzido pela substância do presente estudo foi semelhante àquele produzido por outros doadores de óxido nítrico, como os componentes da classe dos tiois e superior a um precursor de óxido nítrico, como a L-arginina (SHARABI *et al*, 2004). Seidler *et al* (2002), estudando dois componentes da classe dos thiois em corpos cavernosos humanos, sem estímulo de campo elétrico, demonstrou que a substância S-nitroso-glutationa (GSNO) induz um relaxamento de 65% e a substância S-nitroso-N-acetilcisteína um relaxamento de 32%. . O relaxamento induzido pelo estímulo elétrico pré-sináptico foi potencializado pelo citrato de sildenafil e pelo nitrato de sildenafil, mas não pelos doadores de óxido nítrico do grupo dos thiois.

O presente estudo, avaliando o efeito relaxante da substância Rut-Caf, em corpos cavernosos humanos, evidenciou um potencial de relaxamento semelhante àquele verificado em corpos cavernosos de coelho. O relaxamento induzido pelo estímulo nitrérgico pré-sináptico não foi aumentado com a ativação pós-sináptica da enzima guanilatociclase solúvel (Figura 17; Figura 18 ). Esses dados confirmam que doadores de óxido nítrico atuam principalmente a nível pós-

sináptico, ativando a enzima guanilatociclase solúvel, enquanto inibidores da fosfodiesterase necessitam do estímulo neurogênico pré-sináptico. Uma substância que atuasse doando óxido nítrico e inibindo fosfodiesterase, como o agente objeto deste ensaio, poderia ter uma aplicação nas pesquisas que buscam novas substâncias para o tratamento oral da disfunção erétil. O relaxamento induzido pelas substâncias do presente estudo, utilizando o protocolo sem estímulo elétrico transmural, mimetiza com maior acurácia a situação *in vivo*, na qual o composto atua somente como um doador de NO suplementado pela ativação sinérgica da guanilatociclase solúvel. Esta situação é presenciada *in vivo* em pacientes portadores da disfunção endotelial, como os diabéticos e pacientes submetidos a prostatectomia radical, pois em razão do comprometimento da liberação nitrérgica pelas fibras nervosas, é importante uma fonte de NO para a ativação da CGs (SEIDLER *et al*, 2002).

Em corpos cavernosos, uma das substâncias, Rut-Bpy, não induziu relaxamento significativo. A outra substância, Rut-Caf, apresentou relaxamento semelhante àquele produzido pelo SNP, embora com Emax inferior ao relaxamento produzido no endotélio vascular de grandes vasos (Figura 16; Figura 21) (Tabela 1; Tabela 4). Isto pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de ação que substâncias doadoras de óxido nítrico apresentam em vasos de calibres diferentes. Como demonstrado por Sathishkumar *et al* (2005), doadores de NO da classe dos tiois como o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), atuam em vasos de grande calibre ou vasos de condutância vascular predominantemente por via de ativação da guanilato-ciclase solúvel. Já em vasos de pequeno calibre ou de resistência, como o leito vascular do corpo cavernoso, estas substâncias atuam também ativando canais de íon potássio, causando hiperpolarização celular, fosforilação de canais de íon cálcio e relaxamento celular. Neste mesmo estudo os autores demonstraram que, substâncias doadoras de NO atuam preferencialmente no relaxamento de vasos de condutância de grande e médio calibre. Nos vasos de resistência, como na musculatura lisa cavernosa, o relaxamento induzido é significativamente inferior.

Outro possível mecanismo de ação da Rut-Caf pode estar vinculada à inibição de fosfodiesterase pela cafeína, presente na estrutura desta substância, aumentando seus efeitos na musculatura lisa dos corpos cavernosos, em

contraste com Rut-Bpy, que não possui este composto na estrutura. Em vasos de condutância, pelo contrário, a cafeína atua como vasoconstritor. O efeito vasoconstritor da cafeína em vasos foi confirmado por estudo de meta-análise que demonstrou aumento médio de 2,04 mmHg na pressão sistólica de pacientes que ingeriram a substância regularmente, quando comparados aos grupos-controle (NOORDZIJ *et al*, 2005). Este fato explica a maior potência da substância Rut-Bpy, na aorta de coelho, quando comparada com a Rut-Caf. Por outro lado, estudo *in vitro* avaliando a contratilidade da musculatura lisa da vesícula biliar demonstrou que a cafeína aumentou os níveis de GMPc mediante inibição inespecífica de fosfodiesterases de 1 a 5, o que justifica a ação relaxante de agentes com cafeína na sua composição. (LINDMAN *et al*, 2002).

Em anéis de aorta, ambas as substâncias promoveram relaxamento com efeito máximo superior àquele induzido pelo SNP e com potência semelhante ( $pEC_{50}$ ), demonstrando que este grupo de agentes pode proporcionar maior disponibilidade endógena de NO do que o SNP (Figura 21) (Tabela 4). Resultados semelhantes na literatura foram apresentados por Bonaventura *et al* (2007), que estudaram substância também pertencente ao complexo nitrosil-rutênio, constatando um efeito máximo de 102% com  $pEC_{50}$  de  $6,61 \pm 0,09$ . Esses dados reforçam os achados do presente estudo, apresentando substâncias deste complexo como potentes vasodilatadores.

Woodman *et al* (2000), analisando o efeito relaxante de doadores de NO em aorta de ratos, demonstraram que, em vasos de condutância, o relaxamento é endotélio- dependente e mediado pelo NO. A remoção do endotélio aboliu completamente o relaxamento induzido pela acetilcolina, e a adição de doadores de NO aos banhos restabeleceu o relaxamento anterior, mesmo na ausência do endotélio (WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000).

Os resultados aqui apresentados, realizados com anéis de aorta após a remoção do endotélio, demonstraram que não houve alteração significativa do relaxamento induzido pelos agentes estudados. Na verdade, aconteceu um aumento do relaxamento após a remoção do endotélio (Tabela 17) (Figura 33). Isto pode ser explicado: quando existe integridade endotelial, a atividade basal envolve liberação de óxido nítrico, inibida pelo aumento intracelular do cálcio pelo estímulo adrenérgico (ANDERSON; WAGNER, 1995). Na ausência de endotélio,

ocorre somente o estímulo exógeno de NO, que não é submetido à inibição fisiológica. É importante também salientar que o endotélio produz efetores e mediadores responsáveis diretamente pelo tônus basal de contração da musculatura lisa cavernosa, como noradrenalina, endotelina e angiotensina e a remoção do endotélio inativa a ação destas substâncias aumentando assim o relaxamento induzido por substâncias doadoras de óxido nítrico. Os dados apresentados neste estudo confirmam que agentes do complexo nitrosil-rutênio são capazes de tornar disponível óxido nítrico, independentemente da integridade endotelial, e podem ser objeto de pesquisas para o tratamento da disfunção endotelial. Estes achados são corroborados por pesquisa semelhante, realizada por Bonaventura *et al* em anéis de aorta de rato, sem endotélio, com substâncias do complexo nitrosil-rutênio, na qual o agente estudado induziu relaxamento superior a 100% do tônus de contração inicial (BONAVENTURA *et al*, 2007).

Em hipocampo de ratos já restou demonstrado que a oxi-hemoglobina, um removedor inespecífico do NO extracelular, diminuía o efeito de compostos do grupo nitrosil-rutênio nos potenciais de ação gerados nesta região (WIERASZKO *et al*, 2001). *In vivo*, a oxi-hemoglobina reage com óxido nítrico, formando um complexo ferronitrosil-hemoglobina estável, que não disponibiliza óxido nítrico. Lopes *et al* (2001) demonstraram que o rutênio é capaz de controlar os níveis séricos circulantes de óxido nítrico por intermédio da modulação do seu potencial de redução, diminuindo assim a participação do NO em reações de óxido-redução e tornando o NO mais disponível para utilização tecidual. De Figueredo *et al* (2001) demonstraram que a reposição volumétrica com derivados sangüíneos pode aumentar a vasoconstrição em pacientes com hipertensão pulmonar e que a inalação de substâncias contendo óxido nítrico pode reverter esse efeito. Utilizando anéis de aorta de rato *Wistar* em sistemas de banhos isolados, esses autores observaram que a adição de oxi-hemoglobina aos banhos diminuía o efeito relaxante do nitroprussiato de sódio de forma dose-dependente. Os dados do presente estudo confirmaram os achados há pouco mencionados.

A oxi-hemoglobina, nas doses de 3 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, fez diminuir, de forma dose-dependente, o relaxamento induzido pelas substâncias Rut-Caf e Rut-Bpy em corpos cavernosos e anéis de aorta de coelho, porém de maneira diferente nos dois tecidos estudados. A inibição do relaxamento foi maior no endotélio

vascular aórtico do que nos corpos cavernosos com a substância Rut-Caf (100% x 42% ; 80% x 63%), e a substância Rut-Byp teve seu efeito relaxante no endotélio vascular praticamente abolido em doses máximas de oxi-hemoglobina (10 $\mu$ M) nos banhos (100% x 26%) (Figura 20; Figura 22; Figura 23) (Tabela 3; Tabela 5; Tabela 6).

Resultados semelhantes foram encontrados por Woodman *et al*, comparando, em vasos de condutância, aorta de rato, e, em vasos de resistência, leito mesentérico, o efeito inibitório da hemoglobina sobre o relaxamento induzido por substâncias doadoras de NO. Na aorta, o relaxamento induzido por acetilcolina e nitroprussiato de sódio era praticamente abolido pela adição, aos banhos, de hemoglobina e inibidores de síntese de óxido nítrico. Em vasos de resistência, a inibição do relaxamento não era significativa. Isto demonstra que o relaxamento de grandes vasos é totalmente dependente da ação do óxido nítrico ao contrário dos vasos de resistência, como o endotélio de corpos cavernosos, onde a ativação da guanilatociclase solúvel e o aumento intracelular de GMPc podem ativar a proteína-quinase dependente do GMPc, ativar canais de íon potássio, promovendo hiperpolarização celular e relaxamento (WOODMAN; WONGSAWATKUL; SOBEY, 2000). Indicadores há momentos apresentados permitem concluir que as substâncias aqui estudadas são capazes de induzir relaxamento, através da ação intracelular de óxido nítrico, e que a substância Rut-Byp parece atuar exclusivamente liberando NO enquanto a substância Rut-Caf parece ter, no tecido cavernoso, um mecanismo adicional de relaxamento, além de ativar a GCs. Como já discutido, provavelmente a cafeína presente nesta substância desempenhe papel inibidor sobre a ação de fosfodiesterases (LINDMAN *et al*, 2002) ou a substância atue em canais de íons presentes no tecido cavernoso, como canais de íon potássio ativados metabolicamente ou dependentes do cálcio(ANDERSON; WAGNER, 1995).

Estudando também compostos do complexo nitrosil-rutênio, embora de composição química distinta das substâncias deste estudo, Bonaventura *et al* demonstraram, com o mesmo método, utilizando anéis de aorta de rato, o perfil de liberação de óxido nítrico destas substâncias. Os autores observaram que a adição de oxi-hemoglobina aos banhos provocava diminuição da potência da substância estudada, sem, contudo, alterar seu efeito máximo,

confirmando os dados aqui apresentados que apontam a ação intracelular de doadores de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio (BONAVENTURA *et al.*, 2007).

Estudos de McDonald e Murad (1996) demonstraram que a ação do óxido nítrico ocorre mediante sua ligação ao sítio heme da enzima guanilatociclase solúvel, ativando esta enzima e catalizando a conversão de guanosina trifosfato para guanosina monofosfato cíclica, que diminui os níveis intracelulares do cálcio, provocando vasodilatação.

Recentemente, um inibidor específico do sítio heme da GCs, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-ona (ODQ), tem sido utilizado para determinar a especificidade da ativação da GCs por substâncias doadoras de óxido nítrico (BRUNNER *et al.*, 1996). No presente estudo, a adição de ODQ em altas concentrações (100 $\mu$ M) aos banhos aboliu totalmente o efeito relaxante das substâncias (dados não mostrados).

Feelish, Kotsonis e Siebe (1999), estudando a ação do inibidor da GCs em anéis de aorta de rato, observaram que o ODQ provoca inibição completa do relaxamento induzido por doadores de NO nestes tecidos na dose de 3 $\mu$ M, e que doses acima desta não induziam nenhum efeito adicional. Esses autores demonstraram que altas doses de ODQ (100 $\mu$ M a 300 $\mu$ M) podem inibir a via enzimática ligada ao citocromo P-450, evitando a bioativação de compostos doadores de óxido nítrico e impedindo seu efeito relaxante nos tecidos vasculares. Assim, a ausência de relaxamento descrita nesta pesquisa, utilizando altas doses de ODQ, poderia sugerir a ausência de bioativação dos agentes, além do bloqueio da produção de GMPc.

Para tentar caracterizar a ação dos agentes aqui analisados, na ativação da GCs e produção de cGMP, foram realizadas curvas de relaxamento com as substâncias em concentrações crescentes de ODQ (3 $\mu$ M; 10 $\mu$ M e 30 $\mu$ M). Apesar de o estudo de Feelish *et al.*, há pouco mencionado, apontar doses máximas de utilização do ODQ de 10 $\mu$ M, pode-se justificar a utilização de doses maiores no presente conjunto de ensaios pela diferença de tamanho dos animais utilizados nos estudos- coelho e rato, respectivamente.

Nas curvas realizadas nesta pesquisa, utilizando a dose de 3 $\mu$ M de ODQ não houve qualquer alteração no efeito relaxante induzido pelas substâncias

examinadas. Este dado sugere que, ao contrário da musculatura lisa vascular de ratos, onde esta dose provoca ausência de relaxamento, em coelhos, a dose de 3 $\mu$ M não é suficiente para provocar efeito farmacológico no bloqueio da GCs. Pode-se também argumentar que, apesar do bloqueio da produção de GMPc, substâncias doadoras de NO podem atuar diretamente em outros alvos terapêuticos como ativação direta de canais de íons (Figura 39) (Tabela 28; Tabela 29; Tabela 30; Tabela31).

Vários trabalhos, que utilizam a substância ODQ para avaliar o bloqueio da enzima guanilatociclase em banho de órgãos, demonstram que a adição de ODQ em doses adequadas tem como ação inicial a potencialização da contração induzida pela fenilefrina nos tecidos estudados (IRVINE, FAVALORO, KEMP-HARPER, 2003; WOODMAN *et al.*, 2000). No presente estudo, a adição de ODQ na dose de 3 $\mu$ M não causou aumento da contração secundária quando da aplicação de fenilefrina. Este resultado confirma a hipótese de que ODQ, na concentração de 3 $\mu$ M em corpos cavernosos e aorta de coelho, não deve ser utilizada, pois é desprovida de ação farmacológica (Figura 39) (Tabela 28; Tabela 29; Tabela 30; Tabela 31).

A utilização do bloqueador da enzima guanilatociclase solúvel, ODQ, na dose de 10 $\mu$ M, provocou redução significativa do relaxamento induzido pela substância estudada, tanto na musculatura lisa vascular da aorta do rato como na musculatura lisa do corpo cavernoso; e o aumento da dose de ODQ para 30 $\mu$ M não provocou nenhuma redução adicional. Estes dados demonstram que a utilização da dose de 10 $\mu$ M da substância ODQ é a ideal para caracterizar a inibição da enzima guanilatociclase solúvel, quando se utiliza o coelho como modelo animal, e que as substâncias estudadas agem principalmente pela ativação da enzima guanilatociclase solúvel (Tabela 22; Tabela 23; Tabela 24; Tabela 25; Tabela 26; Tabela 27) ( Figura 37; Figura 38).

Várias linhas independentes de investigação demonstraram que o tônus da musculatura lisa na vascularização sistêmica é, na sua maior parte, dependente do fluxo de cálcio transmembrana através dos canais de cálcio, principalmente os canais de cálcio de longa duração ativados por voltagem (canais de cálcio do tipo L). Mediante ação hiperpolarizante, vários subtipos de canais de potássio regulam o movimento intracelular do cálcio, modulando assim

o grau de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular (VENKATERSWARLU *et al*, 2002). A disposição dos canais de potássio na membrana celular varia de acordo com a espécie e o calibre do vaso estudado (ANDERSSON, WAGNER, 1995) e alguns trabalhos à disposição da comunidade científica divergem sobre o tipo de canal dominante em cada tecido. Lee e Kang (2001), estudando corpos cavernosos humanos, demonstraram por intermédio de estudos eletrofisiológicos uma dominância de canais de potássio de alta e média condutividade neste tecido. Utilizando o mesmo tecido e igual método, Venkaterswarlu *et al*. apontaram uma ação dominante dos canais de potássio ativados por ATP, com ação insignificante dos outros subtipos de canais de potássio (VENKATESWARLU *et al*, 2002).

Bolotina *et al* (1994) estudando a ação de substâncias doadoras de óxido nítrico na musculatura lisa da aorta de coelho, demonstrou que, após o bloqueio da guanilatociclase solúvel, o relaxamento tecidual remanescente era abolido por um agente bloqueador de canais de potássio de alta condutividade, a iberiotoxina. Os autores sugeriram que esta ação caracterizava a ativação direta de canais de potássio por substâncias doadoras de óxido nítrico.

Estudando a ação relaxante de agentes doadores de óxido nítrico em corpos cavernosos de coelho, André *et al* (2003), demonstraram que a adição de um bloqueador de canais de potássio ativados por ATP ( $K_{ATP}$ ), a glibenclamida, aumentava o tônus basal induzido pela fenilefrina de maneira não significativa. Por outro lado, não interferia na intensidade do relaxamento provocado por agentes como o nitroprussiato de sódio. No mesmo trabalho, esses pesquisadores demonstraram que os bloqueadores de canais de potássio de alta, média e baixa condutividade, ativados pelo cálcio ( $K_{CA}$ ), iberiotoxina e apamina, não alteravam o tônus basal nem a intensidade do relaxamento induzido pelas substâncias estudadas.

Os resultados da presente pesquisa com agentes doadores de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio, em corpos cavernosos de coelho, não evidenciaram qualquer alteração no efeito máximo ( $E_{max}$ ) e potência das substâncias, quando bloqueadores de canais de potássio de alta, média e baixa condutividade foram adicionados aos banhos (Tabelas 10; Tabela 11 ) (Figura 27;

Figura 28). Quando o bloqueador de canais de potássio ATP-dependente, glibenclamida, foi adicionado aos banhos, não houve alteração do efeito máximo de relaxamento ( $E_{max} = 100\%$ ), mas houve aumento estatisticamente significativo da eficácia do agente estudado ( $pEC_{50} 4,04 \times 7,68$ ,  $p < 0,05$ ). (Tabela 8; Tabela 9) (Figuras 25; Figura 26).

A provável explicação para este fenômeno decorre do fato de a glibenclamida, além de bloqueador de canais de potássio ATP-dependentes, também atuar como bloqueador de canais de cloreto sensíveis ao cálcio, que funcionam como canais retificadores na membrana celular, facilitadores da contração da musculatura lisa vascular (JACKSON, 2000). O bloqueio dos canais de potássio ATP-dependentes e dos canais de cloreto pela glibenclamida, tornaria a conformação dos canais de cálcio tipo L mais suscetível à ação do GMPc, o que provocaria fosforilação destes canais, com diminuição do influxo intracitoplasmático de cálcio, facilitando o relaxamento muscular provocado pela substância Rut-Caf.

Esta mesma ação não foi observada em anéis de aorta, o que reforça achados publicados na literatura acerca do papel do fator hiperpolarizante de relaxamento do endotélio na musculatura lisa vascular dos vasos de resistência, ao contrário dos vasos de condutância nos quais o fator de relaxamento derivado do endotélio (NO-GMPc) desempenha papel preponderante (WOODMAN, WONGSAWATKUL, SOBEY, 2000) (Tabela 12; Tabela 13) (Figura 29; Figura 30). Reforçando os achados acima, também não houve alteração no relaxamento induzido pela substância Rut-Caf, quando inibidores de canais de potássio de alta, média e baixa condutividade foram avaliados em anéis de aorta de coelho (Tabela 14; Tabela 15) (Figura 31; Figura 32).

Os resultados da presente pesquisa e do último estudo relatado sugerem que, em corpos cavernosos de coelho, apesar de os subtipos de canais de potássio estudados desempenharem ação importante na manutenção do tônus basal (ANDERSON; WAGNER, 1995), não participam do mecanismo de relaxamento dos agentes estudados. Uma limitação do presente estudo diz respeito à não-realização de métodos eletrofisiológicos em cultura de células (*patch clamp*) para mensurar objetivamente as correntes de potássio geradas com

a adição das substâncias avaliadas neste estudo (CHRIST , 2000) (BOLOTINA *et al*, 1994).

Mesmo não atuando nos canais de íons estudados, os agentes desta pesquisa demonstraram ser potentes vasodilatadores e ativadores da enzima guanilato- ciclase solúvel nos estudos *in vitro*. Isto sugere outro mecanismo de ação para estas substâncias. Cellek (2000), avaliando agentes doadores de NO em corpos cavernosos de humanos e coelhos bem como no músculo proctococcígeo de coelho, demonstrou que a ação destas substâncias se faz pela ativação da GCs e produção de GMPc e não por ação direta em canais de íons e, a chave para a ação referida anteriormente, é o movimento intracelular de cálcio. Lee e Kang (2001) sugeriram que a produção de GMPc provoca a ativação da proteína quinase específica do GMPc (PKG) e esta enzima atua 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 provoca relaxamento celular. Os achados acima também foram confirmados por Höppner *et al* (1996). Em estudo clássico, utilizando corpos cavernosos de coelho, estes autores demonstraram que a aplicação de um bloqueador de canais de cálcio tipo-L, nifedipina, suprimia totalmente a atividade elétrica basal da musculatura lisa cavernosa e, a aplicação de um bloqueador inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio, aumentava a probabilidade de abertura de canais de cálcio tipo-L, voltagem dependente. Desta maneira, os resultados aqui apresentados podem indicar uma ação dos compostos do complexo nitrosil-rutênio em canais de íons diferentes daqueles aqui estudados, e esta ação é dependente da ativação da enzima guanilatociclase solúvel, produção de GMPc e da ação da proteína quinase específica do GMPc (PKG) em canais de cálcio tipo-L.

Outro estudo, que corrobora os resultados aqui apresentados, foi realizado por Bonaventura *et al*. (2007), em anéis de aorta de rato, utilizando agentes doadores de NO do complexo nitrosil-rutênio. Os autores demonstraram que a adição de um inibidor inespecífico de canais de potássio, tetraetilamônio, não interfere significativamente no relaxamento induzido pelas substâncias, porém a utilização do inibidor da enzima GCs, ODQ, junto com o tetraetilamônio, reduz significativamente a intensidade e a potência do relaxamento. Esses

achados confirmam o fato de que doadores de NO atuam primariamente, ativando a enzima GCs e produzindo GMPc no plano intracelular em vez de atuarem diretamente na ativação de canais de íons.

Avaliando substâncias doadoras de óxido nítrico, Tseng *et al.*, demonstraram que essas substâncias, durante o relaxamento, podem atuar por meio da liberação de vários agentes. O nitroprussiato de sódio e os doadores de óxido nítrico do grupo dos tiois atuam mediante a liberação do cátion nitroso ( $\text{NO}^+$ ). Outros doadores de NO podem atuar por meio do ânion nitroxil ( $\text{NO}^-$ ), do radical livre do óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ) e apenas mediante o óxido nítrico. Como demonstraram Tseng *et al.* (2000), a potência e o efeito máximo de relaxamento está relacionada com o tipo de substância liberada. Assim as substâncias que atuam via cation nitroso, óxido nítrico e ânion nitroxil, ou conjuntamente, são as que apresentam maior potência, ao passo que as de menor potência são as que atuam pela doação do radical livre do óxido nítrico. (TSENG, TABRIZI-FARD, FUNG, 2000). Avaliando compostos do grupo nitrosil-rutênio, Bonaventura *et al.* demonstraram a atuação destes compostos mediante doação do radical livre do óxido nítrico e do ânion nitroxil, o que provocava maior concentração de GMPc intracelular, induzindo um relaxamento superior àquele induzido pelo nitroprussiato, que liberava apenas a forma de radical livre.

Neste estudo, utilizando um removedor específico do ânion nitroxil, L-cisteína, a potência e o efeito máximo das substâncias estudadas não foram alterados significativamente nos dois tecidos apreciados, embora tenha sido potencializado o efeito relaxante e em anéis de aorta houve um aumento significativo da potência da substância Rut-Caf. (Figura 19; Figura 24) (Tabela 2; Tabela 7). Conclui-se que, apesar de pertencerem a grupos semelhantes às substâncias estudadas por Bonaventura, Rut-Caf e Rut-Bpy não promovem liberação do ânion nitroxil no seu mecanismo de relaxamento. Em recente revisão sobre o papel do óxido nítrico no relaxamento vascular, Ignarro chamou a atenção para o papel de substâncias do grupo dos tiois, como a cisteína, na potencialização da ativação da enzima GCs na presença de substâncias doadoras de óxido nítrico. Os tiois estabilizam a liberação de óxido nítrico, formando com este um composto estável e mais potente que o peroxinitrito, O S-nitroso-cisteína, impedindo a ligação entre NO e o ânion superóxido para formar

peroxinitrito, aumentando assim a quantidade de NO disponível para ativação da enzima GCs (IGNARRO, 2002). Os resultados desta pesquisa mostraram que os agentes estudados não liberam o ânion nitroxil e apresentaram potencialização do seu efeito relaxante e aumento significativo da potência da substância Rut-Caf, pela adição de L-cisteína, provavelmente em decorrência do fenômeno explicado há pouco.

Para caracterizar qual substância é liberada pelos agentes estudados no processo de relaxamento, um removedor do radical livre do óxido nítrico, hidroxicoalamina, foi adicionado aos banhos. Tanto no endotélio vascular de anéis de aorta como do endotélio dos corpos cavernosos, houve redução significativa do efeito máximo das substâncias e diminuição acentuada da sua potência. O efeito observado, com a adição da hidroxicoalamina aos banhos, caracteriza a liberação do radical livre do óxido nítrico no processo de relaxamento, induzido pelos agentes aqui estudados. (Tabela 18; Tabela 19; Tabela 20; Tabela 21 ) (Figura 34; Figura 35).

Tseng *et al.* demonstraram que substâncias agentes por meio do radical livre do óxido nítrico podem, durante o relaxamento, ser objeto de redução para a forma de ânion nitroxil, potencializando, assim, sua ação. Tal não acontece com os agentes do presente estudo. Como foi discutido, a adição da L-cisteína (removedor do ânion nitroxil) aos banhos, não alterou a potência de relaxamento das substâncias estudadas. Contrariando os dados apresentados por Tseng *et al.*, os agentes aqui examinados, conquanto não ajam somente por meio do radical livre do óxido nítrico, apresentaram potência e efeito máximo semelhantes a outras substâncias doadoras de óxido nítrico, como o SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), SNAG (S-nitrosoglutatona), derivados dos thiois e potentes vasodilatadores (TSENG, TABRIZI-FARD, FUNG, 2000). Como demonstrado por Lopes *et al.* (2001), isto pode ser explicado pelas propriedades químicas destes agentes, pois o rutênio, modulando o potencial de redução do óxido nítrico, impede sua participação em reações de óxido-redução e disponibiliza maior quantidade de óxido nítrico para atuar na ativação da enzima guanilatociclase solúvel.

Um procedimento importante para a conclusão do presente estudo foi a quantificação de GMPc produzido pelas substâncias no processo de relaxamento.

No meio intracelular o GMPc não tem por ação exclusiva sua atuação no processo de relaxamento da musculatura lisa, pode também atuar na inibição da adesão e agregação de plaquetas e monócitos, inibição da proliferação do músculo liso e proteção contra a aterogênese. Assim a quantidade de GMPc produzido por uma substância pode não ter relação direta com a intensidade de relaxamento muscular provocado pela mesma (KATSUKI *et al*, 1977).

Seidler *et al* (2002), estudando três substâncias doadoras de NO em corpos cavernosos humanos demonstrou que a substância NCX 911(nitrato de sildenafil) era o agente que provocava a menor inibição, no tônus basal adrenérgico destes tecidos, em comparação com o SNP e o GNSO. No entanto o agente NCX 911 era responsável pela maior quantidade de GMPc produzido em corpos cavernosos humanos. O mesmo fenômeno acontecia com as substâncias GNSO e SNACET, cuja produção de GMPc não correspondia ao efeito de relaxamento verificado *in vitro*, classificado pelos autores como medíocre.

Os dados citados há pouco estão em concordância com os achados do presente estudo. Em corpos cavernosos de coelho, a substância que apresentou menor efeito relaxante, Rut-Bpy, foi a que provocou maior produção de GMPc. A explicação para este fato deve-se à distribuição do GMPc no meio intracelular, atuando em vários compartimentos, e em alguns tecidos provoca alterações mínimas no cálcio intracelular e na tensão da musculatura lisa (Figura 16; Figura 41) (Tabela 1; Tabela 33).

Ainda confirmando os dados citados anteriormente, a substância que menos produziu GMPc em RbCC, o SNP, foi aquela que induziu a maior intensidade de relaxamento. Como foi demonstrado por Bolotina *et al* (1994), o SNP pode atuar também ativando diretamente canais de íon potássio, além de ativar a enzima GCs, o que produz um mecanismo alternativo e adicional no processo de relaxamento da musculatura lisa.

Os resultados apresentados neste estudo também mostram que a substância Rut-Caf, apesar de produzir menos GMPc que o agente Rut-Bpy em corpos cavernosos de coelho, provoca um relaxamento significativamente superior. Este fato pode ser explicado pela presença da cafeína na substância Rut-Caf que atua como inibidor inespecífico de enzimas fosfodiesterases(LINDMAN *et al*, 2002).

Sathishkumar *et al* (2005) estudando substâncias doadoras de NO em vasos de grande, pequeno e médio calibre, demonstrou que estes agentes apresentam um poder de relaxamento superior em vasos de condutância quando comparados com vasos de resistência, e esta ação, é induzida principalmente através da ativação da enzima GCs e da produção de GMPc. Bonaventura *et al* (2007) avaliando o efeito de compostos do rutênio em anel de aorta de rato concluiu que a produção de GMPc é proporcional ao efeito relaxante. Os dados do presente estudo confirmam os achados citados anteriormente. Em anéis de aorta de coelho apesar das substâncias Rut-Caf e Rut-Bpy terem produzido menos GMPc que em RbCC, o efeito relaxante foi significativamente superior, mostrando que em vasos de grande calibre a ação principal do GMPc consiste no relaxamento da musculatura lisa vascular (Figura 40; Figura 21) (Tabela 4; Tabela 32).

Outro achado interessante do presente estudo foi a expressão de AMPc induzido pelo agente Rut-Caf tanto em tiras de corpos cavernosos de coelho como em anéis de aorta. Este achado pode sugerir uma interação entre os sistemas de sinalização GMPc e AMPc no relaxamento da musculatura lisa vascular (Figura 42; Figura 43).

Resultados semelhantes foram obtidos por Uckert *et al* (2004) quando demonstrou que, o relaxamento provocado por inibidores da PDE-5 (sildenafil e vardenafil), em tiras de corpos cavernosos humanos, era revertido por agentes que inibiam tanto a proteína quinase específica do GMPc (PKG) como por inibidores da proteína do AMPc (PKA). Estes mesmos autores identificaram, em corpos cavernosos humanos, através de imunoreatividade, a presença de fosfodiesterases específicas para o AMPc.

No presente estudo a substância Rut-Caf logrou produzir uma quantidade maior de AMPc do que de GMPc em corpos cavernosos, isto sugere que o nucleotídeo GMPc pode atuar com regulador de PDEs específicas do AMPc, aumentando a produção deste nucleotídeo ou que a cafeína presente na estrutura da Rut-Caf atua inibindo PDEs que regulam a produção de AMPc.

Os resultados do presente estudo e o citado anteriormente, sugerem a realização de pesquisas que melhor avaliem a interação entre os

sistemas de sinalização celular GMPc-AMPc no relaxamento da musculatura lisa vascular e seu provável potencial terapêutico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As substâncias do complexo nitrosil-rutênio (Rut-Bpy e Rut-Caf) avaliadas nesta pesquisa, demonstraram possuir potente ação vasodilatadora *in vitro* na musculatura lisa de aorta de coelho, mesmo na ausência do endotélio. Todavia, apenas a substância Rut-Caf apresentou relaxamento na musculatura lisa de corpos cavernosos de coelho e humanos. Isto pode ser secundário a fosforilação de canais de íon cálcio tipo-L ou, à presença da cafeína na estrutura da substância Rut-Caf que pode agir através da inibição de fosfodiesterases, potencializando o efeito relaxante da substância estudada. As substâncias agem no sistema de sinalização celular NO-GMPc através da ativação da enzima guanilatociclase solúvel e produção de GMPc, que é maior em RbCC que em anéis de aorta. Durante o processo de relaxamento as substâncias atuam liberando o radical livre do óxido nítrico, mas, não agem através do ânion nitrosil. Não foi demonstrada nenhuma ação das substâncias na ativação de canais de íon potássio dependentes de ATP e de Cálcio.

Os resultados desta pesquisa demonstram a possibilidade de estudos adicionais para avaliar mecanismos de ação da substância Rut-Caf em corpos cavernosos humanos e sua ação no movimento intracelular do cálcio. Outra possibilidade é a utilização de modelos animais com disfunção endotelial, ratos diabéticos, para avaliar a potência da substância Rut-Caf nesta situação clínica.

A produção de AMPc pela substância Rut-Caf sugere uma interação entre os sistemas de sinalização celular GMPc-AMPc, no relaxamento da musculatura lisa vascular, e estudos adicionais poderiam ser realizados para melhor definir este mecanismo.

Os estudos sugeridos podem indicar prováveis aplicações clínicas, no futuro, de substâncias doadoras de óxido nítrico do complexo nitrosil-rutênio.

## 6. CONCLUSÕES

1- As substâncias do complexo nitrosil-rutênio, Rut-Caf e Rut-Bpy, atuam *in vitro*, como potentes vasodilatadores.

2- A substância Rut-Caf possui também uma ação relaxante na musculatura lisa de corpos cavernosos de coelhos.

3- Os agentes atuam liberando óxido nítrico a nível intracelular.

4- As substâncias atuam no sistema de sinalização celular NO-GMPc, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel e produzindo GMPc.

5- No processo de relaxamento os agentes atuam liberando o radical livre do óxido nítrico, mas não o ânion nitroxil.

6- Não ocorre ativação direta de canais de íons potássio durante o processo de relaxamento provocado por estas substâncias.

7- O estímulo neurogênico présináptico não potencializa o relaxamento, *in vitro*, induzido pelas substâncias estudadas.

8- Os agentes estudados atuam no processo de relaxamento, independentemente da integridade endotelial.

9- As substâncias produzem GMPc nos dois tecidos estudados.

10- A substância Rut-Caf produz AMPc nos dois tecidos estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ANDERSSON, K-. E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. **J. Urol.**, v. 170, p. 6-14, 2003.

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

ANDRÉ, E.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Role of nitric oxide and  $K^+$  channels in relaxation induced by polygodial in rabbit corpus cavernosum in vitro. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, p. 300-306, 2003.

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

BALLARD, S. A.; GINGELL, C. J.; TANG, K.; TURNER, L. A.; PRICE, M. E.; NAYLOR, A. M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **J. Urol.**, v.159, p.2164-2171, 1998.

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

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

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **NATURE.**, v. 368, p. 850-853, 1994.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-biding. **Anal Bioquem.**, v. 72, p. 248-254, 1976

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

BRODERICK, G., A., AND LUE, T., F. Evaluation and Non Surgical Management of Erectile Dysfunction. In: **Campbell's Urology**. Eighth Edition. Ed: W. B. Saunders, cap.45, v.2, 2002.

BRUNNER, F.; SCHMIDT, K.; NIELSEN, E. B.; MEYER, B. Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.277, p. 48-53, 1996.

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

CAMPOS, A. R.; LIMA, R. C.; UCHOA, D. E.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Pro erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma Ulei* root bark in mice. **J. Ethnopharmacol.** v. 104, n. ½, p. 240-244, Mar. 2006.

CELLEK, S. Nitrergic-noradrenergic interaction in penile erection: a new insight into erectile dysfunction. **Drugs Today**. v. 36, p. 135-146, Feb. 2000

CHUANG, A. T.; STRAUSS, J. D.; MURPHY, R. A.; STEERS, W. D. Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. **J. Urol.**, v. 160, n. 1, p. 257-261, 1998.

CHEN, J.; WOLLMAN, Y.; CHERNICHOVSKY, T.; IAINA, A.; SOFER, M.; MATZKIN, H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-Arginine in men with organic erectile dysfunction: Results of a double-blind, randomized, placebo, controlled study. **BJU Int.**, v.83, n. 3, p.269-273, Feb. 1999.

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

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

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H.; WEBB, D. J. Phosphodiesterase Type 5 as a Pharmacologic Target in Erectile Dysfunction. **Urology**, v. 60, Suppl. 2b, p. 4-11, 2002.

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

DANJOU, P.; ALEXANDRE, L.; WAROT, D.; LACOMBLEZ, L.; PUECH, A. J. Assessment of erectogenic properties of apomorphine and yohimbine in men. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 26, n. 6, p. 733-739, Dec.1988.

DE FIGUEREDO, L. F.; NELSON, S. H.; MATHRU, M.; SILVA, M. R.; KRAMER, G. C. Effects of hemoglobin-based blood substitutes on vasoactivity of rat aortic rings. **Artif. Organs**, v. 25, p. 928-933, 2001.

FEELISH, M.; KOTSONIS, P.; SIEBE, J. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1-H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxaline 1-one is a non selective haem protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 243-253, 1999.

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

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

GOLDSTEIN, I.; LUE, T. F.; PADMA-NATHAN, H.; ROSEN, R. C.; STEERS, W. D.; WICKER, P. A. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. sildenafil study group. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 20, p.1397-1404, May 1998.

HEDLUND, H.; ANDERSSON, K. Comparison of the responses to drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. **J. Auton. Pharmacol.**, v. 5, p. 81-88, 1985.

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

HOBBS, A. J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 484-491, 1997.

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

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

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

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO-Activates soluble guanylate cyclase and kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-182, 2000.

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

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J Cyclic Nucleotide Res**, v. 3, p.23-35, 1977.

KAVA, M. S.; BLUE, D. R.; VIMONT, R. L.; CLARKE, D. E.; FORD, A. P. D. W.  $\alpha_{1L}$ - adrenoceptor mediation of smooth muscle contraction in rabbit bladder neck: a model for lower urinary tract tissues in man. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p.1359-1366, 1998.

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

KURZROK, R.; LIEB, C. C. Bioquematical studies of human semen: The action of semen on the human uterus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 28, p. 268, 1930.

LAU, L. C.; ADAIKAN, P. G. Effect of sildenafil and rolipram on adrenergic responses in isolated human and monkey corpus cavernosum. **Eur. Urol.**, v. 52, p. 253-260, 2007.

LEE, S. W.; KANG, T. M. Effects of nitric oxide on the  $Ca^{2+}$  -activated potassium channels in smooth muscle cells of the human corpus cavernosum. **Urol. Res.**, v. 29, p. 359-365, 2001.

LINDMAN, B. A.; HINKHOUSE, M. M.. CONKLIN, J. L.; CULLEN, J. J. The effect of phosphodiesterase inhibition on gallbladder motility in vitro. **J. Surg. Res.**, v. 105, p. 102-108, 2002.

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

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

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

MACHTENS, S.; UCKERT, S.; STIEF, C.; G.; TSIKAS, D.; FRLICH, J.; C.; JONAS, U. Effects of various nitric-oxide donors on adrenergic tension of human seminal vesicles in vitro. **Urology**, v. 61, p. 479-485, 2003.

MANDREK, K. Electrophysiological methods in smooth-muscle physiology: corpus cavernosum in vitro. **World. J. Urol.**, v.12, p.262-265, 1994.

MCDONALD, L. J ; MURAD, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 211, p. 1-6, 1996.

MONTORSI, F.; STRAMBI, L. F.; GUAZZONI, G.; GALLI, L.; BARBIERI, L.; RIGATTI, P.; PIZZINI, G.; MIANI, A. Effect of yohimbine trazodone on psychogenic impotence: A randomized, double-blind, placebo, controlled study. **Urology**, v. 44, n. 5, p. 732-736, Nov. 1994.

MORALES, A.; CONDRA, M.; OWEN, J. A.; SURRIDGE, D. H.; FENEMORE, J.; HARRIS, C. Is yohimbine effective in the treatment of organic impotence? Results of a controlled trial. **J. Urol.**, v. 137, n. 6, p. 1168-1172, June 1987.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting.** San Diego: Graphpad Software Inc., 2003. 351 p.

MULHALL, J. P.; DALLER, M.; ABDULMAGED, M.; GUPTA, S. Intracavernosal Forskolin: role in management of vasculogenic impotence. **J. Urol.**, v. 158, p.1752-1758, 1997.

MULHALL, J. P.; MONTORSI, F. Evaluating Preference trials of Oral Phosphodiesterase 5 Inhibitors for Erectile Dysfunction. **Eur. Urol.**, v. 49, n. 1, p. 30-37, 2006.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**, v. 270, n. 1, p. 83-90, July 1993.

NOORDZIJ, M.; UITERWAAL, C. S.; ARENDS, L. R.; KOK, F. J.; GROBBEE, D. E.; GELEIJNSE, J. M. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Hypertens.**, v. 23, n. 5, p. 921-928, 2005.

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

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

RENDELL, M. S.; RAJFER, J.; WICKER, P. A.; SMITH, M. D. Sildenafil for the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. **JAMA**, v. 281, p. 421-425, 1999.

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

SEFTEL, A. D.; ALTHOF, S. E. Rapid ejaculation. **Sex Dysfunct. Med.**, v. 2, p.10-13, 2000.

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

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

STACKL, W.; HASUN, R.; MARBERGER, M. Intracavernous Injection of Prostaglandin E1 in Impotent Men. **J. Urol.**, v. 140, p. 66-68, 1988.

TAKAGI, M.; MOCHIDA, H.; NOTO, T.; YANO, K.; INOUE, H.; IKEO, T.; KIKKAWA, K. Pharmacological profile of T-1032, a novel specific phosphodiesterase type 5 inhibitor, in isolated rat aorta and rabbit corpus cavernosum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 411, p. 161-168, 2001.

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

TSENG, C-H., L.; TABRIZI-FARD, M., A.; FUNG, H-L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, p. 737-742, 2000.

ÜCKERT, C.; HEDLUND, P.; WALDKIRCH, E.; SOHN, M.; JONAS, U.; ANDERSSON, KE.; STIEF, CG. Interactions between cGMP- and cAMP-pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. **World J Urol.**; v.4, p. 261-266, 2004.

UPRIMA, TAP HOLDINGS, INC, 1996, (Data on file).

VANE, J. R. Técnica da superfusão em cascata para estudo de substâncias ativas endógenas. **Br. J. Pharmacol.**, v. 35, p. 209-242, 1969.

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

WANG, P.; WU, P.; MYERS, J. G.; STAMFORD, A.; EGAN, R. W.; BILLAH, M. M. Characterization of human, dog and rabbit corpus cavernosum type 5 phosphodiesterases. **Life Sci**, v. 68, p.1977-1987, 2001.

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

WOODMAN, O. L.; WONGSAWATKUL, O.; SOBEY, C. G. Contribution of Nitric Oxide, cyclic GMP and K<sup>+</sup> channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 27, p. 34-40, 2000.

ZORNIOTTI, A. W. Experience with bucal phentolamine mesylate for impotence. **Int. J. Impot. Res.**, v. 6, p. 37-41, 1994.

## ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA GERAL**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

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

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

Testemunhas:

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

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

\_\_\_\_\_  
 Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira  
 Prof. Urologia, Universidade Federal

## APÊNDICE 1

### Síntese do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ <sup>[117]</sup>

2,0 g de  $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  foram dissolvidos em 27,0 mL de água. Adicionou-se cuidadosamente 26 mL de hidrato de hidrazina ( $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) sob agitação e banho de gelo. A mistura permaneceu reagindo por 6 horas e, em seguida, adicionou-se HCl concentrado (50,0 mL) em banho de gelo. A mistura foi refluxada por 2 horas, ocorrendo a formação de um precipitado amarelo. A mistura foi resfriada, o sólido filtrado e lavado diversas vezes com HCl 1,5 mol/L gelado.

Recristalização: O sólido foi dissolvido em 200,0 mL de HCl 0,1 mol/L a quente (50-60°C). A solução foi filtrada a quente após completa dissolução e o sólido reprecipitado pela adição de excesso de HCl concentrado à solução, ainda a quente, em banho de gelo. O sólido amarelo foi filtrado, seco à vácuo ao abrigo da luz e lavado com etanol gelado.

### Síntese dos íons complexos do tipo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{L})\text{Cl}]^+$ , onde $\text{L}=\text{ImK}^2$ , caf ou teo coordenados através do átomo de C do imidazol <sup>[118-120]</sup>.

300 mg de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$  foram dissolvidos em 30 mL de HCl 0,05M previamente deaerado, juntamente com 204 mg de Imidazol, 600 mg de cafeína ou 620 mg de teofileno, conforme o composto desejado. O composto foi reduzido anaerobicamente com amálgama de Zn/Hg, durante 4 horas. Transferiu-se a solução, ainda em atmosfera inerte, para um balão de fundo redondo contendo 200 mL de HCl 0,02 M, deixando reagir ainda durante 6 horas, quando o composto foi submetido à oxidação borbulhando-se gás oxigênio durante 2 horas. Acrescentou-se, então, 30mL de HCl 8,5 mol/L e em seguida colocou-se na geladeira por 24 horas, quando filtrou-se o excesso de  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ . Obteve-se uma mistura dos compostos com L coordenado via N e C do anel imidazólico. O produto desejado foi separado utilizando-se uma coluna de troca iônica Dowex 50x2-400.

## APÊNDICE 2

### Solução de Krebs- Henseleit

<b>pH</b>	<b>7,4</b>
NaCl	118,00mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,00mM
KCl	4,70mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,20mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,17mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,50mM
Glicose	5,60mM

## APÊNDICE 3

### Material cirúrgico utilizado nos experimentos

<b>2 pinças prensão tipo mosquito</b>	<b>Edlo, Brasil</b>
<b>2 pinças anatômicas tipo Addison</b>	<b>Edlo, Brasil</b>
<b>1 tesoura oftálmica</b>	<b>Edlo, Brasil</b>
<b>2 placas de Petri</b>	
<b>1 lupa microcirúrgica</b>	<b>Design for Vision, 2,5x, EUA</b>
<b>Fios de algodão 3.0</b>	<b>Ethicon, Brasil</b>

## APÊNDICE 4

### Material de laboratório utilizado nos experimentos

<b>Agitador magnético</b>	<b>fanem, Brasil</b>
AGULHAS DESCARTÁVEIS	FANEM, BRASIL
BALANÇA ANALÍTICA	MARTE AL-200 BRASIL
BALANÇA PARA PESAGEM DE ANIMAIS	FILIZOLA, BRASIL
pHmetro	ALALION, PM 608, BRASIL
PIPETAS AUTÔMÁTICAS	JENCONS, INGLATERRA
PIPETAS PASTEUR	UNILAB, BRASIL
PONTEIRAS PLÁSTICAS PARA PIPETAS	UNILAB, BRASIL
POLÍGRAFO	GRAPHTEC, WATANABE JAPÃO
SERINGAS DESCARTÁVEIS	BD, BRASIL
TRANSDUTORES ISOMÉTRICOS	UGO-BASILE, VARESE, ITÁLIA
SISTEMA McLAB AQUISIÇÃO DE DADOS	SOFTWARE VERSÃO 4.0, EUA

**Abstract do Artigo (extraído da presente pesquisa) enviado para publicação no International Brazilian Journal of Urology**

**Title:** Relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium induced by new NO-donor substances of the nitrosyl-ruthenium complex.

**Cerqueira JBG, Silva LFG, Moreira IS, Lopes LGF, Moraes MO, Nascimento NRF.**

**Introduction:** Endothelial dysfunction characterized by endogenous nitric oxide (NO) deficiency makes 56% of subjects affected with erectile dysfunction decline treatment with PDE-5 inhibitors. New forms of treatment are currently being developed for this group of patients.

**Method:** The study compared the effect of sodium nitroprusside and of two substances of the nitrosyl-ruthenium complex, cis-[Ru(bpy)<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>)(NO)]PF<sub>6</sub>-9 ("FONO1") and trans-[Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(caffeine)(NO)]C13 ("LLNO1") upon the relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle and aortic vascular endothelium. The samples were immersed in isolated baths and precontracted with 0.1 μM phenylephrine (PE) and the corresponding relaxation concentration/response curves were plotted. In order to investigate the relaxation mechanisms involved, 100 μM ODQ (a soluble guanylate cyclase-specific inhibitor), 3 μM or 10 μM oxyhemoglobin (an extracellular NO scavenger) or 1 mM L-cysteine (a nitrosyl anion-specific scavenger) was added to the samples.

**Results:** All the NO donors tested produced a significant level of relaxation in the vascular endothelium. In corpus cavernosum samples, FONO1 produced no significant effect, but LLNO1 and SNP induced dose-dependent relaxation with comparable potency ( $pEC_{50} = 6.14 \pm 0.08$  and  $6.4 \pm 0.14$ , respectively) and maximum effect ( $E_{max} = 82\%$  vs.  $100\%$ , respectively). All NO donors were found to activate soluble guanylate cyclase, since the addition of the corresponding inhibitor (100 μM ODQ) completely neutralized the relaxation effect observed. The addition of oxyhemoglobin reduced the relaxation effect, but did not inhibit it completely. In aortic vascular endothelium 3 μM oxyhemoglobin decreased the relaxation effect by 26% on the average, while 10 μM oxyhemoglobin reduced it by

over 52%. The addition of 100  $\mu$ M L-cysteine produced no significant inhibiting effect.

**Conclusions:** The present findings allow us to conclude that LLNO1 and FONO1 are potent vasodilators. LLNO1 was shown to induce a significant level of relaxation in rabbit corpus cavernosum. The substances tested activate soluble guanylate cyclase and release intracellular NO.

**Key Words:** nitric oxide, nitrosil-ruthenium complex, vascular endothelium, corpus cavernosum

**ABSTRACT DO ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NO FASEB JOURNAL.**

*The FASEB Journal*. 2007;21:571.7  
© 2007 FASEB

***Uroguanylin Relaxes Human Corpus Cavernosum and is Potentiated by Vardenafil***

Manassés Claudino Fonteles<sup>1</sup>, Clauber Mota Sousa<sup>2</sup>, João Batista Gadelha Cerqueira<sup>2</sup>, Francisco José Arnaud Batista<sup>2</sup>, Cláudia Ferreira Santos<sup>2</sup>, Lúcio Flávio Gonzaga Silva<sup>2</sup> and Nilberto Robson Falcão Nascimento<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biological Sciences, Mackenzie University, Rua da Consolação, 896, Higienópolis, São Paulo, 01302-907, Brazil,

<sup>2</sup> Superior Institute of Biomedicine, UECE, Av. Paranjana, 1700, Itaperi, Fortaleza, 60740-000, Brazil

**ABSTRACT**

**Uroguanylin** (UGN) is a peptide shown to stimulate membrane bound guanylate cyclase receptors (GC) which has been identified in human corpora cavernosa (HCC). This study tests whether UGN induces HCC relaxation and evaluate its interaction with soluble GC. Strips of HCC were precontracted with phenylephrine (PHE) and concentration-response curves ( $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  M) to human UGN were performed. In other experimental set tissues were treated with  $10^{-7}$  M vardenafil 10 min before PHE challenge. UGN effects were evaluated after  $10^{-4}$  M L-NAME or ODQ and also compared with atrial natriuretic peptide (ANP). UGN induced maximal relaxation of  $55 \pm 7.5$  % ( $PD_2$  7.4) when used alone and  $82.6 \pm 4.5$  % ( $PD_2$  14.1) ( $p < 0.05$ ) after vardenafil pre-treatment. L-NAME or 7-NI were unable to change the maximal response or  $PD_2$  values for UGN. The maximal relaxation after L-NAME was  $52.6 \pm 5.8$  % and with 7-NI was  $46.1 \pm 3.2$  %. ANP induced  $52.6 \pm 5.8$  % maximal relaxation with  $PD_2$  of 4.0. The effects of electrical field stimulation (40–50 V; 0.5 ms; 2 and 20 Hz) or ACh ( $10^{-7}$  M) were not altered when tissues were incubated with UGN ( $10^{-7}$  M). UGN induces HCC relaxation downstream to NO release from nerves or endothelium and with similar profile to ANP. This study shows for the first time that UGN, a GC-C agonist, relaxes human corpus cavernosum and that vardenafil can increase this effect, and may point out to new therapeutic targets to treat erectile dysfunction.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)