

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Clauber Mota de Sousa

**Receptores de membrana para peptídeos
natriuréticos em corpos cavernosos humanos:
aspectos moleculares e funcionais.**

Fortaleza – Ceará

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

Clauber Mota de Sousa

**Receptores de membrana para peptídeos
natriuréticos em corpos cavernosos humanos:
aspectos moleculares e funcionais.**

Dissertação apresentada ao
Curso de Mestrado Acadêmico
em Ciências Fisiológicas do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Estadual do Ceará
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Fisiológicas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles.

Fortaleza – Ceará

2008

Universidade Estadual do Ceará
Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas

Título do Trabalho: Receptores de membrana para peptídeos natriuréticos em corpos cavernosos humanos: aspectos moleculares e funcionais.

Autor: Clauber Mota de Sousa

Defesa em: 13/06/2008

Conceito obtido: Satisfatório

Nota: 10,0 com Louvor

Banca examinadora

Prof. Dr. Manasses Claudino Fonteles
MACKENZIE – co-orientador

Prof. Dra. Luisiane Maria Bendhack
USP

Profa. Dr. Alexandre Havt Bindá
UFC

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

**A Deus, todo poderoso,
por estar sempre presente
em todos os momentos da
minha vida;**

**Aos meus amados pais,
José Ribamar e Maria
José, por todo o amor
dispensado, a quem devo
tudo nessa vida;**

**À minha amada noiva,
Aedra Sarah de Andrade,
que tem me ensinado
todos os dias de nossas
vidas o real significado do
sentimento amor.**

AGRADECIMENTOS

A todos os doadores, através das suas famílias, que contribuíram para realização deste trabalho e continuidade da ciência.

Ao meu orientador Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento, que acreditou na minha capacidade e me depositou confiança e, acima de tudo, com quem aprendi muito durante todos esses anos. Meu Muito Obrigado por sua valorosa e genial orientação, pela eterna amizade e pela oportunidade única concedida para adentrar e me contaminar pelo amor dispensado à pesquisa.

Ao meu também orientador Professor Manassés Claudino Fonteles, pela ímpar e preciosa orientação dispensada desde a iniciação científica, por confiar e me conceder um projeto dessa grandeza. Meu sincero Obrigado.

À Professora Maria Augusta Drago Ferreira, por ter acreditado em mim desde o início. E de ainda me acompanhar até os dias atuais, dessa forma, tendo grande participação na concretização dessa etapa da minha vida.

À Grande Amiga Marta Kerntopf, pelos inesquecíveis anos de convivência juntos no laboratório. Pelas sempre gentis palavras de incentivo.

À Amiga Lucília Maria de Abreu Lessa, pelos agradáveis anos de iniciação científica juntos que se estendem aos dias de hoje.

À Amiga Karina Moreira de Alencar Cunha, pela amizade, pelo companheirismo e pela indispensável ajuda na realização desse trabalho.

Ao Dr. João Batista Gadelha de Cerqueira, pela amizade, e pela imprescindível ajuda nas coletas das doações dos tecidos estudados.

À Professora Cláudia Ferreira Santos, pela amizade, e por estar sempre disponível para ajudar e pela realização das dosagens dos nucleotídeos cíclicos.

Ao amigo Alexandre Havt, pela importante colaboração e realização da expressão dos receptores estudados.

Aos pós-graduandos do LFCC.

Aos bolsistas do LFCC, Hilana Cahina, Paula Priscila e Vítor Martins.

À Professora Ana Maria Assreuy, pela simpatia, por sua confiança em ceder a estrutura do seu laboratório para realização de uma parte desse trabalho e aos integrantes do LAFFIN, Albertina Sousa, Michelle Josino, Natália Velloso e Paulo Alcântara.

Aos Grandes, Eternos e Especiais Amigos do CMACF, Alana de Freitas Pires, Débora Costa Fernandes e Rômmulo Celly Lima Siqueira, pela sincera amizade, por toda confiança e lealdade que conseguimos construir juntos nesse mestrado.

Às amigas do LAFIEX, Natália Rocha Celedônio e Valéria Leonhardt.

A todos pós-graduandos do CMACF.

A todos os professores do CMACF.

A coordenação do CMACF.

A todos os funcionários do ISCB.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------------|
| 1. INTRODUÇÃO | <u>20</u> |
| 1.1. RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS | <u>21</u> |
| 1.2. PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: IMPORTANTES AGONISTAS DE RECEPTORES DE MEMBRANA | <u>26</u> |
| 1.2.1. PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS ATRIAIS | <u>28</u> |
| 1.2.2. UGN E STA | <u>29</u> |
| 1.3. ANATOMO-FISIOLOGIA DA EREÇÃO | <u>33</u> |
| 1.4. RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: PROMISSORES ALVOS TERAPÊUTICOS | <u>40</u> |
| 1.4.1. DISFUNÇÃO ERÉTIL | <u>40</u> |
| 1.4.1. IMPLICAÇÕES DOS RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS NA FUNÇÃO ERÉTIL | <u>41</u> |
| 1.5. JUSTIFICATIVAS | <u>43</u> |
| | |
| 2. OBJETIVOS | <u>46</u> |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | <u>47</u> |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | <u>47</u> |
| | |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | <u>49</u> |
| 3.1. TIRAS DE CORPO DE CAVERNOSO HUMANO EM BANHO ISOMÉTRICO | <u>51</u> |
| 3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS | <u>53</u> |
| 3.3. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO ANP E UGN SOBRE O NÍVEL INTRACELULAR DE AMPc E GMPC | <u>55</u> |

| | |
|---|------------------|
| 3.3.1. AMOSTRAS EXPERIMENTAIS | <u>55</u> |
| 3.3.2. MÉTODO DE DOSAGEM DE NUCLEOTÍDEO CÍCLICO | <u>55</u> |
| 3.4. EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MEMBRANA GC-A, GC-B, GC-C E NPR-C | <u>57</u> |
| 3.4.1. ISOLAMENTO DE RNA TOTAL | <u>57</u> |
| 3.4.2. REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA | <u>57</u> |
| 3.4.3. REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR) | <u>59</u> |
| 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA | <u>62</u> |
| | |
| 4. RESULTADOS | <u>63</u> |
| | |
| 4.1. EFEITO DA UGN SOBRE O RELAXAMENTO DE TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>64</u> |
| 4.2. EFEITO DO ANP SOBRE O RELAXAMENTO DE TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>64</u> |
| 4.3. EFEITO DA ENTEROTOXINA TERMOESTÁVEL DE E. COLI (STA) SOBRE O RELAXAMENTO DE TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>67</u> |
| 4.4. EFEITO DA UGN VERSUS ANP SOBRE O RELAXAMENTO DE TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS | <u>67</u> |
| 4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) NO EFEITO RELAXANTE DA UGN EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS | <u>70</u> |
| 4.6. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA GCs NO EFEITO DA UGN EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>73</u> |
| 4.7. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA VIA GCM NA RESPOSTA RELAXANTE DA UGN EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>73</u> |
| 4.8. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA VIA GCM NA RESPOSTA RELAXANTE DO ANP E STA EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>76</u> |
| 4.9. EFEITO DOS BLOQUEADORES DA CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO RELAXANTE DA UGN EM CORPO CAVERNOSO HUMANO | <u>79</u> |
| 4.10. EFEITO DO BLOQUEIO DE PDE5 NO EFEITO RELAXANTE DA UGN EM CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS | <u>82</u> |
| 4.11. MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GMPc E AMPc EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS EXPOSTO À UGN E ANP | <u>84</u> |
| 4.11.1. GMPc | <u>84</u> |

| | |
|---|------------|
| 4.11.2. AMPc | <u>84</u> |
| 4.12. EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS (GC-A, GC-B, GC-C E NPR-C) | <u>87</u> |
| 4.12.1. GC-A | <u>87</u> |
| 4.12.2. GC-B | <u>87</u> |
| 4.12.3. GC-C | <u>90</u> |
| 4.12.4. NPR-C | <u>92</u> |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | <u>94</u> |
| | |
| 6. CONCLUSÃO | <u>108</u> |
| | |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | <u>110</u> |
| | |
| 8. ANEXOS | <u>126</u> |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------------|--|
| ACh | Acetilcolina |
| NPR-C | Receptor para Peptídeo Natriurético |
| ATP | adenosina trifosfato |
| [Ca²⁺]_i | concentração de cálcio intracelular |
| ANP | peptídeo natriurético atrial |
| BNP | peptídeo natriurético cerebral |
| CNP | peptídeo natriurético tipo C |
| GC-A | guanilato ciclase A |
| GC-B | guanilato ciclase B |
| GC-C | guanilato ciclase C |
| GC-D | guanilato ciclase D |
| GC-E | guanilato ciclase E |
| GC-F | guanilato ciclase F |
| GC-G | guanilato ciclase G |
| AMPC | monofosfato de adenosina cíclico |
| GMPc | monofosfato de guanosina cíclico |
| STa | toxina termo-estável de <i>E.coli</i> |
| L-NAME | N^G- nitro-L-arginina-metil-éster |
| GN | Guanilina |
| UGN | Uroguanilina |
| CO | monóxido de carbono |
| NO | óxido nítrico |
| CCH | corpo cavernoso humano |
| eNOS | Isoforma endotelial da NOS |
| iNOS | Isoforma induzível da NOS |
| nNOS | Isoforma neuronal da NOS |

| | |
|------------------------------------|---|
| PE | Fenilefrina |
| PDE | Fosfodiesterase |
| GCs | guanilato ciclase solúvel |
| GCm | guanilato ciclase de membrana |
| PKA | Proteína Kinase A |
| PKG | Proteína Kinase G |
| CFTR | Receptor Transmembrana da Fibrose Cística |
| Na⁺ | Íon sódio |
| HCO₃⁻ | Íon bicarbonato |
| Cl⁻ | Íon cloreto |
| K⁺ | Íon potássio |
| ODQ | 1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3,-a] quinoxalin-1-ona |
| 7-NI | 7-Nitroindazol |
| GLI | Glibenclamida |
| ISATIN | Indol-2,3 diona |
| IBERO | Iberiotoxina |
| APA | Apamina |
| VARD | Vardenafila |
| SILD | Sildenafil |
| TAD | Tadalafila |
| RT-PCR | Reação Cadeia Polimerase por Transcriptase Reversa |
| EDFH | Fator Hiperpolarizante derivado do Endotélio |

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Estrutura ilustrativa dos domínios de ligação extracelular e intracelular de guanilato ciclase de membrana.

FIGURA 02: Peptídeos guanilina (GN), enterotoxina termoestável da *E. coli* (STa) e uroguanilina (UGN).

FIGURA 03: Anatomia arterial e venosa peniana através de um corte transversal.

FIGURA 04: Anatomia arterial e venosa peniana.

Ilustração mostrando o estado flácido peniano.

FIGURA 05: Ilustração mostrando o estado flácido peniano.

FIGURA 06: Ilustração mostrando o estado ereto do pênis.

FIGURA 07: Esquema ilustrativo do método isolado de corpos cavernosos humanos. Método desde a cirurgia para retirada do tecido à montagem em banho de registro isométrico.

FIGURA 08: Efeito da UGN sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 09: Efeito do ANP sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 10: Efeito da enterotoxina termoestável e *Escherichia coli* (STa) sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 11: Efeito da UGN versus ANP sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 12: Avaliação do efeito de inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS) através de L-NAME no efeito relaxante da UGN em corpos cavernosos humanos.

FIGURA 13: Avaliação do efeito de inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS) através de 7-NI no efeito relaxante da UGN em corpos cavernosos humanos.

FIGURA 14: Avaliação da participação da via GCs no efeito relaxante em corpo cavernoso de humanos através da UGN.

FIGURA 15: Avaliação do bloqueio de GCm na resposta relaxante da UGN em corpo cavernoso de humanos.

FIGURA 16: Avaliação do bloqueio de GCm no efeito relaxante em corpo cavernoso de humanos através de STa.

FIGURA 17: Avaliação do bloqueio de GCm no efeito relaxante em corpo cavernoso de humanos através de ANP.

FIGURA 18: Efeito de bloqueadores de canais de potássio glibenclamida no efeito relaxante da UGN em corpo cavernoso humano.

FIGURA 19: Efeito de bloqueadores de canais de potássio Ibeotoxina e apamina no efeito relaxante da UGN em corpo cavernoso humano.

FIGURA 20: Efeito do bloqueio de PDE 5 no efeito relaxante da UGN em corpos cavernosos humanos.

FIGURA 21: Medida de GMPc em tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 22: Medida de AMPc em tiras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 23: Expressão da isoforma guanilato ciclase A (GC-A) em amostras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 24: Expressão da isoforma guanilato ciclase B (GC-B) em amostras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 25: Expressão da isoforma guanilato ciclase C (GC-C) em amostras de corpos cavernosos humanos.

FIGURA 26: Expressão de receptor para peptídeos natriuréticos (NPR-C) em amostras de corpos cavernosos humanos.

LISTA DE TABELA

TABELA 01: Seqüência dos primers utilizados nas reações em cadeia polimerase.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 01: Resumo publicado no FASEB JOURNAL 2007.

RESUMO

RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS EM CORPOS CAVERNOSOS HUMANOS: ASPECTOS MOLECULARES E FUNCIONAIS.

Clauber Mota de Sousa. Orientador: Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

Os receptores para peptídeos natriuréticos têm se mostrado alvos potenciais para o tratamento da disfunção erétil masculina, devido ao fato de os agonistas de GC de membrana elevarem os níveis intracelulares de GMPc, promovendo o relaxamento do músculo liso de corpos cavernosos humanos. Dessa forma, investigamos o efeito Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), uroguanilina (UGN) e enterotoxina termoestável de *E. coli* (STa) em tiras de corpos cavernosos humanos. Investigamos também a expressão dos receptores para esses peptídeos natriuréticos, bem como a mensuração dos níveis dos nucleotídeos AMPc e GMPc em tiras de corpos cavernosos expostos a estes peptídeos. ANP, UGN e STa promoveram relaxamento de corpos cavernosos humanos (CCH) em banho com registro isométrico. Com percentuais de relaxamento de $48,92 \pm 4,8\%$, $40,44 \pm 8,2\%$ e $45,03 \pm 7,5\%$ (* $p < 0,05$ vs controle) para ANP, UGN e STa, respectivamente. Este efeito parece ser independente de NO. Um bloqueador inespecífico de GCm (isatina) foi capaz de bloquear o efeito relaxante dos 3 peptídeos, evidenciando a participação de GCm. A participação dessa via foi reforçada pelo aumento do efeito relaxante da UGN ($55 \pm 7,5\%$; * $p < 0,05$ vs controle) quando adicionado um inibidor de PDE 5 ($98,6 \pm 1,4\%$; * $p < 0,05$ vs controle). Através de RT-PCR demonstramos a expressão dos receptores GC-A, GC-B e NPR-C. A exposição dos tecidos a ANP e UGN causou uma elevação dos níveis intracelulares de GMPc (UGN: $69,95 \pm 5,72$; ANP: $59,97 \pm 9,35$ e controle: $9,72 \pm 1,36$; * $p < 0,05$ vs controle), mas não de AMPc. Esses achados abrem a perspectiva de utilização da GCm para exploração dos receptores para peptídeos natriuréticos como alvos potenciais para o tratamento da disfunção erétil.

PALAVRAS-CHAVES: Guanilato Ciclase de membrana, Peptídeos Natriuréticos, AMPc, GMPc, Corpos Cavernosos Humanos, Disfunção Erétil.

ABSTRACT

RECEPTORS FOR NATRIURETIC PEPTIDES IN HUMAN CORPORA CAVERNOSA: FUNCTIONAL AND MOLECULAR ASPECTS.

Clauber Mota de Sousa. Advisor: Nilberto Robson Falcão do Nascimento.

Receptors for natriuretic peptides have been demonstrated as potential targets for the treatment of male erectile dysfunction since their activation associated to increased cGMP levels and smooth muscle relaxation. In this regard, we have investigated the effects of the atrial natriuretic peptide (ANP), uroguanylin (UGN) and *E. coli* heat-stable enterotoxin (STa) on strips of human corpora cavernosa (HCC). In addition, we also have evaluated the expression of natriuretic peptide receptors in HCC, as well as, cGMP and cAMP levels after HCC exposure to the peptides. ANP, UGN and STa induced concentration-dependent relaxation on HCC strips mounted in baths for isometric tension recording. The percentage of relaxation was $48,92 \pm 4,8\%$, $40,44 \pm 8,2\%$ e $45,03 \pm 7,5\%$ (* $p < 0,05$ vs control) for ANP, UGN e STa, respectively. The relaxation is NO-independent, but sensitive to the blockade of pGC receptors. The potential role of pGC activation for UGN ($55 \pm 7,5\%$; * $p < 0,05$ vs control) in this effect is reinforced by the potentiation of this effect by a phosphodiesterase 5 inhibitor ($98,6 \pm 1,4\%$; * $p < 0,05$ vs control). The expression of GC-A, GC-B and NPR-C but not GC-C was confirmed by RT-PCR. The exposure of HCC strips to ANP and UGN significantly increased cGMP (UGN: $69,95 \pm 5,72$; ANP: $59,97 \pm 9,35$ e control: $9,72 \pm 1,36$; * $p < 0,05$ vs control), but not cAMP levels. These findings reveal that the natriuretic peptide receptors are potential targets for the development of new drugs for the treatment of erectile dysfunction.

KEY-WORDS: Membrane Guanylate Cyclase, Natriuretics Peptides, cAMP, cGMP, Corpora Cavernosum, Erectile Dysfunction

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Receptores de membrana para peptídeos natriuréticos

Existem duas formas principais de guanilato ciclase: a solúvel e a de membrana. A ativação da forma solúvel ocorre em resposta ao óxido nítrico (NO), como também ao monóxido de carbono (CO), enquanto que a isoforma de membrana é ativada em resposta a peptídeos natriuréticos. Esses peptídeos natriuréticos como, por exemplo, o peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP), peptídeo natriurético do tipo C (CNP), são uma família estruturalmente relacionada, que contém um anel de 17 aminoácidos estabilizados por uma ponte dissulfeto (Anand-Srivastava e Trachte, 1993; Yandle, 1994).

Vários tipos de receptores para peptídeos natriuréticos foram identificados (GC-A, GC-B, GC-C, GC-D, GC-E, GC-F e GC-G), entretanto, para apenas quatro desses receptores foram identificados seus ligantes. O receptor para peptídeos natriuréticos do tipo A e B são, por exemplo, proteínas transmembrana simples com peso molecular entre 120–130 kDa, com atividade guanilil ciclase. Tanto ANP, BNP e CNP se ligam ao receptor do tipo A (GC-A), mas a preferência de ligação, pela ordem de afinidade, seria ANP>BNP>CNP. De forma semelhante, ANP, BNP e CNP se ligam ao receptor do tipo B (GC-B), mas com preferência de ligação definida assim, CNP>BNP>ANP (Yandle, 1994), enquanto que as guanilinas se ligam preferencialmente a isoforma C (GC-C) mostrados por Forte e colaboradores, 2004. Entretanto, os três

peptídeos e as próprias guanilinas interagem, de forma não preferencial, com o receptor do tipo C (NPR-C) e inibem a atividade da adenilil ciclase (Anand-Srivastava, 1997; Anand-Srivastava e Trachte, 1993; Savoie *et al.*, 1995). Santos-Neto e colaboradores demonstraram, recentemente, a existência de uma interação antagônica nos efeitos natriuréticos e caliuréticos desses peptídeos natriuréticos (Santos-Neto *et al.*, 2006). De modo que na ausência do receptor preferencial, os peptídeos poderiam competir entre si para exercerem esses efeitos.

A presença de receptores GC-B para o polipeptídeo natriurético tipo C e a indução de relaxamento por este peptídeo em tiras de corpos cavernosos de ratos e coelhos, foram as primeiras evidências para um possível papel dos receptores guanilato ciclase de membrana na regulação do tônus destes tecidos (Kim *et al.*, 1998). Este relaxamento foi associado com aumento dos níveis intracelulares de GMPc, quando comparados com aqueles obtidos pelo peptídeo natriurético cerebral e pelo peptídeo natriurético atrial, sendo a potência relativa de CNP>BNP>ANP.

Já em relação a isoforma de guanilato ciclase de membrana C (GC-C), essa consiste no principal receptor para peptídeos natriuréticos do tipo guanilinas no intestino; entretanto, sabe-se que essa isoforma também encontra-se expressa em muitos outros tecidos. GC-C forma dímeros, trímeros e tetrâmeros quando inseridos para dentro da membrana plasmática (Vijayachandra *et al.*, 2000). O RNAm para GC-C está presente também em

glândulas adrenais, cérebro, placenta, testículos, vias aéreas, baço e timo (Fan *et al.*, 1997; Range *et al.*, 1997 e Schulz *et al.*, 1992).

Seres humanos e ratos, em relação à GC-C, tem aproximadamente 71% de homologia no domínio extracelular e de 91% no domínio intracelular. O domínio extracelular deve estar então glicosilado (FIGURA 01) para completa atividade do receptor (Vaandrager *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1999), e a desfosforilação causada por uma ligação de um agonista do domínio intracelular se relaciona diretamente com a perda de sensibilidade desse receptor (Potter *et al.*, 1992).

A maioria dos reguladores de GC-C são proteínas quinases C (PKC). A fosforilação de GC-C por PKC promove um aumento dos níveis de GMPc. PKC induz fosforilação no C-terminal aumentando a geração de GMPc em 70%, quando comparado com o receptor não-fosforilado (Wada *et al.*, 1996; Crane *et al.*, 1992).

Mais recentemente, foi demonstrado o envolvimento do polipeptídeo natriurético tipo C (CNP) e de seu respectivo receptor na indução de relaxamento de corpos cavernosos humanos e também da elevação de GMPc nessas preparações, bem como, a expressão de GC-B em corpos cavernosos humanos (Küthe *et al.*, 2003). Entretanto, esses estudos iniciais utilizaram corpos cavernosos de pacientes humanos que possivelmente possuíam uma expressão dos receptores guanilato ciclase alterada. Visto que estes tecidos foram oriundos ou de pacientes idosos em via de implantação de próteses

penianas ou de pacientes transexuais. Dessa forma, é possível que os primeiros apresentassem co-morbidades associadas, como por exemplo, diabetes e hipertensão. Já o segundo grupo poderia ter utilizado drogas como, por exemplo, hormônios para intensificação de características femininas, descaracterizando assim a expressão fisiológica dos receptores envolvidos e, portanto, podendo não refletir a real expressão e nem função normal deste sistema de receptores, tampouco, a transdução de sinal associado.

Nesse sentido é importante se estudar, de forma inédita, a expressão desses receptores (GC-A, GC-B, GC-C e NPR-C) em preparações de corpos cavernosos humanos oriundos de doadores cadáveres na ocasião para transplante de órgãos. Os doadores selecionados foram doadores jovens (média de 34 anos de idade) sem histórico de doença cardiovascular (diabetes, hipertensão e dislipidemias). Dessa forma, realizaríamos um estudo mais próximo a expressão fisiológica desses receptores nos tecidos estudados, bem como, a participação desses receptores na regulação do tônus da musculatura lisa cavernosa.

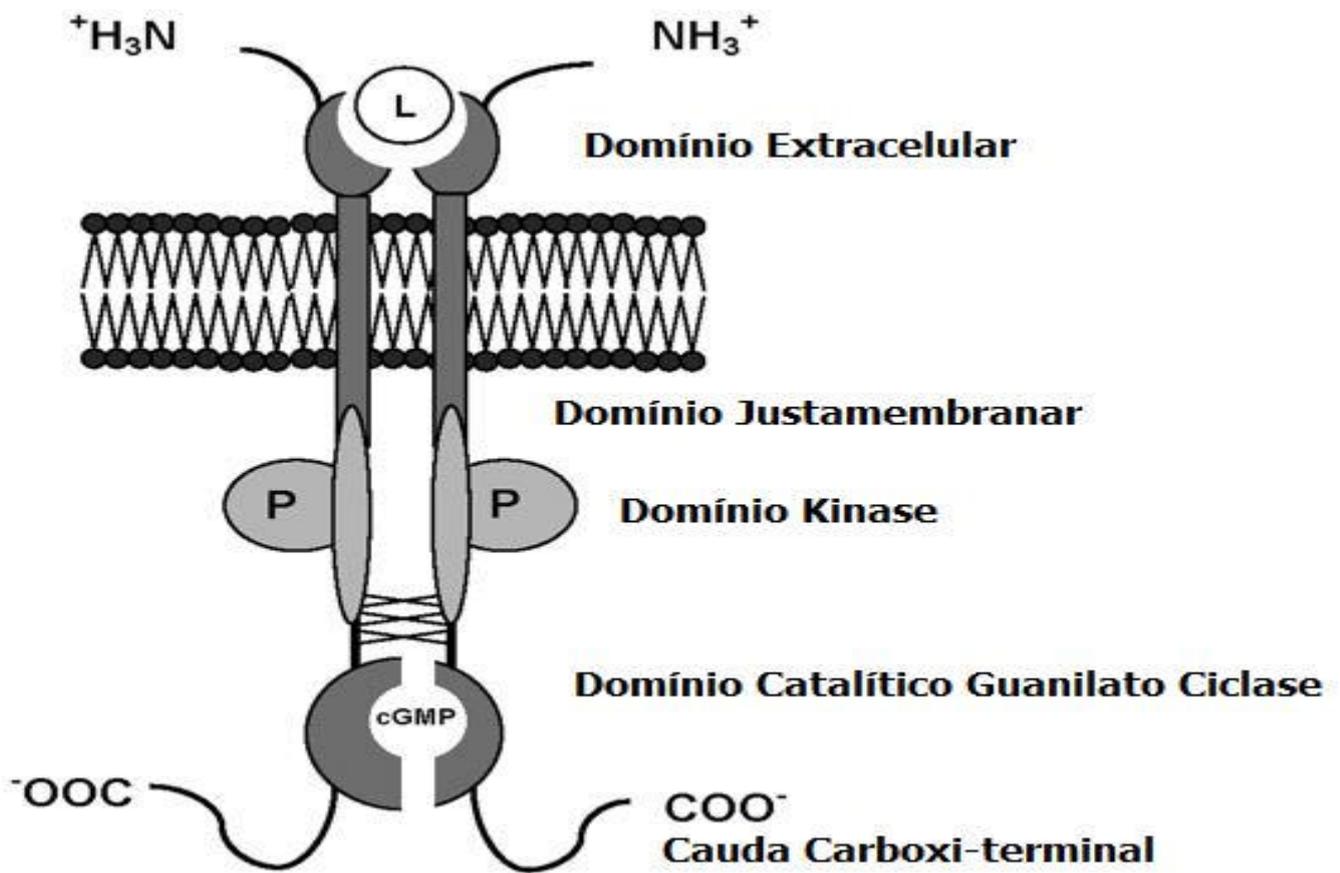


FIGURA 01: Estrutura ilustrativa dos domínios de ligação extra-celular e intra-celular de guanilato ciclase de membrana (FONTE: Sindic *et al*, 2006).

1.2. Peptídeos Natriuréticos: importantes agonistas de receptores de membrana.

Os mecanismos de transporte de água e eletrólitos, como também a sua regulação, contribuem de forma significativa para a manutenção das espécies. Neste sentido, o estudo com peptídeos natriuréticos deve muito aos primeiros trabalhos realizados pelo pesquisador De Wardener em 1961. Os trabalhos consistiam na busca de um idealizado fator III, um hormônio relacionado com a diurese salina, em experimentos utilizando cães expandidos por infusão salina (De Wardener *et al.*, 1961). Nos anos seguintes, foram publicados efeitos de extratos urinários de seres humanos submetidos a uma sobrecarga salina na excreção urinária de ratos (Brown *et al.*, 1972) e, em 1976, identificados 2 peptídeos responsáveis pelos efeitos natriuréticos renais (De Wardener *et al.*, 1976).

Continuando a busca por maiores entendimentos da fisiologia das substâncias natriuréticas, mais precisamente em 1975, Carey e colaboradores conseguem demonstrar que a excreção urinária de NaCl é significativamente mais elevada no período de quatro horas imediato a uma sobrecarga oral de NaCl na dieta, quando comparado a uma infusão endovenosa dentro do mesmo período (Carey *et al.*, 1976 e Carey 1978). Esses achados sugeriram a existência de um mediador, produzido no intestino, que exercia pronunciados efeitos natriuréticos, sugerindo a existência de um eixo êntero-renal que seria responsável pela eliminação do excesso de sal ingerido, com a função de controlar a volemia e, portanto, a pressão arterial.

Importantes achados de Fonteles e colaboradores em 1991, descreviam os potentes efeitos natriuréticos exercidos pela enterotoxina termoestável da *Escherichia coli* (STa) no rim, dessa forma, sugerindo a existência de um mediador endógeno (Fonteles *et al.*, 1991). Nesse sentido, Currie e colaboradores, logo em seguida, isolaram um peptídeo encontrado no jejuno do rato (Currie *et al.*, 1992), denominado guanilina, que mimetizavam os efeitos moleculares da enterotoxina termoestável da *Escherichia coli* (STa), o primeiro agonista exógeno de guanilato ciclase de membrana.

As guanilinas, assim como outros peptídeos já descritos, como por exemplo, o peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP), peptídeo natriurético tipo C (CNP) têm sido propostos como os principais responsáveis pela homeostase de sal e água através do eixo êntero-renal (Carey, 1978) regulando tônus vascular e excreção de sal renal. Todos esses peptídeos tem afinidade por receptores de membrana, encontrados em vários tecidos, chamados guanilato ciclase de membrana, que uma vez ativados, promovem uma elevação das concentrações intracelulares de monosfato cíclico de guanosina (GMPc), induzindo tanto a secreção de Cl⁻, quanto a excreção de Na⁺, controlando portanto o volume plasmático, daí serem chamados de peptídeos natriuréticos, dessa forma, controlam a pressão sanguínea, contribuindo sobremaneira para o controle da pressão arterial.

Por outro lado, através de sinalização adenilato ciclase, outro grupo de receptores, ditos receptores para peptídeos natriuréticos ou NPR-C, ativados pelas mesmas substâncias natriuréticas, tanto atriopeptinas como também as

guanilinas, levam a uma inibição da adenilato ciclase via ativação de proteína Gi (Anand-Srivastava *et al.*, 1990) ou pela ativação de fosfolipase C (Hirata *et al.*, 1989) que, por sua vez, alteram os níveis de AMPc, GMPc ou ainda podem alterar a permeabilidade a canais iônicos.

1.2.1. Peptídeos Natriuréticos Atriais

Peptídeos Natriuréticos são uma família de três entidades hormonais, sendo eles: Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) e Peptídeo Natriurético tipo-C (CNP). Todos esses peptídeos são produzidos em corações de mamíferos, incluindo o de humanos (Levin *et al.*, 1998; Yandles *et al.*, 1994). ANP regula uma variedade de funções fisiológicas incluindo: pressão arterial, secreção de progesterona, liberação de renina, liberação de vasopressina e também liberação de endotelina (Anand-Srivastava *et al.*, 1985 e 1986).

BNP e CNP, os outros integrantes da família das atriopeptinas, agem antagonizando os efeitos da vasopressina, endotelina e também do sistema renina-angiotensina (Brenner *et al.*, 1990; Ruskoaho *et al.*, 1992).

Trabalhos mais atuais demonstram que as concentrações plasmáticas desses peptídeos estão bastante aumentadas em doenças cardiovasculares. Dessa forma, consideram que eles têm uma função importante no balanço homeostático do sistema cardiovascular (Minamino e Nishikimi, 2006).

1.2.2. Uroguanilina e STa

As guanilinas são peptídeos endógenos, agonistas de receptores GC-C. Este peptídeo descrito inicialmente por Currie e colaboradores em 1992. Foi encontrado no jejuno do rato e mimetiza os efeitos moleculares da enterotoxina termoestável da *Escherichia coli* (STa). Todavia, as primeiras demonstrações de reatividade renal através de STa foram descritas por Fonteles e Lima em 1983. Inicialmente com o peptídeo na forma semi-purificada e posteriormente com STa na forma pura (Fonteles *et al.*, 1991 e Lima *et al.*, 1992).

Estudos posteriores de Forte e colaboradores em 1993 demonstraram claramente que guanilina é um potente estimulante da secreção de cloreto em células T₈₄ em cultura. Esta linhagem de células é altamente sensível à estimulação de secreção de GMP cíclico por STa, e hoje, muito utilizada como rotina para bioensaio de substâncias “guanilina símile”.

A uroguanilina (UGN) foi o segundo hormônio da classe das guanilinas a ser descoberto e capaz de ativar o receptor de membrana tipo guanilato ciclase intestinal chamado GC-C. Baseados no fato de que extratos renais de rins de ratos aumentaram a produção de GMPc em células T₈₄, Hamra e col (1993) iniciaram a procura de outros mediadores guanilina-símile na urina e na mucosa intestinal do possum (gambá) americano *Didelphis virginiana*. Foi denominado uroguanilina por ser um peptídeo ácido e que foi encontrado inicialmente na urina. Este peptídeo contém 53% de identidade com os aminoácidos da guanilina (FIGURA 02).

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| GUANILINAS | |
| RATO / CAMUNDONGO | PNTCEICAYAACTGC |
| HUMANO | PGTCEICAYAACTGC |
| GAMBÁ | SHTCEICAF AACAGC |
| UROGUANILINAS | |
| RATO / CAMUNDONGO | TDECELCINVACTGC |
| HUMANO | NDDCELCVNVACTGCL |
| GAMBÁ | QEDCELCINVACTGC |
| LINFOGUANILINA | QEECELCINMACTGY |
| Sta | NSSNYCCELC CNPACTG CY |

FIGURA 02: Estrutura primária de peptídeos representativos da família das guanilinas e da enterotoxina termo-estável da *Escherichia coli* (STa). As letras correspondem às abreviaturas dos aminoácidos. (Fonte: Forte, 2004)

O peptídeo descoberto foi também sintetizado pelos autores e é cerca de 10 vezes mais potente que a guanilina, tendo, dessa forma, potência intermediária entre guanilina e STa.

Estudos do nosso laboratório (Fonteles *et al.*, 1998) apontavam para potentes efeitos natriuréticos e caliuréticos promovidos por uroguanilina em rins de rato e Carrithers e colaboradores em 2002 demonstraram os efeitos produzidos pela alteração da ingestão de NaCl na expressão de RNAm em quatro diferentes regiões do intestino do rato (duodeno, jejuno, íleo e cólon). Importantes alterações na expressão de GN e UGN podiam ser afetadas dentro de 4 horas de administração de NaCl por via intragástrica, sugerindo que este sistema de sinalização é capaz de responder rapidamente à ingestão de NaCl. Recentes evidências de nosso e de outros grupos demonstraram que esses peptídeos afetam a função renal, “*in vitro*” e “*in vivo*” (Fonteles *et al.*, 1998 e 2001; Carrithers *et al.*, 1999 e 2004).

Mais recentemente, observou-se que as guanilinas têm seu efeito intestinal devido, quase que exclusivamente, a ligação ao receptor guanilato ciclase de membrana do tipo C (Sindic *et al.*, 2006), enquanto que os efeitos renais devam-se a outra ligação com outros tipos de receptores presentes no ducto coletor cortical (Sindic *et al.*, 2005) independentem de guanilato ciclase C. Estudos de Schlatter e colaboradores já mostraram o envolvimento de canais de K⁺, como o canal de potássio da região medular externa renal, ROMK (do acrônimo inglês Renal Outer Medullary Potassium Channel), também

independentes de GC-C, na condutância de íons potássio em células tubulares proximais de rim humano por guanilina e uroguanilina .

Fonteles e colaboradores em 2006 demonstraram, em néfrons microperfundidos isolados, o efeito da uroguanilina em aumentar a secreção de potássio, e este efeito foi bloqueado por iberiotoxina e que, portanto, parece ser dependente de canais de potássio, voltagem dependente, do tipo cálcio sensível chamado de maxi-K (Amorim *et al.*, 2006).

E por último, demonstrou-se a possibilidade da UGN se ligar a receptores de membrana que não GC-C, em outros sistemas, como em trabalhos recentes, demonstrando uma determinada falta de especificidade de agonistas de GC de membrana pelos seus respectivos receptores, uma vez que GN e UGN são responsáveis pela transdução do sinal quimiosensorial em epitélio olfatório através de GC-D (Leinders-Zufall *et al.*, 2007; Duda e Sharma, 2007).

1.3. ANATOMO - FISILOGIA DA EREÇÃO

O pênis, resumidamente, é composto de três corpos separados por septos de tecido conjuntivo. Um corpo esponjoso único que sustenta e protege a uretra ao longo da superfície ventral do pênis e forma a glândula distalmente; dois corpos cavernosos paralelos que se estendem ao longo da superfície dorsal do pênis que, além de prover estrutura para o pênis, funciona como um reservatório de sangue no estado erétil (FIGURA 03). Os corpos cavernosos são envoltos por uma camada fibrosa, túnica albugínea (Andersson e Wagner, 1995) e compreendem uma rede de sinusóides supridos pelas artérias helicinais, que são ramos terminais das artérias cavernosas. No estado flácido, as trabéculas do músculo liso dos corpos cavernosos, que sustentam os sinusóides vasculares, estão tonicamente contraídos e permitem apenas uma pequena quantidade de influxo arterial (Burnett *et al.*, 1992). Enquanto que a liberação de neurotransmissores de terminais dos nervos cavernosos e do endotélio em resposta à estimulação sexual resulta em relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e ereção peniana.

Neste sentido, a principal fonte de irrigação peniana pode ser atribuída à artéria pudenda interna. Após enviar um ramo para o períneo, a artéria pudenda torna-se artéria peniana comum, a qual se divide em três ramos: artéria peniana dorsal, artéria bulbouretral e artéria cavernosa (Lue, 2002).

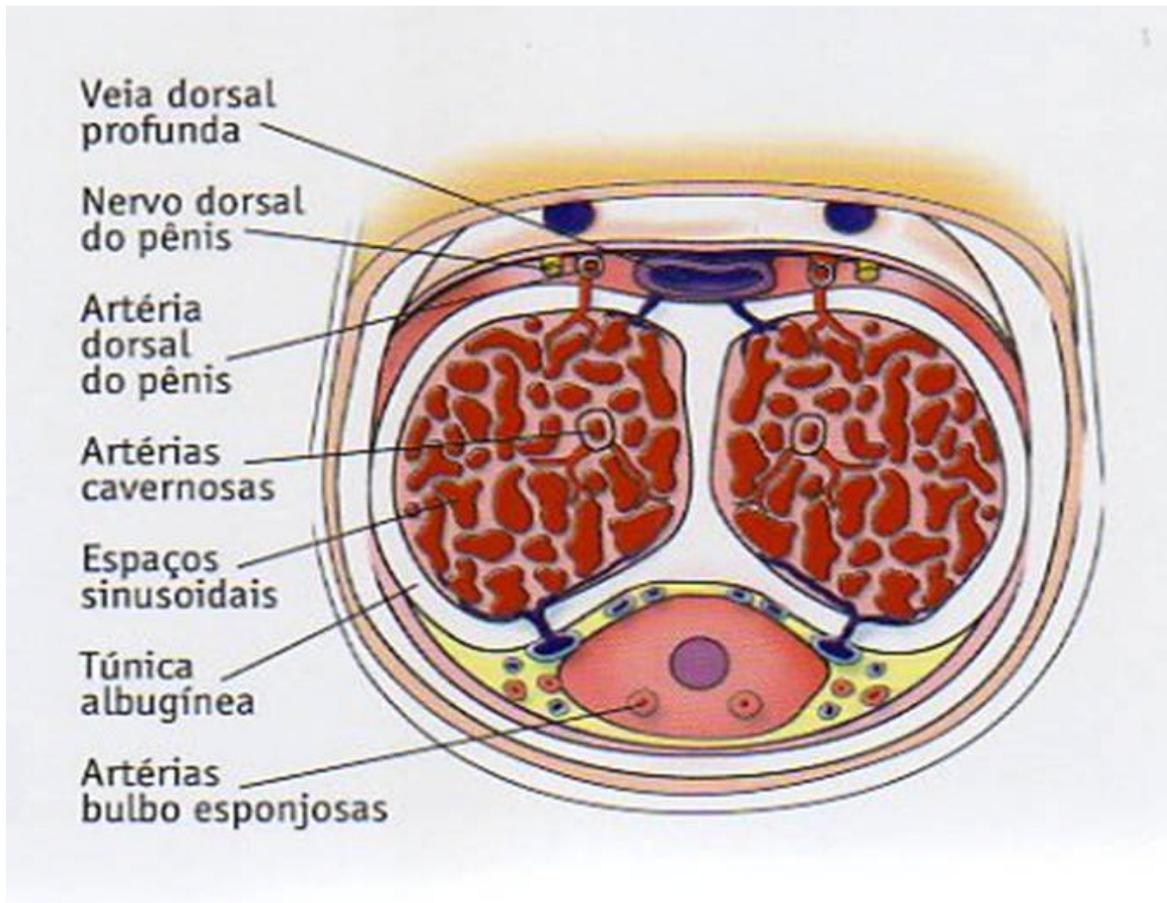


FIGURA 03: Anatomia arterial e venosa peniana através de um corte transversal. FONTE: Glina, S. *et al.* Disfunção Sexual Masculina, 2002.

Por outro lado, existe um sistema para ocorrência de drenagem venosa para a manutenção do estado normal do pênis, ou seja, do estado flácido. Dessa forma, as pequenas veias dos espaços sinusoidais, localizadas abaixo da túnica albugínea, unem-se dorsalmente formando a veia dorsal profunda. No corpo cavernoso principal e na crura essa veia drena sangue para as veias cavernosas e crurais que se unem à veia uretral formando a veia pudenda interna (Lue, 2002), como mostrado na FIGURA 04.

A ereção peniana constitui-se, portanto, de um evento neurovascular mediado por fatores psicológicos e fatores hormonais (Priviero *et al.*, 2007). E pode ser então dividida em inervação autonômica, subdividindo-se em simpática e parassimpática, e em somática, sensitiva e motora. A inervação sensitiva começa em receptores na pele do pênis, glândula, uretra e dentro do corpo cavernoso. Essas fibras nervosas 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 espino-talâmico 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 do neurotransmissor, NO e seu efetor intracelular GMPc, com consequente relaxamento da musculatura lisa cavernosa, vasodilatação arteriolar e ereção peniana. A inervação autonômica 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 noradrenalina, responsável pela fase de detumescência peniana (Lue, 2002).

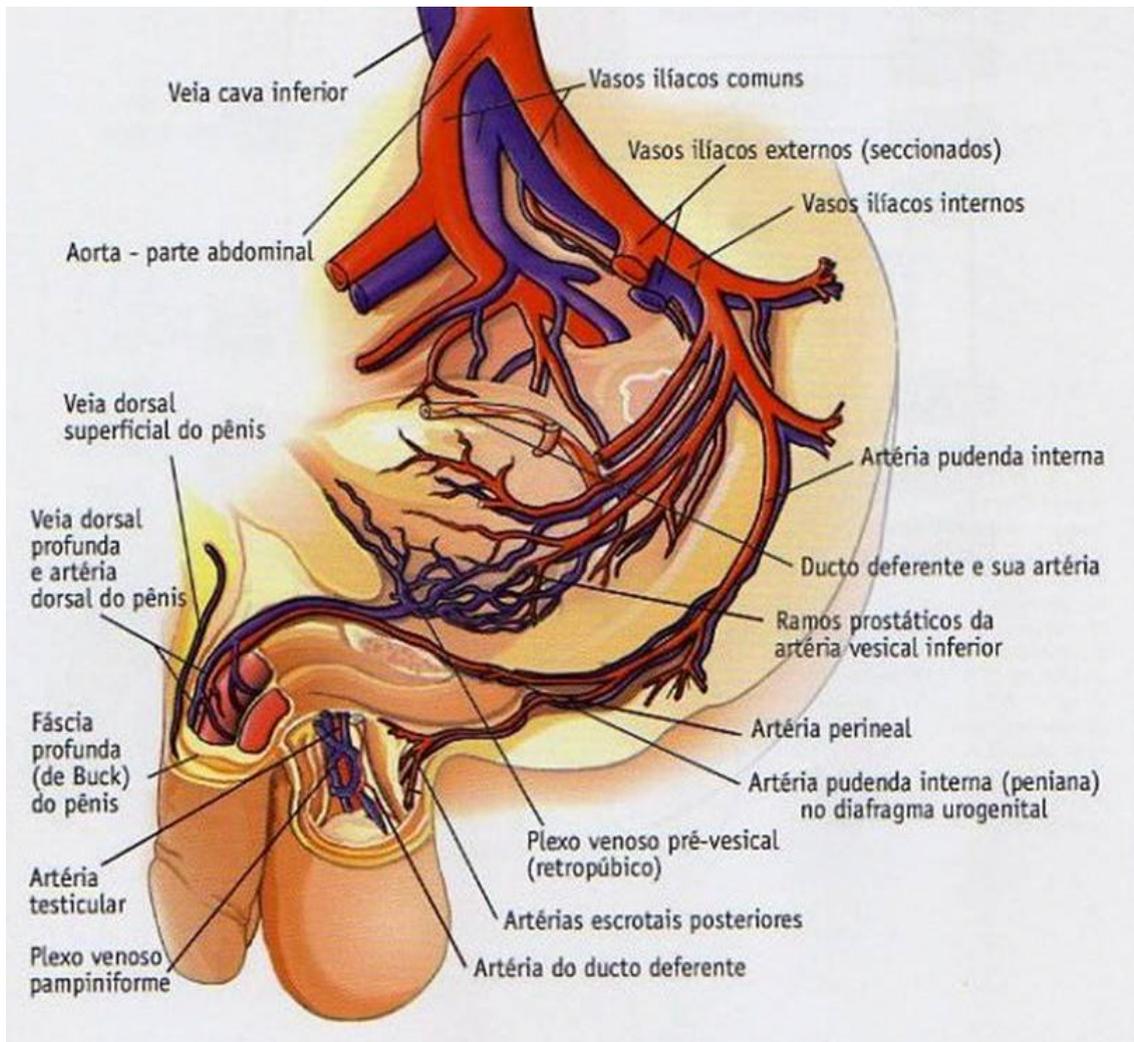


FIGURA 04: Anatomia arterial e venosa peniana. FONTE: Glina, S. *et al.* Disfunção Sexual Masculina, 2002.

Desta forma, a musculatura lisa cavernosa, arterial e arteriolar peniana, constituem-se o principal componente tecidual envolvido na ereção peniana. No estado flácido a musculatura lisa está tonicamente contraída (FIGURA 05) permitindo que o fluxo sanguíneo arterial desempenhe apenas papel nutricional. Isso pode ser evidenciado após a injeção de fenilefrina, um agonista adrenérgico, em modelos experimentais de tiras de corpos cavernosos (Lang-chu; Adaikan, 2006).

O estímulo sexual promove liberação de neurotransmissores nos terminais dos nervos cavernosos levando ao estado de tumescência (FIGURA 06), dessa forma, a ereção peniana é o resultado final do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano. A resposta erétil do pênis é associada ao músculo liso vascular na túnica média das artérias e arteríolas que carregam sangue dentro do corpo cavernoso e, também, às células do músculo liso vascular que delineiam os sinusóides cavernosais. O relaxamento destas células no início da resposta erétil permite aos sinusóides expandir e acomodar o aumento do influxo sanguíneo. Ao expandirem-se contra a túnica albugínea, os sinusóides comprimem as veias responsáveis pelo efluxo sanguíneo. A limitação do efluxo pressão-dependente constitui o processo veno-oclusivo. A resultante do aumento do influxo devido à dilatação arteriolar e à redução do efluxo resultante da veno-oclusão é a base da ereção peniana.

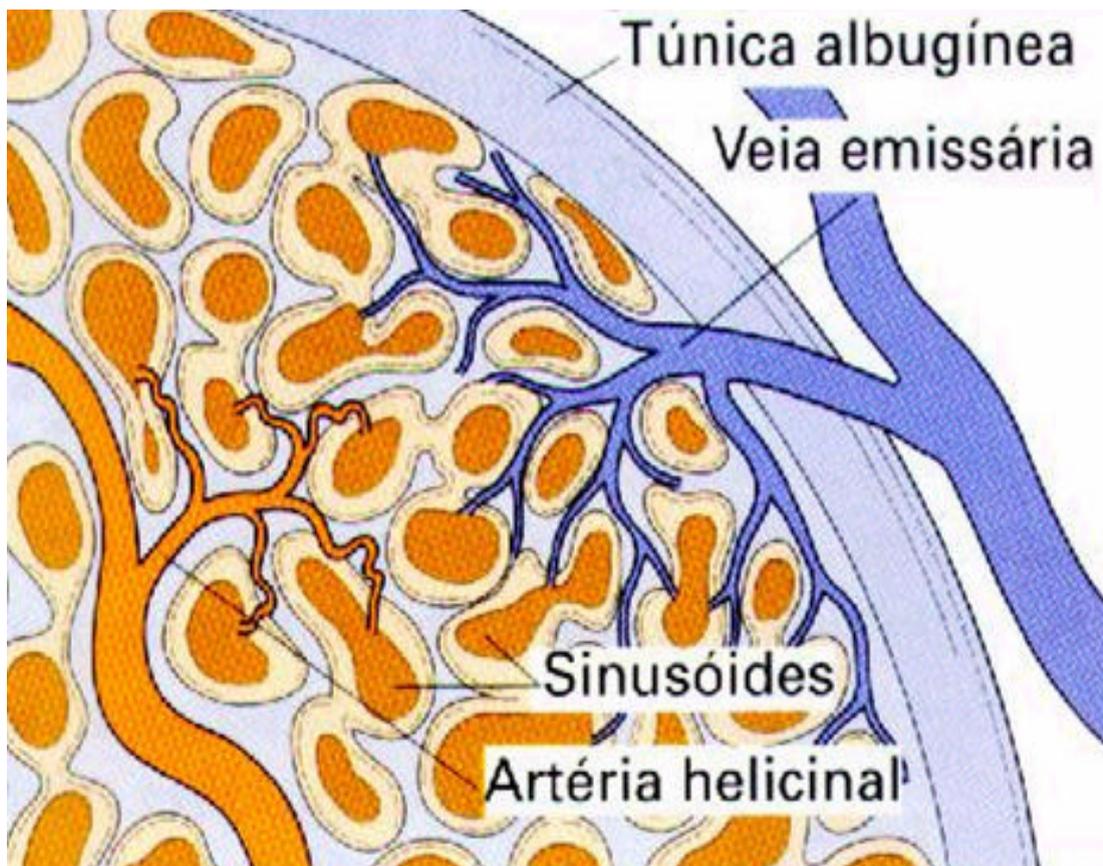


FIGURA 05: Ilustração demonstrando, através de corte transversal, o pênis no estado tonicamente contraído, representando o estado de detumescência peniana. FONTE: Eardley, 1999.

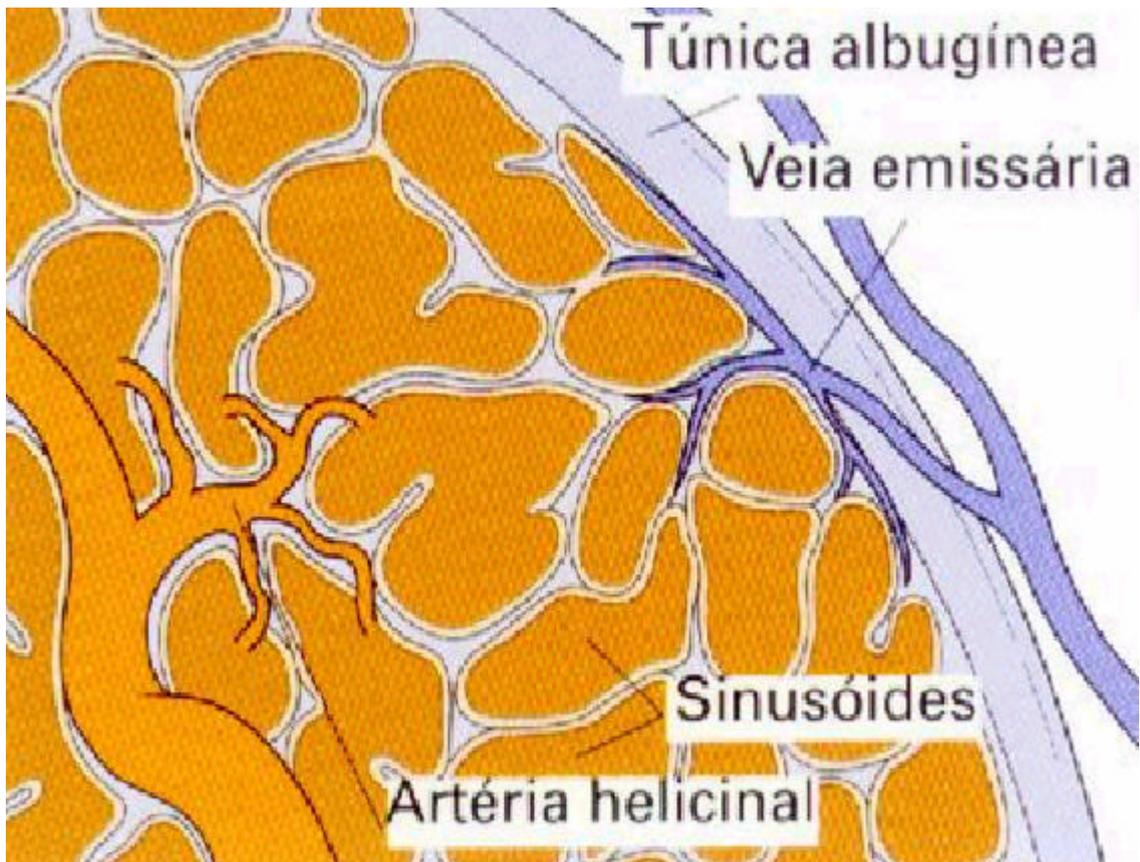


FIGURA 06: Ilustração demonstrando, através de corte transversal, o pênis no estado tonicamente relaxado, representando o estado de ereção peniana.

FONTE: Eardley, 1999.

1.4. RECEPTORES DE MEMBRANA PARA PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS: PROMISSORES ALVOS TERAPÊUTICOS

1.4.1. Disfunção Erétil

A disfunção erétil é definida como incapacidade de atingir e manter uma ereção peniana adequada para uma performance sexual satisfatória. Esta incapacidade deve perdurar por mais de três meses para caracterizar a disfunção erétil (National Institutes of Health Consensus - Development Panel on Impotence, 1993).

Estima-se que a disfunção erétil atinja cerca de 150 milhões de homens (McKinlay, 2000). No Brasil, as estimativas apontam que mais de 40% dos brasileiros entre 40 e 70 anos sofram desta condição (Moreira *et al.*, 2001) e que pelo menos um milhão de novos casos surjam por ano nesta mesma faixa etária (Moreira, 2002 a e b).

Apesar dessa condição não ser fatal, não deve ser considerada um distúrbio benigno, uma vez que pode ter um efeito extremamente negativo na relação conjugal do paciente, em sua auto-estima, comprometendo seu bem estar e qualidade de vida (Krane *et al.*, 1989).

Sempre que possível, o tratamento da disfunção erétil deve ter caráter curativo, ou seja, direcionado à causa subjacente ao processo. No entanto, poucos são os casos de disfunções eréteis com tratamento curativo como, por

exemplo, nos distúrbios psicológicos, algumas desordens hormonais e algumas obstruções vasculares que podem ser abordadas por revascularização.

Infelizmente, a maioria dos pacientes com disfunção erétil não se curam, mas podem se beneficiar de tratamentos sintomáticos. Os tratamentos sintomáticos são prescritos de maneira progressiva do menos agressivo ao mais agressivo. A abordagem menos agressiva para o paciente seria o uso de terapia oral com inibidores da fosfodiesterase 5 (p.ex., sildenafil-Viagra®, vardenafila-Levitra® e tadalafila-Cialis®). Um segundo passo seria a aplicação local (intracavernosa ou transuretral) de drogas relaxantes dos corpos cavernosos e a última opção seria a implantação de próteses penianas (Steers, 2002; Moncada *et al.*, 2004).

1.4.2. Implicações dos receptores de membrana para peptídeos natriuréticos na função erétil.

A via bioquímica mais importante para a promoção do relaxamento de células musculares lisas é a NO-GMPc. Levando a um incremento dos níveis intracelulares de GMPc e, conseqüente, relaxamento de músculo liso. Mas os receptores de membrana associados à via guanilato ciclase e também ao receptor NPR-C, vem se mostrando bastante promissora com novas vistas ao tratamento da disfunção erétil (Christ, 2003). Essas vias têm importante papel na regulação do tônus da musculatura lisa cavernosa por aumentarem os níveis dos nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, e promoverem o relaxamento

de células musculares lisas. Esse efeito pode se dar através de uma ligação direta de agonistas a esses receptores GCm ou, ainda, através de canais de íons como, por exemplo, canais de potássio.

Mais recentemente, Kütthe e colaboradores demonstraram a expressão de guanilato ciclase de membrana (GC-B) em corpos cavernosos humanos, mostrando que a isoforma guanilato ciclase B era a mais proeminente nos tecidos supramencionados e que o CNP seria o ligante do receptor GC-B responsável pelos seus efeitos fisiológicos (Kütthe *et al*, 2003).

Os receptores para peptídeos natriuréticos (NPR-C) antes tidos como de “clearance” são também bastante importantes para o efeito destes peptídeos. Mais recentemente, já se tem evidenciado inúmeros efeitos relacionados a eles, como por exemplo, o efeito cronotrópico negativo do CNP em corações de ratos através de NPR-C (Rose *et al.*, 2004).

Desta forma, tornou-se importante estudar a expressão desses receptores de membrana, em preparações de corpos cavernosos humanos, e a ativação desses receptores para, dessa forma, avaliar o possível efeito relaxante na musculatura lisa dessas preparações em tecidos humanos de pacientes jovens e sem co-morbidades associadas. Nesse sentido, obter-se-ia uma real expressão fisiológica desses receptores. Por outro lado, ter-se-ia a possibilidade de aumentar a janela terapêutica ao incluir um maior número de pacientes que respondam a essas novas substâncias, podendo ainda, associá-las à inibidores de PDE 5.

JUSTIFICATIVAS

1.5. JUSTIFICATIVAS

A importância de avaliar, pela primeira vez, a expressão dos receptores de membrana para peptídeos natriuréticos em corpos cavernosos humanos de doadores saudáveis. Bem como, a demonstração da funcionalidade desses receptores após ligação à agonistas endógenos e, com isso, verificar a possível participação destes receptores na regulação do tônus da musculatura lisa cavernosa, evento fisiológico imprescindível para o fenômeno da ereção peniana.

Partimos de referenciais teóricos que demonstram o efeito relaxante de peptídeos natriuréticos, em corpos cavernosos de ratos e coelhos (Kim et al., 1998) e de um trabalho em corpos cavernosos obtidos de um reduzido número de pacientes (06) que implantaram prótese peniana ou fizeram cirurgia de mudança de sexo que demonstrou atividade relaxante do peptídeo natriurético C (Khüte et al., 2003). Pensamos então em estudar a expressão de receptores natriuréticos e o efeito da ativação destes receptores com agonistas totais (STa) e parciais (UGN) de receptor GC-C e agonista total de receptor GC-A (ANP) utilizando tecidos oriundos de doadores humanos saudáveis e jovens. A intenção deste estudo inicial é começar a desvendar se estes receptores guanilato ciclase de membrana são importantes para a modulação do tônus dos corpos cavernosos. E quando da existência desses efeitos, a possibilidade de uma potencialização por inibidores de fosfodiesterase 5.

Com isso, os receptores de membrana acoplados à via guanilato ciclase (GCm) e também os receptores acoplados a inibição da adenilato ciclase (NPR-C) podem se tornar um importante alvo para o tratamento da disfunção erétil masculina, pois independem da via nitrérgica neuronal e endotelial.

Essas vias encontram-se disfuncionais quando de fatores de riscos cardiovasculares (diabetes, obesidade/dislipidemias, senescência, hipertensão, etc). Podendo, portanto, se tornar um alvo alternativo e/ou em conjunto com inibidores de fosfodiesterase 5 e, dessa forma, abranger um maior número de pacientes que não respondem adequadamente a terapêutica oral atualmente disponibilizada.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este trabalho tem como objetivo investigar a expressão de receptores de membrana para peptídeos natriuréticos e o efeito dos agonistas ANP, UGN e STa sobre a contratilidade de corpos cavernosos humanos.

2.2. Específicos

- Investigar o possível efeito relaxante sobre a musculatura lisa de corpos cavernosos humanos do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), Uroguanilina (UGN) e enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* (STa).
- Excluir a participação do NO (endotelial e/ou neuronal) no efeito destes peptídeos.
- Investigar o possível envolvimento da guanilato ciclase solúvel (GCs) no efeito da UGN em preparações de corpo cavernoso humano.
- Investigar o possível envolvimento da guanilato ciclase de membrana (GCm) no efeito dos peptídeos (ANP, UGN e STa) em preparações de corpo cavernoso humano.

- Investigar o papel dos canais de K^+ ATP dependentes (K_{ATP}) e Ca^{++} dependentes (K_{Ca}) no efeito da UGN em corpos cavernosos humanos.
- Avaliar a utilização da via guanilato ciclase, através de um inibidor de fosfodiesterase 5 no efeito induzido por UGN.
- Mensurar os níveis intracelulares de AMPc e GMPc em tiras de corpos cavernosos humanos expostos a ANP e UGN.
- Investigar a expressão de receptores de membrana (GC-A, GC-B, GC-C e NPR-C) em tiras de corpos cavernosos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Ceará e do Conselho Ético em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará, tendo sido aprovados.

Os corpos cavernosos foram obtidos de cadáveres humanos durante cirurgia para coleta de órgãos para transplante, devidamente autorizados pelas famílias. Após remoção, o tecido foi mantido em solução de Krebs-Henseleit modificada (4°C) e usada no máximo até 24 horas. Os doadores não foram identificados em nenhum momento do estudo.

Utilizamos, neste trabalho, CCH obtidos de 21 pacientes para doação de órgãos (média de idade de 34 anos). A grande maioria desses pacientes teve como causa morte, traumatismo crânio-encefálico (TCE). Entretanto, havia 3 casos de AVC e 2 de homicídio. Os protocolos experimentais foram arranjados para que houvesse no mínimo amostras de quatro (04) indivíduos para cada grupo.

3.1. Tiras de corpo cavernoso humano em banho isométrico

Após eversão e excisão de um pequeno segmento dos corpos cavernosos, os mesmos foram mantidos em solução de Collins e transportados imediatamente ao laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UECE. Os corpos cavernosos foram dissecados para retirada dos tecidos circunjacentes e da túnica albugínea. Após isolamento foram montados em banhos de 5 ml em Krebs-Henseleit mantido a 37° C, pH 7,4 e oxigenados com mistura carbogênica - 95%O₂ e 5%CO₂. Os tecidos foram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 1 h com lavagens sucessivas de 15 em 15 minutos (FIGURA 07).

As alterações na tensão foram registradas por intermédio de polígrafo com transdutor de força isométrico F60 (Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). Após o período de equilíbrio, cerca de 1 hora, os corpos cavernosos humano foram contraídos com fenilefrina 1μM, e no platô da contração foram realizados os diferentes protocolos experimentais. Com a exceção do protocolo com vardenafila, onde este foi pré-incubado 15 minutos antes da pré-contração com fenilefrina 1μM

FIGURA 07: Esquema ilustrativo do método isolado de corpos cavernosos humanos. Método desde a cirurgia para retirada do tecido à montagem em banho de registro isométrico.

3.2. Protocolos Experimentais

Para investigação do efeito dos peptídeos ANP (10pM-30nM), UGN (10pM-1µM) e STa (0,1pM-1µM) foram realizadas curvas concentração-resposta após pré-contracção com fenilefrina (1µM). Foram realizadas curvas dconcentração-resposta na presença de vários inibidores farmacológicos, onde todos eles foram adicionados no platô da contracção (mantida e estabilizada), 30 minutos antes do início da realização de curvas concentração-resposta para o ANP, UGN ou STa.

Em um primeiro conjunto de experimentos o efeito da UGN foi estudado na ausência ou presença de L-NAME (10µM), inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase e 7-NI (100µM), um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal. Em seguida, outro grupo experimental avaliou o efeito da UGN na ausência ou presença de [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ-10 µM), um inibidor seletivo do grupo heme da guanilato ciclase solúvel, mais especificamente, no sítio de interação com óxido nítrico. Foi testado também Isatina (10µM), um inibidor inespecífico das guanilatos ciclase de membrana, sobre os efeitos da UGN, ANP e STa.

Em outro conjunto experimental testamos o efeito de bloqueadores de canais de potássio. Inicialmente, utilizamos a glibenclamida (100µM) para avaliar a participação de canais do tipo K_{ATP} , assim como, a associação iberiotoxina (1µM) + apamina (0,1µM) para avaliar a participação de canais de potássio cálcio-dependente de alta, média e baixa condutividade no efeito

obtido após exposição dos tecidos a UGN.

Por último, realizamos curvas concentração-resposta para UGN em preparações pré-tratadas (15 minutos antes da pré-contracção por PE) com o inibidor de fosfodiesterase 5 , vardenafil (0,1 μM).

As respostas máximas encontradas não coincidem com o efeito máximo, pois não dispúnhamos de droga e, conseqüentemente, não foram também possíveis os cálculos das EC_{50} .

3.3. Determinação do efeito do ANP e UGN sobre o nível intracelular de AMPc e GMPc.

3.3.1. Amostras experimentais

As tiras de corpos cavernosos humanos foram montadas em banhos para registro isométrico contendo solução de Krebs Henseleit. Após o período de estabilização, de aproximadamente 1h, as tiras desses tecidos foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C até o dia do experimento para realização dos controles basais.

Num outro grupo de experimentos, os tecidos após o período de estabilização foram expostos à UGN ($10\mu\text{M}$) ou ao ANP ($10\mu\text{M}$) até que fosse observado o relaxamento máximo produzido por esses agonistas. Após esse relaxamento, as tiras de corpos cavernosos humanos, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C até o dia do experimento.

Ambos os protocolos experimentais foram realizados na presença de inibidores de fosfodiesterase 5, com a finalidade de não degradar o GMPc produzido.

3.3.2. Método de dosagem de nucleotídeos cíclicos

Todas as amostras foram descongeladas e o tecido foi então homogeneizado em tubos contendo solução de Krebs Henseleit gelado (1mL). Após completa maceração do tecido, alíquotas de todas as amostras foram separadas para dosagem de proteínas (200µL) pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o restante (800µL) foi processado para dosagem de nucleotídeos cíclicos.

Ao homogeneizado dos tecidos foi adicionado ácido tricloroacético (TCA–10%). Em seguida, as amostras foram agitadas e posteriormente centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Então, o sobrenadante foi removido e o precipitado descartado. O sobrenadante foi lavado com éter dietílico saturado de água (em um volume 4 vezes maior que o volume da amostra) e a fração etílica foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens, as amostras foram secas em atmosfera de nitrogênio a 60°C e ressuspensas no tampão de ensaio do “kit imunoenzimático” para dosagem de AMPc/GMPc. As concentrações foram expressas em picomol por mg de proteína.

3.4. Expressão de receptores de membrana GC-A, GC-B, GC-C e NPR-C em corpos cavernosos humanos

3.4.1. Isolamento de RNA total

O RNA total das amostras de corpos cavernosos humanos foram isolados utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras em questão foram trituradas e homogeneizadas com 1mL do reagente Trizol para cada 50-100 mg de tecido e, em seguida, centrifugado a 13.000 x g na temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado e a este adicionamos 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol utilizado, realizando assim a fase de separação. Essa mistura foi novamente centrifugada em mesma velocidade e temperatura anterior e o sobrenadante coletado. Iniciou-se, em seguida, a fase de precipitação e lavagem, usando álcool isopropílico (100%) e etanol (75%), respectivamente. Cada um destes procedimentos foi seguido por centrifugação das amostras. A etapa de lavagem foi executada duas vezes. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em água miliQ autoclavada. A quantidade e qualidade do RNA total isolado foi avaliado por espectrofotometria utilizando comprimento de onda a 260 nm e a razão 260/280 nm, respectivamente.

3.4.2. Reação de Transcriptase reversa

Para analisarmos o nível de expressão gênica de proteínas que estão sendo efetivamente expressas partiu-se inicialmente do RNA transcrito. Como o RNA é uma molécula muito mais sensível que o DNA os estudos de expressão gênica foram realizados a partir de um DNA complementar, ou

cDNA. Este cDNA é produzido a partir do RNAm, através de uma reação catalizada pela enzima transcriptase reversa. Esta enzima transforma uma molécula molde de RNAm em uma fita simples de DNA complementar ao RNA inicial. Esta fita simples serviu de molde para a reação em cadeia polimerase. Para produzir-se cDNA a partir do RNA total utilizamos o kit de transcriptase reversa ThermoScript™ Reverse Transcriptase System (Invitrogen, USA). Resumidamente, uma quantidade de 2µg de RNA total extraído foi adicionado a um tubo eppendorf (0,2µL) contendo 1µL de primer oligo(dT)₂₀ (50µM), 2µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (dNTP mix, 10mM) e água miliQ autoclavada para um volume de 12µL. Essa primeira mistura (reação A) foi aquecida a 65°C para a desnaturação do RNA e anelamento do primer oligo(dT)₂₀ com a cauda polyA do RNA mensageiro por 5 minutos. Imediatamente após este período, a reação foi resfriada em gelo. Durante os 5 minutos acima mencionados preparou-se uma reação B que continha: 4µL de tampão de síntese de cDNA (5X), 1µL de DTT (0,1M), 1µL de uma solução RNaseOUT (40U/µL), 1µL de água miliQ autoclavada e 1µL da enzima ThermoScript™ RT (15 unidades/µL). A esta reação B, de 8µL, adicionou-se a reação A devidamente resfriada. O tubo contendo as duas misturas foi levado a um termociclador onde permaneceu por 60 minutos a uma temperatura de 50°C. Passado este período, a reação foi aquecida a uma temperatura de 85°C por 5 minutos e então resfriada imediatamente a uma temperatura de 4°C. O cDNA pronto foi imediatamente usado na reação em cadeia polimerase descrita a seguir.

3.4.3. Reação em cadeia polimerase (PCR)

A reação de PCR consistiu da seguinte mistura:

- ✓ 1x tampão de PCR (10X)
- ✓ 1,5mM de MgCl₂ (50mM)
- ✓ 0,2mM de deoxinucleotídeos (10mM cada)
- ✓ 0,2μM primer senso (2μM)
- ✓ 0,2μM primer antisenso (2μM)
- ✓ 1μL de cDNA
- ✓ 0,025 U/μL de Taq DNA polimerase (Invitrogen)
- ✓ Água miliQ autoclavada para completar volume final de 10μL

A reação seguiu para o termociclador que foi iniciada com uma temperatura de desnaturação de 94°C por 5 minutos. Em seguida, foram realizados 35 ciclos de amplificação com uma temperatura de 94°C por 30 segundos, uma fase de anelamento por 30 segundos nas temperaturas de 58°C para os *primers* dos receptores de guanilato ciclase A e C (GC-A e GC-C), para o receptor de fator natriurético C (NPR3) e para β-actina. Para o *primer* do receptor de guanilato ciclase B (GC-B) utilizamos a temperatura de anelamento de 62°C. Em seguida, foi programada uma extensão dos produtos por 1 minuto a 72°C. Ao término destes 35 ciclos foi executada uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Na TABELA 01, mostramos a seqüência dos *primers* utilizados.

A presença ou não dos produtos acima descritos foi realizado a partir da fotodocumentação das bandas eletroforéticas de géis de agarose (1,2%), corados com brometo de etídio. Os géis foram fotodocumentados pelo equipamento Gel Doc EQ System (Biorad-USA) utilizando o software (Quantity one Basic Software – Biorad, USA).

| Primers | Senso (5' - 3') | Antisenso (5' - 3') |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| GC-A | TGCCTTCAGAACCCCTCATGC | CACTGACATCCTGCCCATCC |
| GC-B | GCTGATAAGAGCCCGGAAG | TCCCCAGAATCCAGGTCTCC |
| GC-C | AGTGACCTTGGATGACTGGG | AGCTCCAGTGAGGGTGAAA |
| NPR3 | GCAGGTGCTGTGTTACTGC | CCTCCTAAGCCACCTGGAAG |
| b-actina | ATCCTCACCCCTGAAGTACCC | CAGCCTGGATAGCAACGTC |

TABELA 01: Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de polimerase em cadeia.

3.5. Análise Estatística

Os dados de % do platô de contração induzidas por PE (1 μ M) e dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc (pmol/mg de proteína) foram expressos como média \pm erro padrão da média.

O logaritmo negativo das concentrações necessárias para indução de 50% da resposta máxima (pD₂ = cologarítmo de EC₅₀) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados por regressão não-linear com auxílio do programa de computador GraphPad Prism 5.0.

As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliados por intermédio de análise de variância (ANOVA) seguindo do teste de Tukey-Kramer com confiança de 95% (curva de relaxamento), assim como, para os níveis de nucleotídeos cíclicos, considerando também um nível de confiança de 95%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da UGN sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos

Em experimentos iniciais, foram realizadas curvas concentração-resposta induzidas por uroguanilina (UGN) em tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídas por fenilefrina 1 μ M. As respostas foram mensuradas em relação ao percentual de contração evocada pela fenilefrina. Dessa forma, UGN foi testada nas doses de 10pM a 300nM, cumulativamente. UGN relaxou as tiras de corpos cavernosos humanos de maneira dose-dependente. E a resposta relaxante máxima encontrada para a UGN, na concentração de 300nM, foi de 40,44 \pm 8,20% (* p < 0,05 vs controle), como mostrado na FIGURA 08.

4.2. Efeito do ANP sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos

Foram realizadas, de forma idêntica a anterior, curvas concentração-resposta para o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), nas concentrações de 10pM a 30nM, de maneira cumulativa. Como mostrado na FIGURA 09, o ANP também promoveu um relaxamento em tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídas por fenilefrina 1 μ M. A resposta relaxante máxima encontrada para o ANP, na concentração de 30nM, de 48,92 \pm 4,80% (* p < 0,05 vs controle).

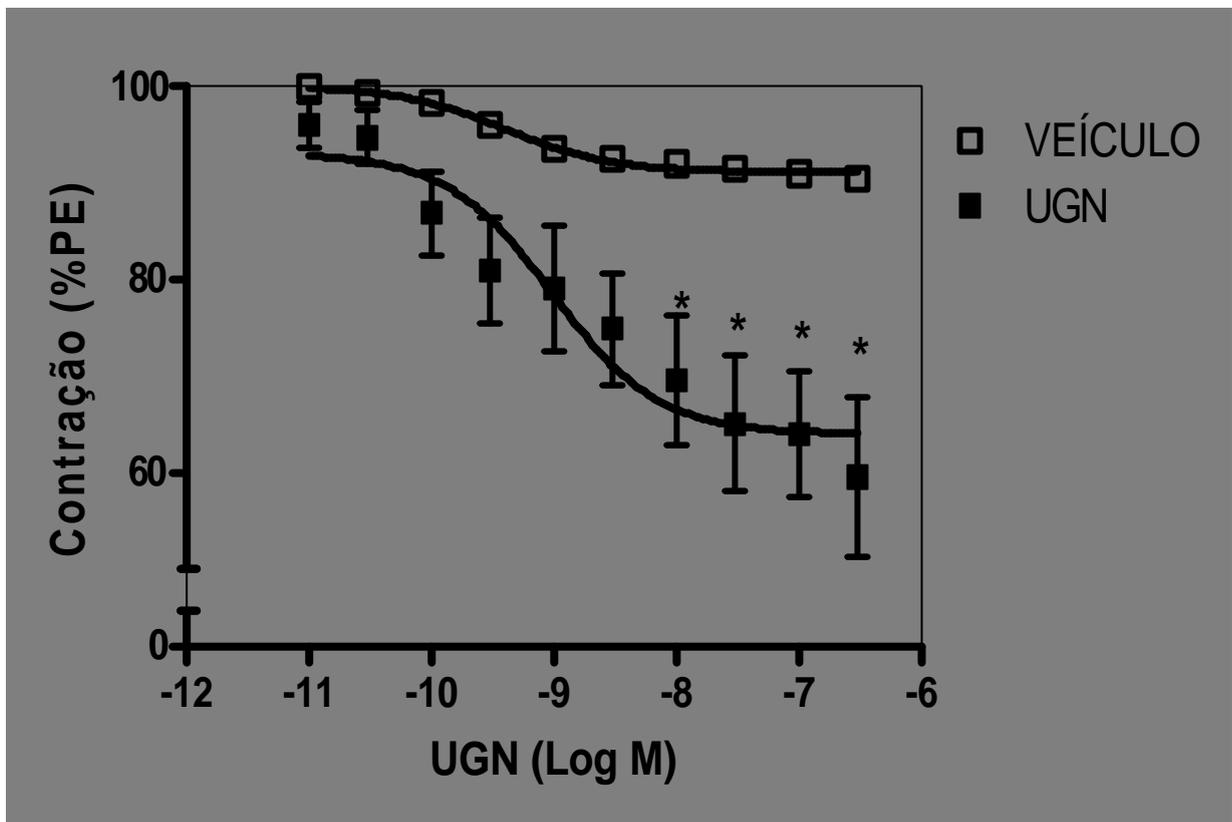


FIGURA 08: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN) nas concentrações de 10pM a 30nM em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p< 0,05 vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs Controle (veículo).

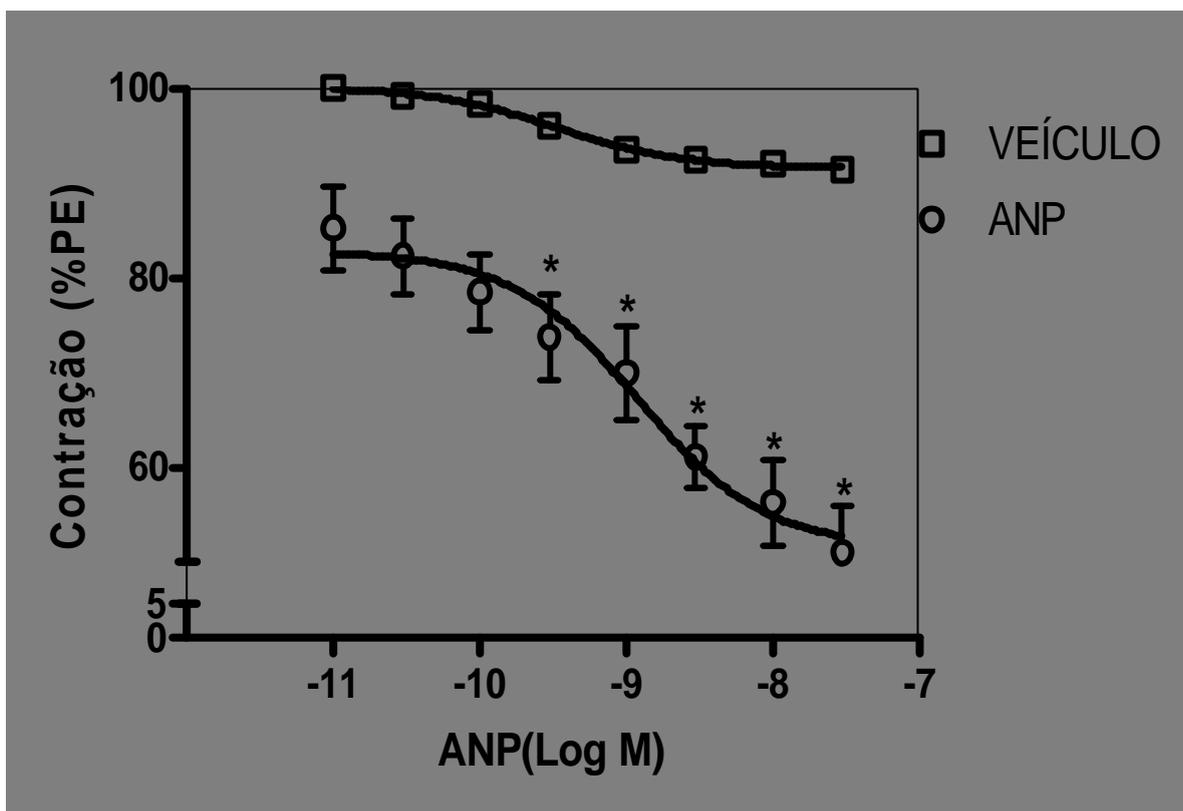


FIGURA 09: Efeito relaxante do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), nas concentrações de 10pM a 30nM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contráidos com fenilefrina 1 μ M. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1 μ M. *p < 0,05 vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs Controle (veículo).

4.3. Efeito da enterotoxina termoestável e *Escherichia coli* (STa) sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos

Em outro grupo de experimentos, utilizamos outro agonista de GC-C, a enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* (STa). Foram realizadas curvas concentração-resposta em tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídos por fenilefrina 1 μ M. STa foi testada nas seguintes concentrações: 0,1pM a 1 μ M, de maneira cumulativa. STa também promoveu o relaxamento nas tiras de corpos cavernosos humanos, com uma resposta relaxante máxima, na concentração de 1 μ M, de 45,03 \pm 7,50% (* p < 0,05 vs controle), como mostrado na FIGURA 10.

4.4. Efeito da UGN versus ANP sobre o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos

Realizados os protocolos semelhantes aos anteriores, observamos que UGN e ANP, de modo bastante semelhante, apresentaram efeito relaxante na musculatura lisa cavernosa, diferindo, entretanto, na magnitude de seus relaxamentos máximos, que foram de: 40,44 \pm 8,20% (* p < 0,05 vs controle) e 48,92 \pm 4.80% (* p < 0,05 vs controle). Quando comparamos as concentrações máximas utilizadas em comum para ANP e UGN, a de 30nM, elas mostraram-se estatisticamente não significantes (p > 0,05), resultados estes mostrados na FIGURA 11.

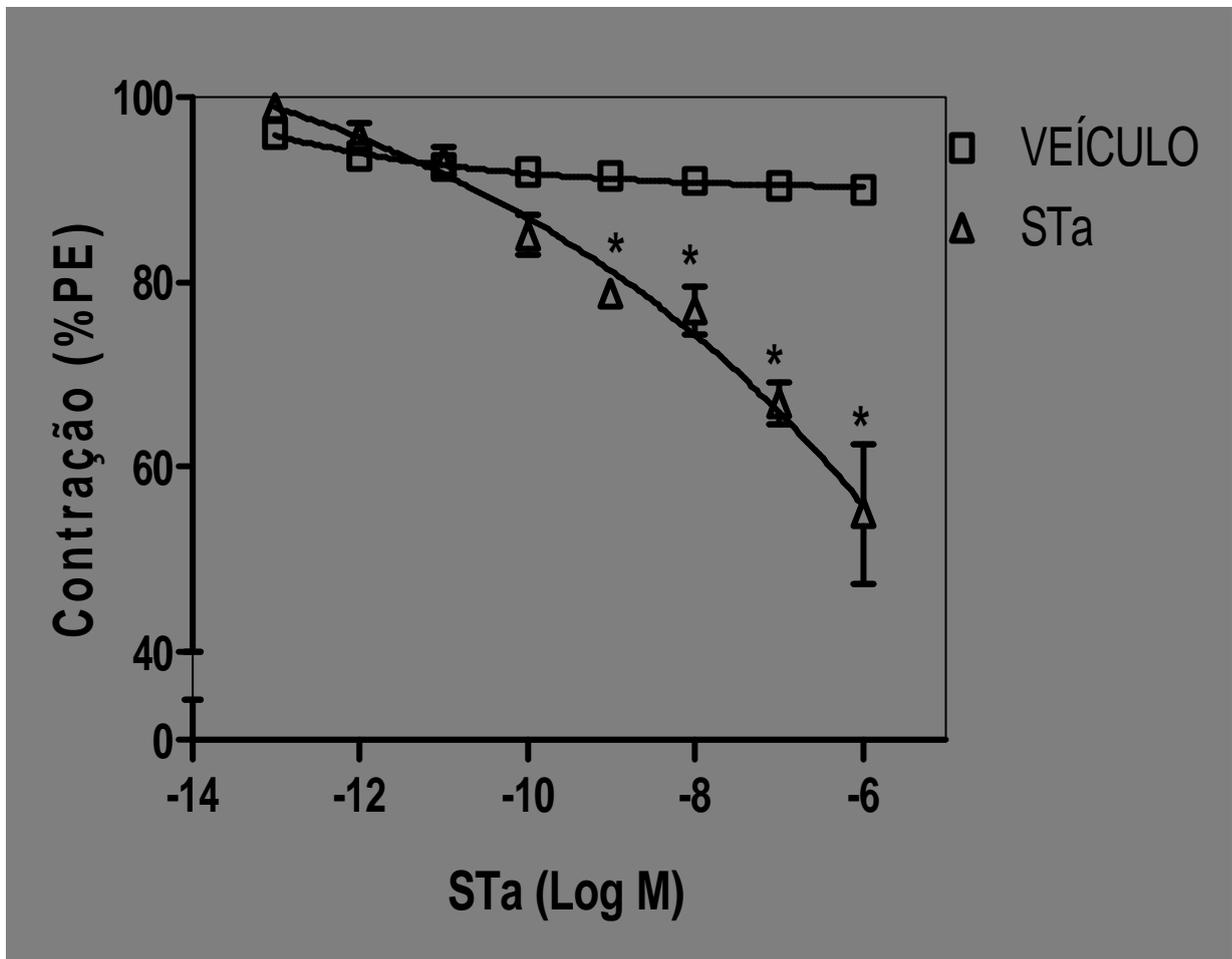


FIGURA 10: Efeito relaxante da enterotoxina termoestável de *Escherichia coli* (STa) em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1 μ M. * $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs Controle (veículo).

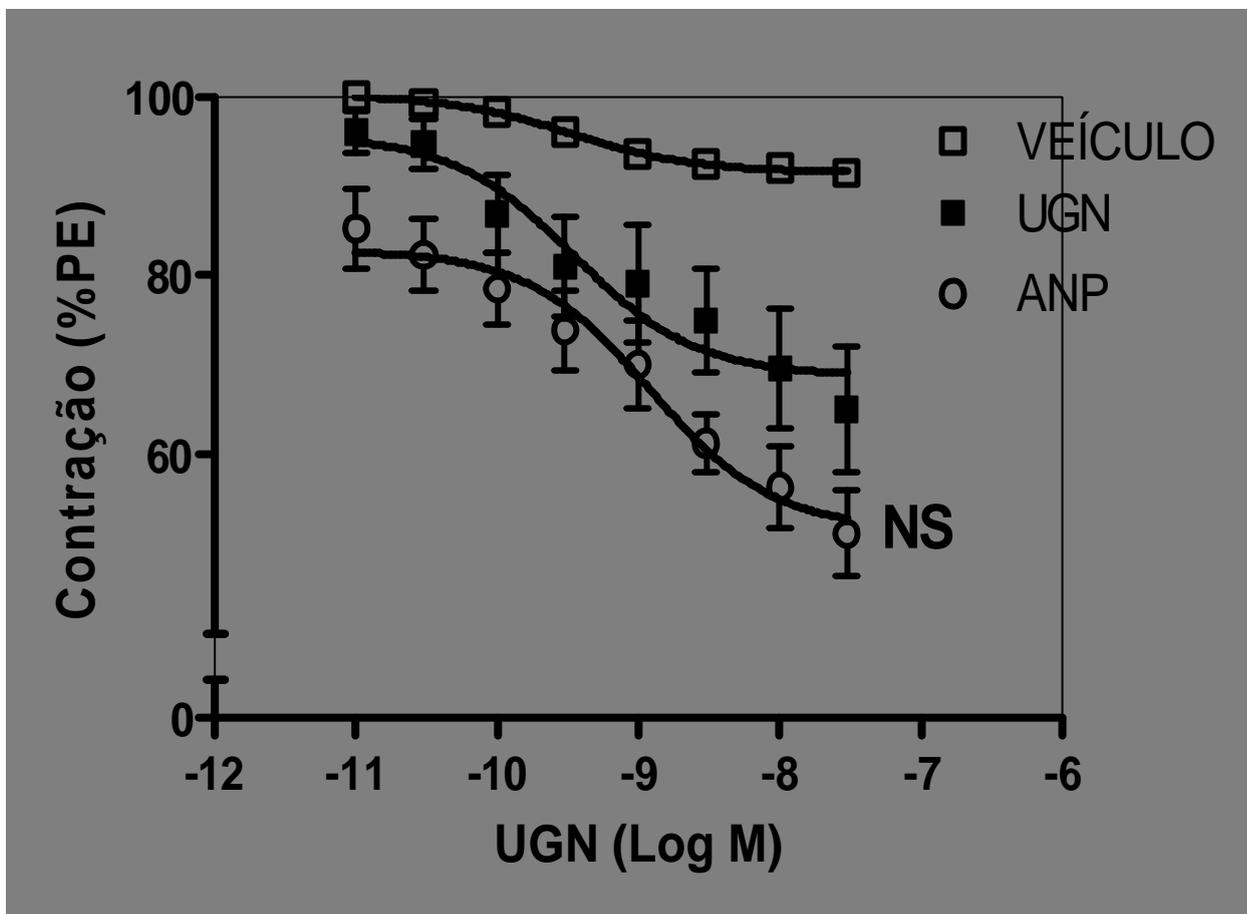


FIGURA 11: Efeito relaxante da uroguanilina versus Peptídeo Natriurético Atrial em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1 μ M. NS (não significativos) entre UGN e ANP $p > 0,05$, ANOVA seguida de Teste de Tukey.

4.5. Avaliação do efeito de inibidores da Óxido Nítrico Sintase (NOS) no efeito relaxante da UGN em corpos cavernosos humanos.

A resposta relaxante máxima da uroguanilina em tiras de corpos cavernosos humanos foi de $55,0 \pm 7,5\%$ (* $p < 0,05$ vs controle). A FIGURA 12 mostra o efeito de um inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS), L-NAME, na concentração de $100\mu\text{M}$. A resposta máxima relaxante foi de $52,6 \pm 5,7\%$, mostrando uma ausência significativa de efeito ($p > 0,05$ vs UGN).

Enquanto que a FIGURA 13 mostra a resposta relaxante máxima em tiras de corpos cavernosos humanos previamente incubados com um inibidor da isoforma neuronal da Óxido Nítrico Sintase (NOS_n). A resposta relaxante máxima foi de $46,12 \pm 3,20\%$, também não demonstrando um efeito significativo ($p > 0,05$ vs UGN).

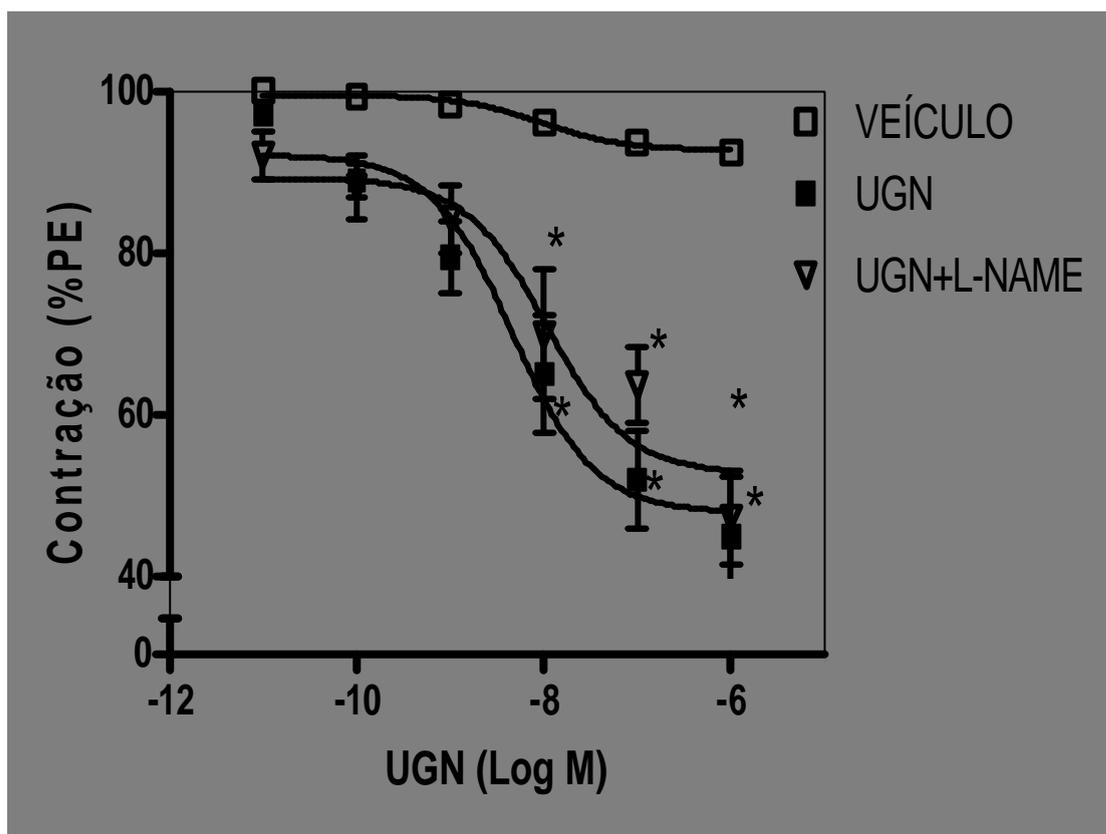


FIGURA 12: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN) quando pré-incubado com L-NAME, um inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS)-100µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p< 0,05 vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo).

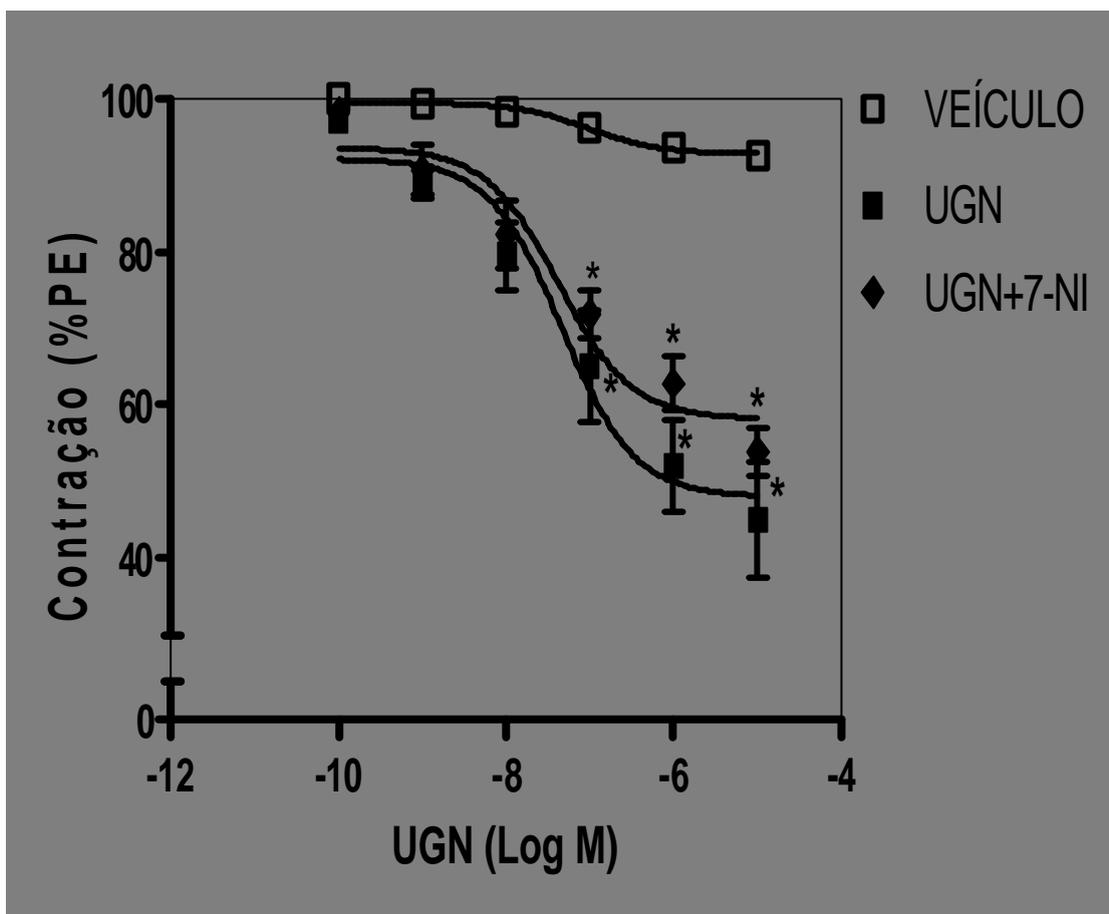


FIGURA 13: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN) quando pré-incubado com um inibidor da Isoforma Neuronal da Óxido Nítrico Sintase, 7-NI 100µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p < 0,05 vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo).

4.6. Avaliação da participação da via GCs no efeito relaxante em corpo cavernoso de humanos através da UGN.

A resposta relaxante máxima da uroguanilina em tiras de corpos cavernosos humanos, na concentração de $3\mu\text{M}$, foi de $61,22 \pm 6,00\%$ (* $p < 0,05$ vs controle). Quando os tecidos foram pré-incubados com ODQ $10\mu\text{M}$, um inibidor da GCs, a resposta relaxante da UGN foi reduzida a $31,36 \pm 12,86\%$ ($p > 0,05$ vs UGN), entretanto, esses valores não se apresentaram estatisticamente significantes, como mostrado na FIGURA 14.

4.7. Avaliação do bloqueio de GCm na resposta relaxante da UGN em corpo cavernoso de humanos.

A FIGURA 15 mostra o efeito da UGN versus um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, a Isatina, na concentração de $10\mu\text{M}$, adicionado 30 minutos antes das curvas doses-resposta a UGN. Sendo a resposta relaxante máxima reduzida a $19,98 \pm 17,00\%$ (* $p < 0,05$ vs controle), mostrando um bloqueio de aproximadamente 50%, quando comparada a UGN.

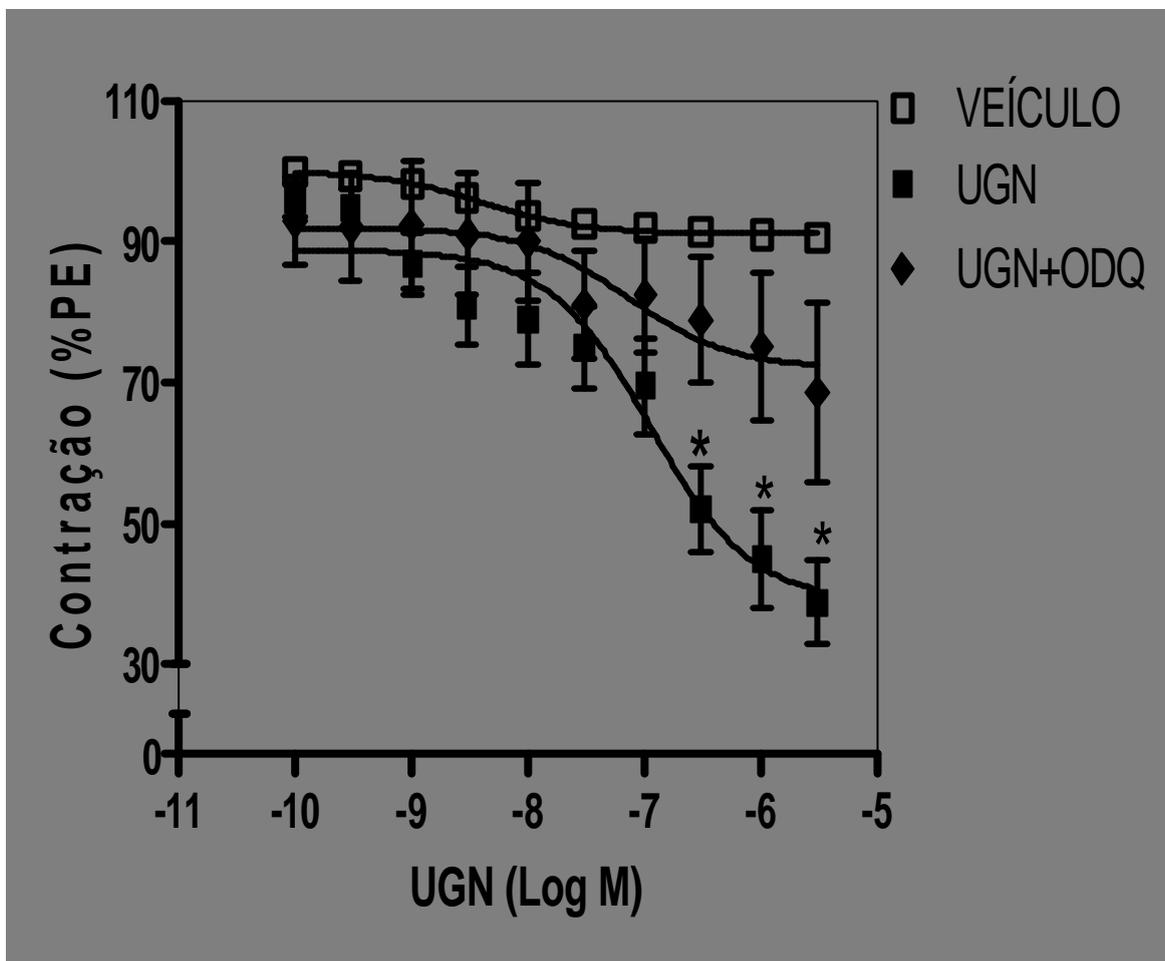


FIGURA 14: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN) quando pré-incubado com um inibidor de guanilato ciclase solúvel, ODQ 10µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p< 0,05 vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo).

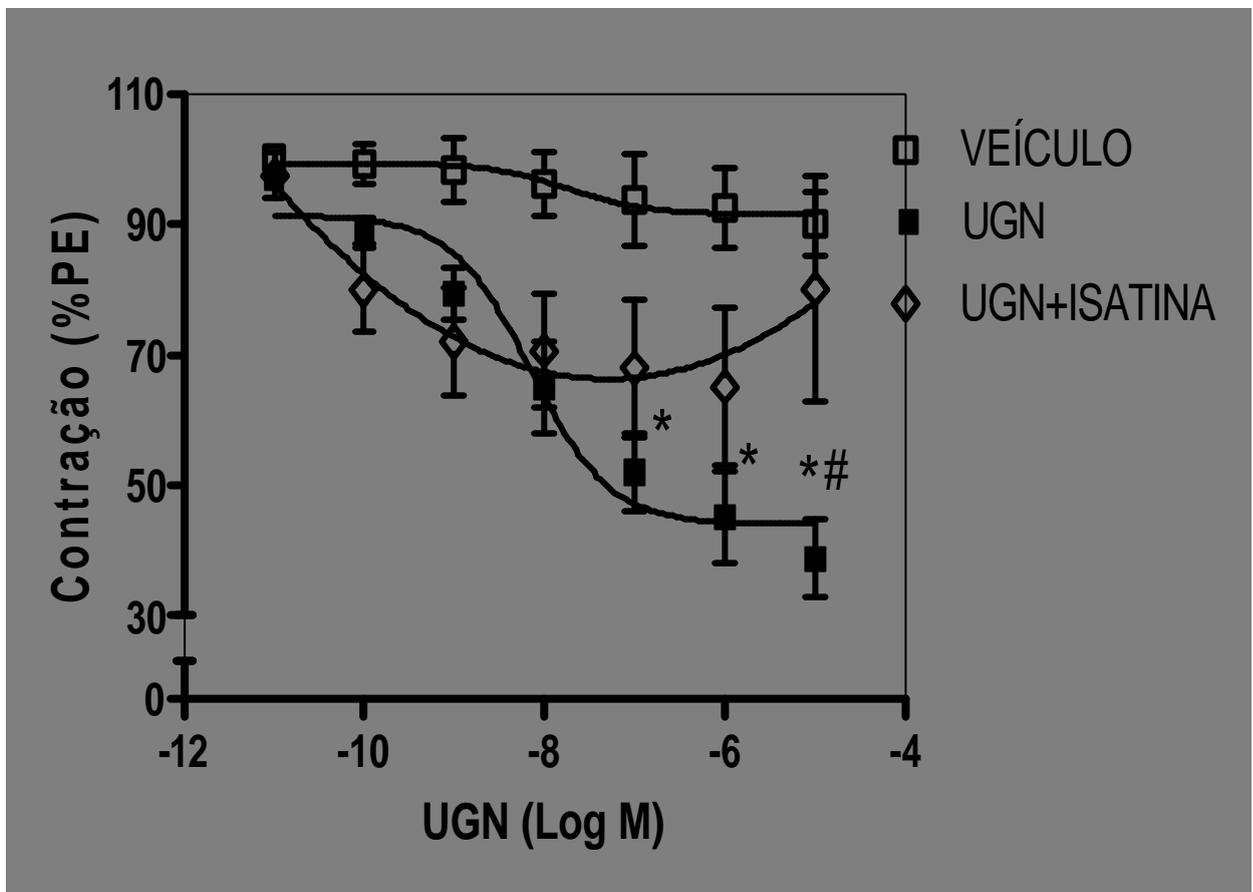


FIGURA 15: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN), quando pré-incubado com um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, Isatina 10µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=6) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p < 0,05 vs. controle e *#p < 0,05 vs. UGN+isatina, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo e UGN).

4.8. Avaliação do bloqueio de GCm no efeito relaxante em corpo cavernoso de humanos através de ANP e STa.

A FIGURA 16 mostra o efeito da enterotoxina termoestável de *E.coli* (STa) em tiras de corpos cavernosos humanos na presença de um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, a isatina 10 μ M. A resposta relaxante máxima de STa foi de $45,03 \pm 7,56\%$ (*p < 0,05 vs controle). E quando pré-incubado, por 30 minutos, com isatina, a resposta relaxante máxima de STa+isatina foi de $24,68 \pm 3,11\%$ (#*p < 0,05 vs STa), mostrando um bloqueio de aproximadamente 60%, quando comparado com STa.

Por outro lado, a FIGURA 17 mostra o efeito do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) em tiras de corpos cavernosos humanos, também na presença de um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, a isatina 10 μ M. A resposta relaxante máxima de ANP foi de $48,92 \pm 4,81\%$ (*p < 0,05 vs controle). E quando pré-incubado, por 30 minutos, com isatina, a resposta relaxante máxima de ANP+isatina foi de $25,53 \pm 5,04 \%$ (#*p < 0,05 vs ANP), exibindo um bloqueio de aproximadamente 50% quando comparado ao ANP.

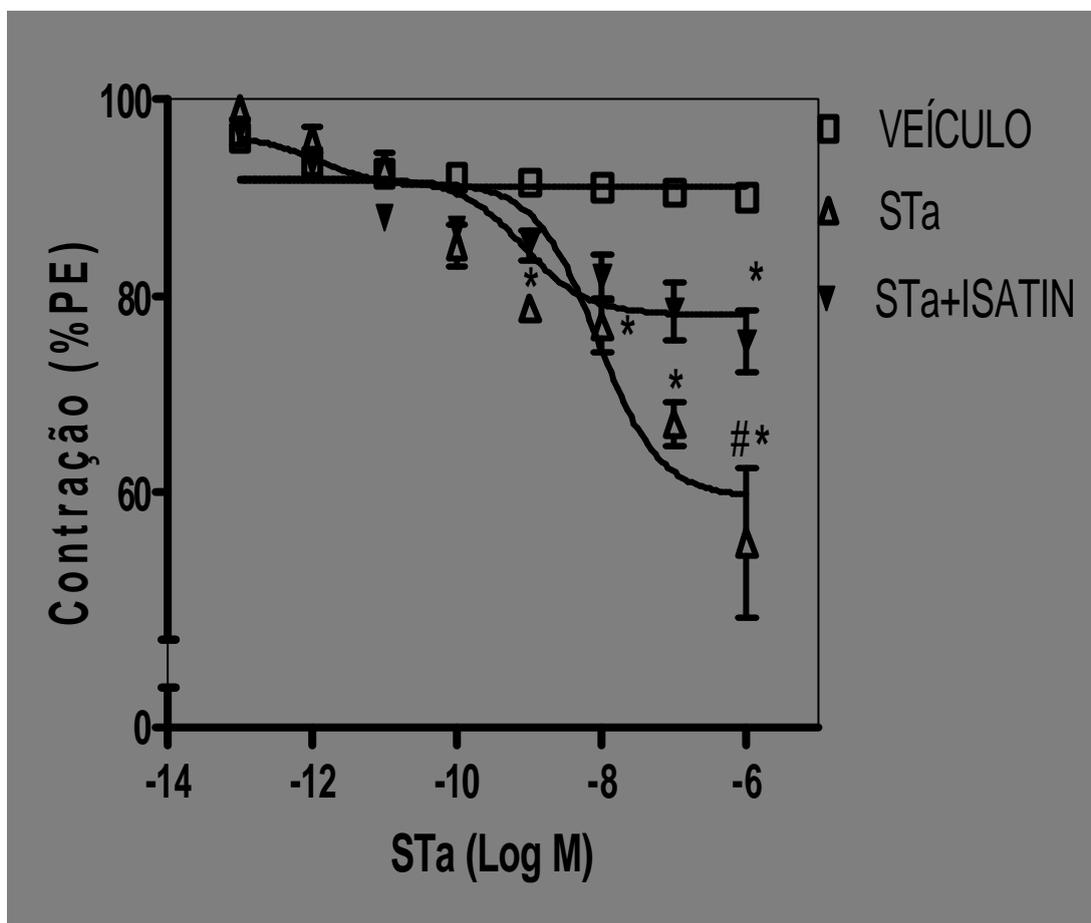


FIGURA 16: Efeito relaxante da enterotoxina termoestável de *E.coli* (STa) quando pré-incubado com um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, isatina 10µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contráidos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p < 0,05 vs controle e *#p < 0,05 vs STa+isatina, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo e STA).

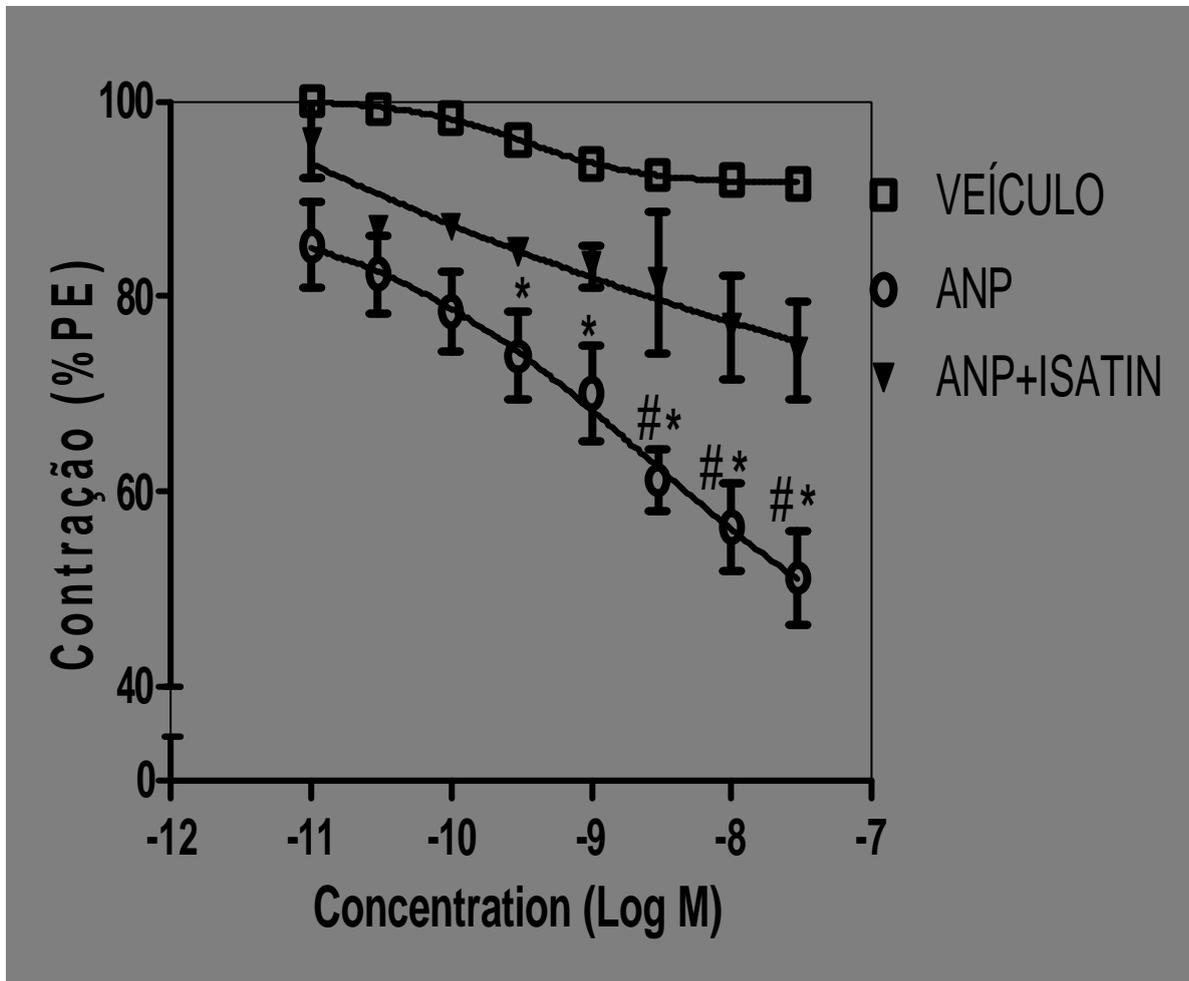


FIGURA 17: Efeito relaxante do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) quando pré-incubado com um inibidor inespecífico de guanilato ciclase de membrana, isatina 10 μ M, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1 μ M. *p < 0,05 vs. controle e #p < 0,05 vs. ANP+isatina, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo e ANP).

4.9. Efeito de bloqueadores de canais de potássio no efeito relaxante da UGN em corpo cavernoso humano.

A resposta relaxante máxima da uroguanilina em tiras de corpos cavernosos humanos foi de $61,22 \pm 6,00\%$ (* $p < 0,05$ vs controle). A FIGURA 18 mostra o efeito da uroguanilina quando pré-incubado, durante 30 minutos, com um bloqueador de canais de K^+ ativados por ATP, a glibenclamida, na concentração de $100\mu\text{M}$, sendo a resposta relaxante máxima diminuída a $47,07 \pm 8,2\%$ ($p > 0,05$ vs UGN), não apresentando um efeito significativo. E mais abaixo, a FIGURA 19 mostra o efeito da UGN sobre canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta, média e de baixa condutância, utilizando para isso, uma associação de bloqueadores, Iberotoxina $1\mu\text{M}$ + Apamina $0,1\mu\text{M}$. O percentual de relaxamento máximo antes e após a incubação com os bloqueadores anteriormente mencionados foram de $50,22 \pm 6,58\%$ (* $p < 0,05$ vs controle) e $38,15 \pm 4,63\%$, respectivamente. Esse resultado mostrou-se não significativo ($p > 0,05$ vs UGN).

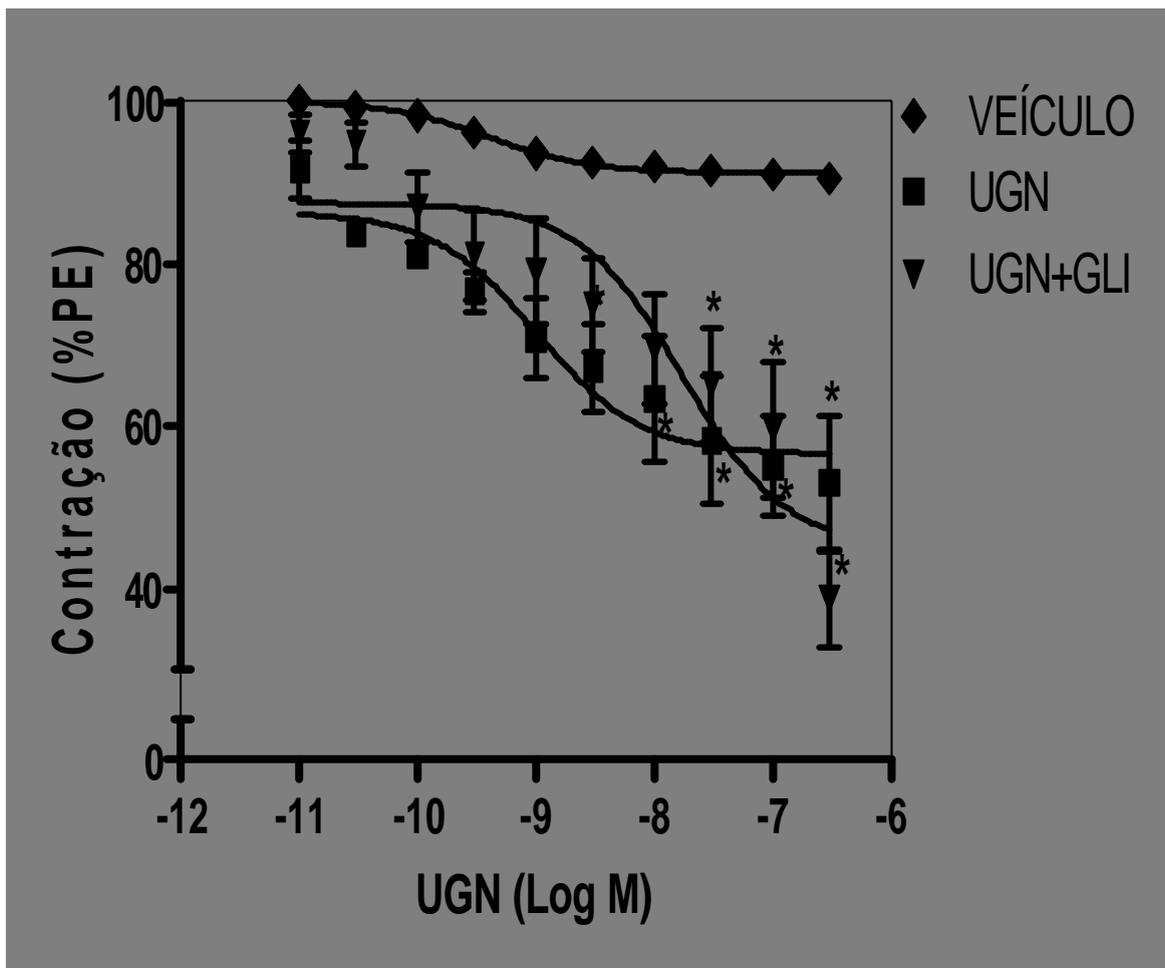


FIGURA 18: Efeito relaxante da uroguanilina (UGN) quando pré-incubado com um bloqueador de canais de K^+ ativados por ATP, glibenclamida - $100\mu M$, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contráidos com fenilefrina $1\mu M$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média ($n=6$) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina $1\mu M$. * $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo).

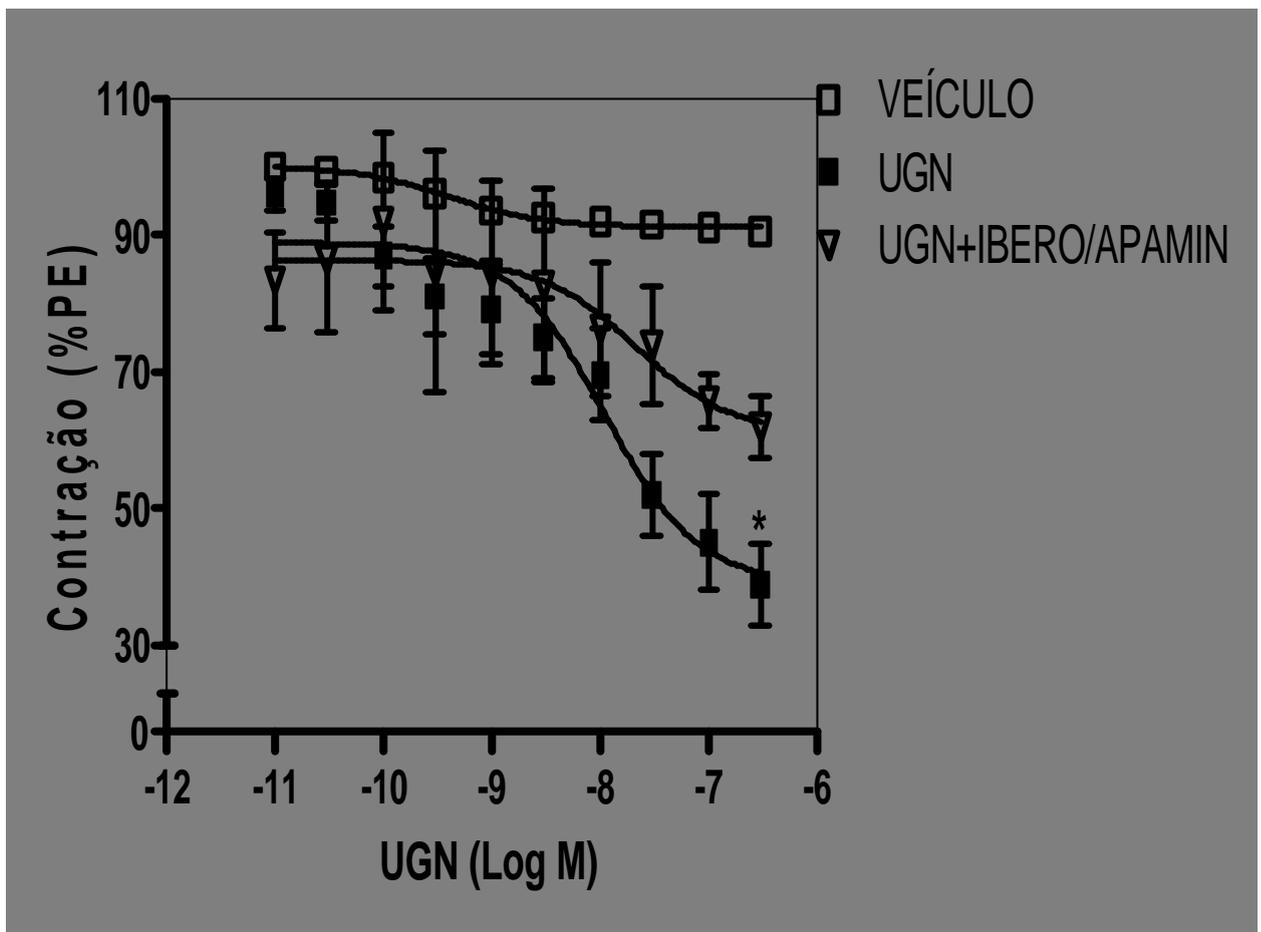


FIGURA 19: Efeito relaxante da uroguanilina(UGN) quando pré-incubado com um bloqueador de canais de K^+ ativados por Ca^{++} de alta, média e de baixa condutância – Iberotoxina $1\mu M$ + Apamina $0,1\mu M$, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina $1\mu M$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média ($n=6$) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina $1\mu M$. * $p < 0,05$ vs. controle, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo).

4.10. Efeito do bloqueio de PDE 5 no efeito relaxante da UGN em corpos cavernosos humanos.

A resposta relaxante máxima da UGN em tiras de corpos cavernosos humanos foi de $55,0 \pm 7,5\%$ (* $p < 0,05$ vs controle). A FIGURA 20 mostra o efeito da Vardenafila, um inibidor seletivo de fosfodiesterase 5 (PDE 5), na concentração de $0,1\mu\text{M}$, sendo a resposta relaxante máxima de $98,6 \pm 1,4\%$ (* $p < 0,05$ vs controle).

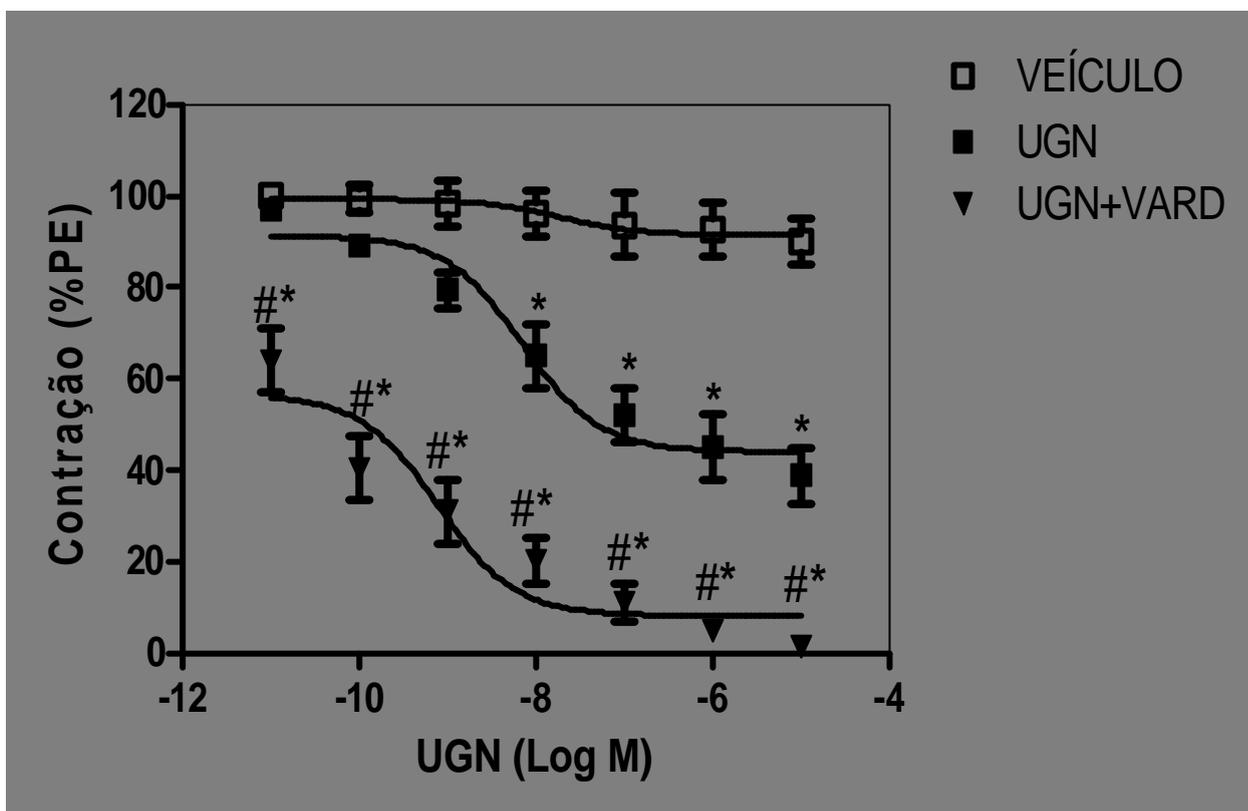


FIGURA 20: Efeito relaxante da uroguanilina(UGN) quando pré-incubado com um inibidor de fosfodiesterase 5, vardenafila-0,1µM, em tiras de corpos cavernosos humanos, pré-contraídos com fenilefrina 1µM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 1µM. *p < 0,05 vs. controle e #* p < 0,05 vs. UGN, ANOVA seguida de Teste de Tukey vs controle (veículo e UGN).

4.11. Mensuração dos níveis de AMPc e GMPc em tiras de corpos cavernosos humanos expostos a ANP e UGN.

4.11.1. GMPc

A FIGURA 21 mostra os resultados referentes às dosagens do nucleotídeo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), previamente incubados com inibidor de PDE 5, em amostras de corpos cavernosos humanos. Níveis de GMPc estão expressos em pmol de GMPc/mg de proteína, sendo os valores encontrados: $9,72 \pm 1,36$ pmol/mg de proteína, $69,95 \pm 5,72$ pmol/mg de proteína e $59,97 \pm 9,35$ pmol/mg de proteína para os nossos controles basais, UGN e ANP, respectivamente.

4.11.2. AMPc

A FIGURA 22 mostra os resultados referentes às dosagens do nucleotídeo monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) em amostras de corpos cavernosos humanos. Níveis de AMPc estão expressos em pmol de AMPc/mg de proteína, sendo os valores encontrados: $279,97 \pm 41,32$ pmol/mg de proteína, $322,93 \pm 32,35$ pmol/mg de proteína e $309,38 \pm 66,52$ pmol/mg de proteína, para os controles basais, UGN e ANP, respectivamente.

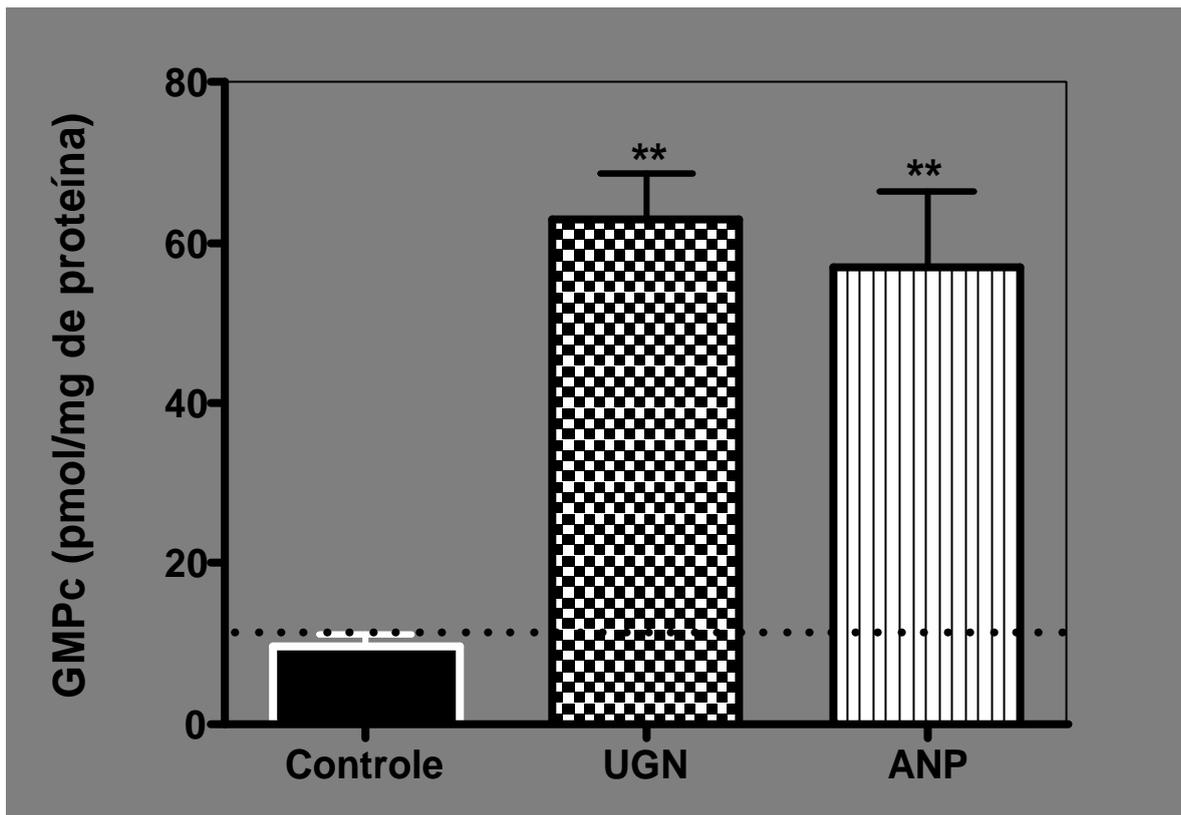


FIGURA 21: Medida de GMPc em tiras de corpos cavernosos humanos exposto a salina (controle), UGN (10 μ M) e ANP (1 μ M). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey (n=4 em duplicata). Os níveis de GMPc são expressos como média \pm SEM.

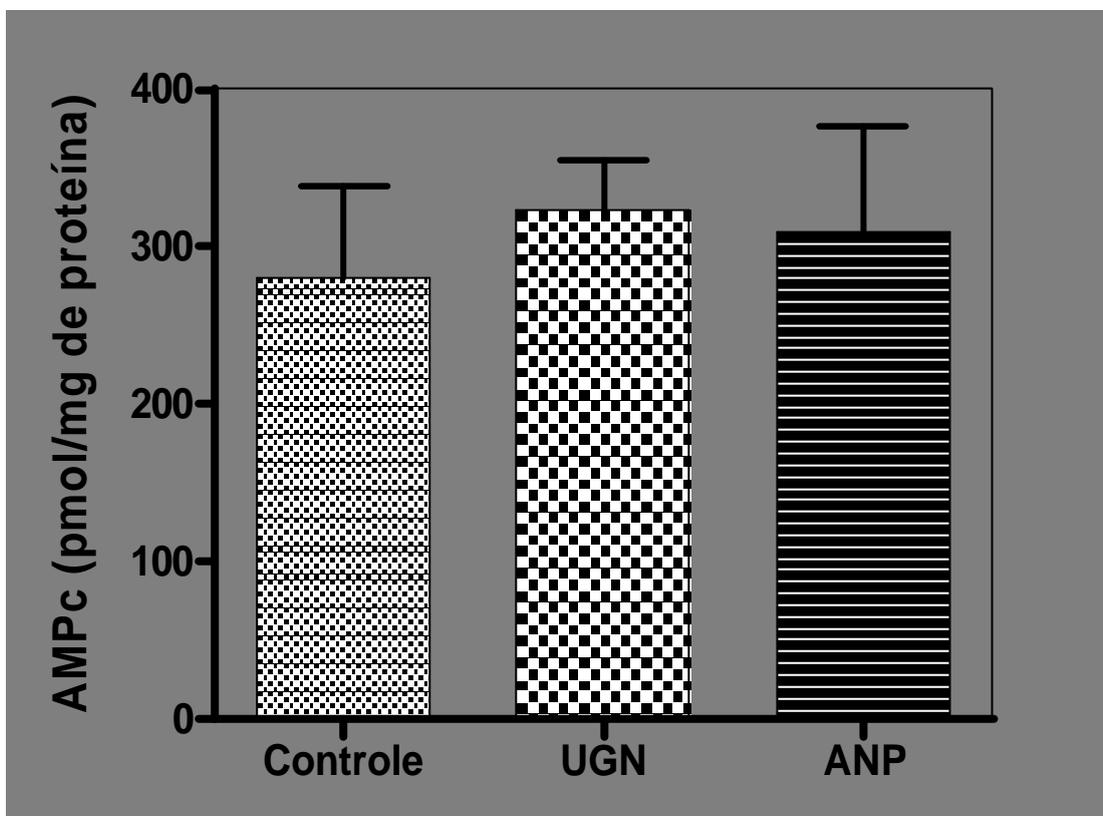


FIGURA 22: Medida de AMPc em tiras de corpos cavernosos humanos exposto a salina (controle), UGN (10 μ M) e ANP (1 μ M). Os níveis de AMPc são expressos como média \pm SEM $p > 0,05$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey (n=4 em duplicata).

4.12. Expressão de receptores de membrana para peptídeos (GC-A, GC-B, GC-C e NPR-C) em corpos cavernosos humanos.

4.12.1. GC-A

A FIGURA 23 é representativa de resultados referentes à expressão de receptores de membrana do tipo guanilato ciclase A (GC-A), através de técnicas de RT-PCR. Esse receptor tem como agonista preferencial o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP), o qual, utilizamos como controle nos nossos experimentos *in vitro*. São mostrados os resultados referentes a 8 amostras de corpos cavernosos humanos, estando a isoforma GC-A expressa em todas as amostras do tecido estudado e em seguida a expressão dos controles positivos duodeno e aorta de humanos, respectivamente.

4.12.2. GC-B

A FIGURA 24 é representativa de resultados referentes à expressão de receptores de membrana do tipo guanilato ciclase B (GC-B), através de técnicas de RT-PCR e visualização através de Gel de Agarose. Esse receptor tem como ligante o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) e o Peptídeo Natriurético Cerebral (CNP), tendo este último maior afinidade pelo receptor em questão. Em seguida são mostrados os resultados referentes a 8 amostras de corpos cavernosos humanos, estando a isoforma GC-B expressa em todas as amostras do tecido estudado, e logo em seguida, a expressão dos controles positivos em duodeno e aorta de humanos, respectivamente.

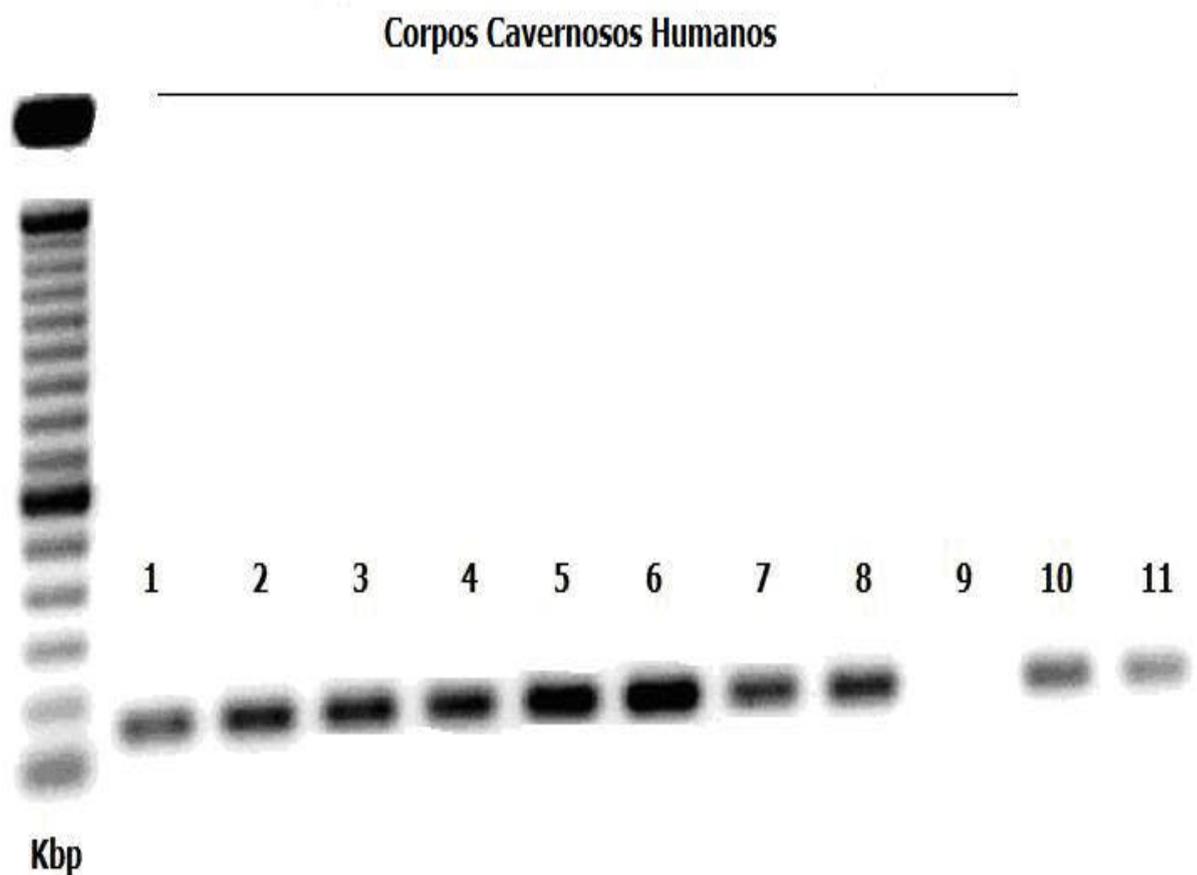


FIGURA 23: Análise de RT-PCR da Isoforma Guanilato ciclase A (GC-A) em amostras de corpos cavernosos humanos. Amostras de 1 a 8 referentes as amostras testadas. Número 9 o controle negativo, seguidos dos controles positivos e amostras 10 e 11, de GC-A em duodeno e aorta de humanos, respectivamente.

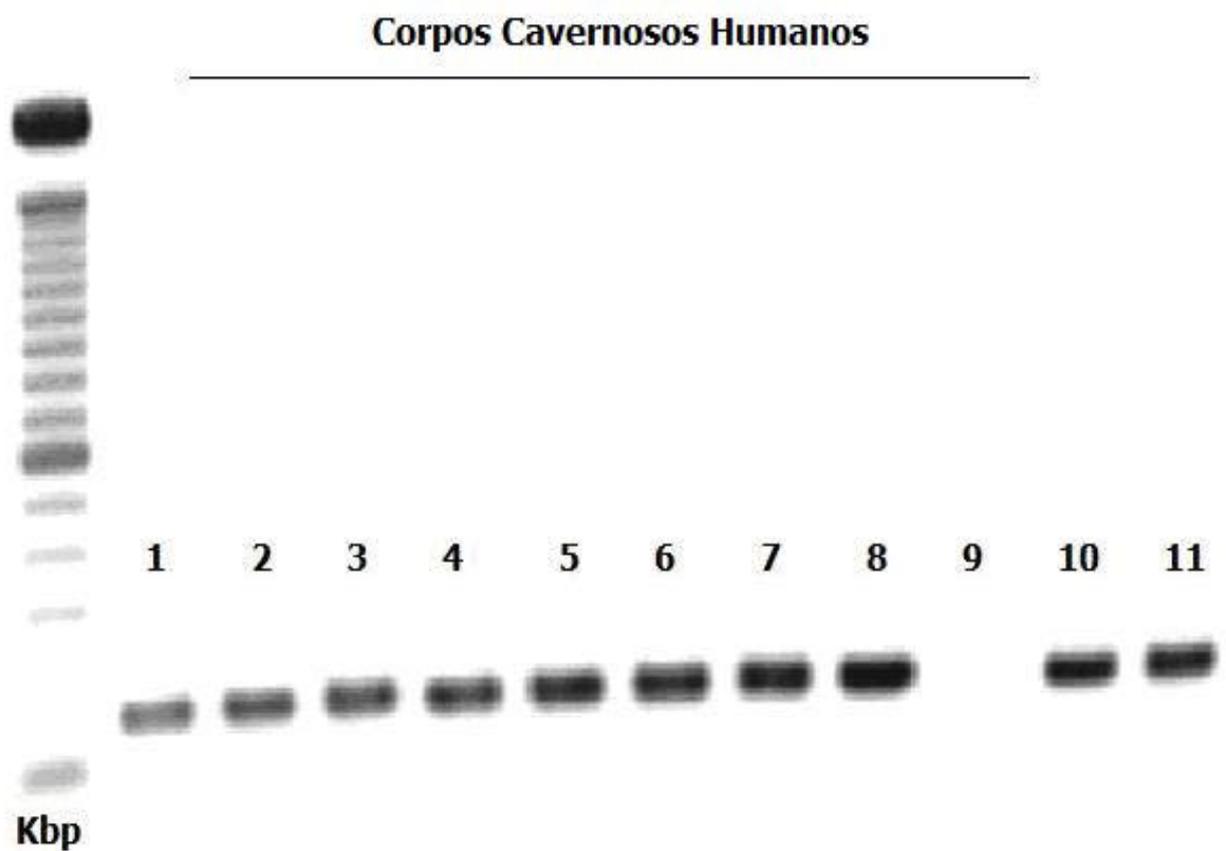


FIGURA 24: Análise de RT-PCR da Isoforma Guanilato ciclase B (GC-B) em amostras de corpos cavernosos humanos. Amostras de 1 a 8 referentes as amostras testadas. Número 9 o controle negativo, seguidos dos controles positivos e amostras 10 e 11, de GC-B em duodeno e aorta de humanos, respectivamente.

4.12.3. GC-C

A FIGURA 25 é representativa de resultados referentes à expressão de receptores de membrana do tipo guanilato ciclase C (GC-C), que é o receptor preferencial para a ligação dos agonistas enterotoxina termoestável de *E. coli* (STa) e de Uroguanilina (UGN). Essa expressão foi conseguida através de técnicas de RT-PCR e visualização através de Gel de Agarose. São mostrados os resultados referentes a 8 amostras de corpos cavernosos humanos, onde a isoforma GC-C não foi encontrada expressa em nenhuma das 8 amostras analisadas. Em seguida, podemos visualizar a expressão do controle positivo duodeno de humanos.

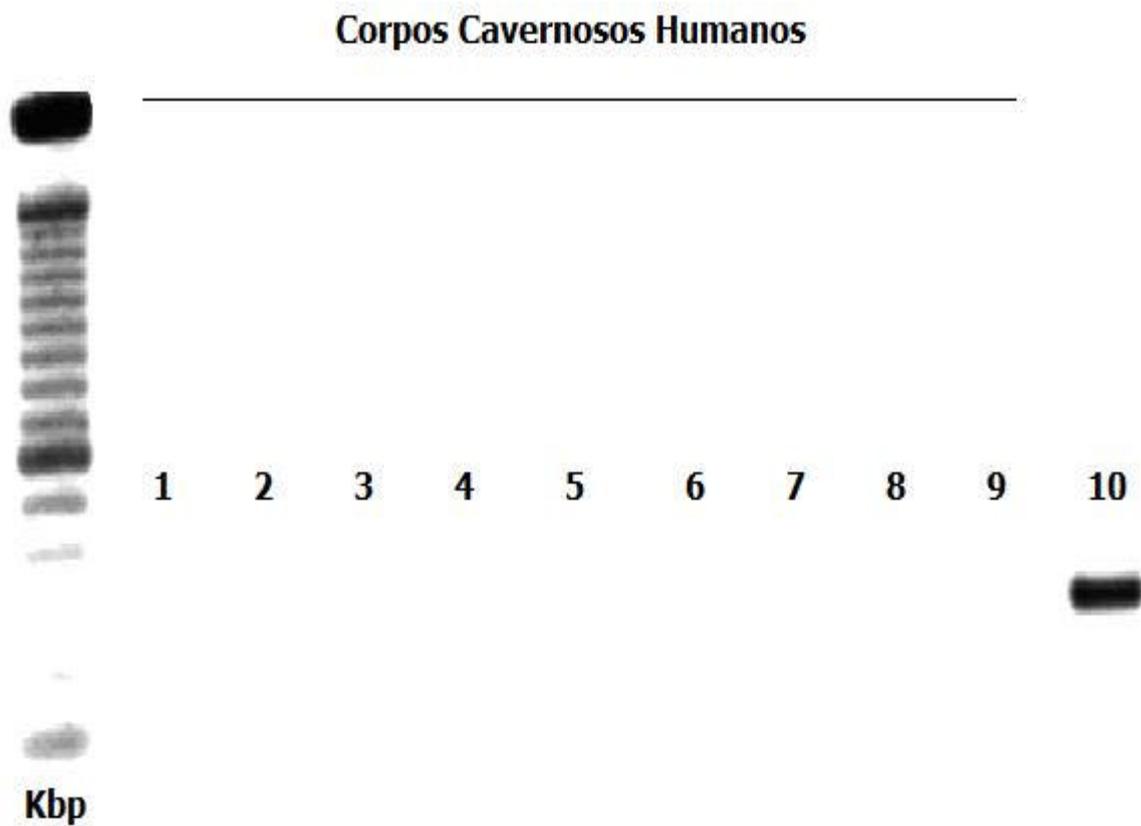


FIGURA 25: Análise de RT-PCR da Isoforma Guanilato ciclase C (GC-C) em amostras de corpos cavernosos humanos. Amostras de 1 a 8 referentes as amostras testadas. A amostra número 9 o controle negativo, seguido do controle positivo 10 em duodeno humano.

4.12.4. NPR-C

A figura de número 26, mostra os resultados referentes à expressão de receptores de membrana do tipo NPR-C, que é o receptor para a ligação de todos os Peptídeos Natriuréticos, incluindo aí o grupo das Atriopeptinas e as Guanilinas. Essa expressão foi conseguida através de técnicas de RT-PCR e visualização através de Gel de Agarose. São mostrados os resultados referentes a 8 amostras de corpos cavernosos humanos, onde a isoforma NPR-C encontrou-se expressa em todas amostras analisadas. Em seguida, podemos visualizar a expressão do controle positivo duodeno de humanos.

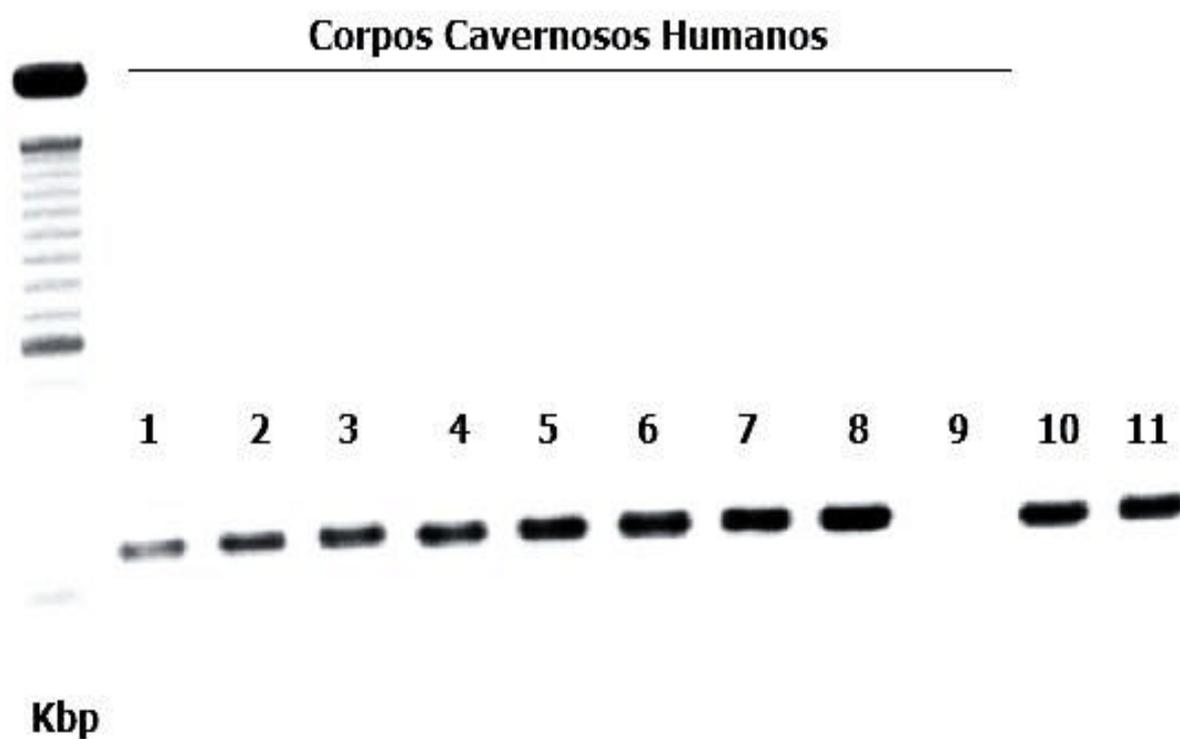


FIGURA 26: Análise de RT-PCR de Isoforma de Receptor para Peptídeo Natriurético (NPR-C) em corpos cavernosos humanos (amostras 1 a 8), em seguida, a amostra 9 que representa o controle negativo, seguido do controle positivo de NPR-C em aorta e duodeno de humanos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho mostra o relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos através da uroguanilina, STa e ANP, de maneira concentração-dependente e reversível. Tratando-se da primeira demonstração de um efeito da UGN no músculo liso. Esse efeito é bastante relevante, devido ao fato da musculatura lisa cavernosa ter um importante papel no controle da ereção peniana. Os prováveis mecanismos, pelos quais esses peptídeos promoveram esses relaxamentos, serão discutidos.

A magnitude dos efeitos relaxantes (40 – 60%) observados para ANP, UGN e STa foram semelhantes aos obtidos para CNP em corpos cavernosos humanos (Kütthe et al., 2003).

Trabalhos anteriores haviam demonstrado relaxamento de tiras de corpos cavernosos de ratos, coelhos e humanos para o peptídeo natriurético do tipo C (Kim et al., 1998; Kütthe et al., 2003). No entanto, o trabalho de Kütthe e colaboradores (2003), realizado em corpos cavernosos humanos, utilizou tecido obtido de pacientes que fizeram implante de prótese peniana, portanto, com provável dano estrutural e vascular ou ainda de pacientes que fizeram cirurgia transexual com provável alteração induzida pelo uso de hormônios estrogênicos, de relevância questionável para estudos fisiofarmacológicos.

As descobertas relatadas nesse estudo, utilizando corpos cavernosos obtidos de doadores cadáveres jovens e sem fator histórico de fator de risco

cardiovascular, coloca os receptores de membrana como via sinalizadora importante para o desenvolvimento de drogas para tratamento da disfunção erétil em associação com inibidores de PDE 5.

Caracterizado esse efeito inicial, do efeito relaxante dos peptídeos UGN, ANP e STa, resolvemos posteriormente investigar a possibilidade de esse efeito estar associado a um “cross-talk” com a guanilato ciclase solúvel.

Para tanto, inicialmente, verificamos a possibilidade da participação da via NO-GMPc, uma vez que o NO, age como neurotransmissor pós-ganglionar da ereção peniana mediada por mecanismo não adrenérgico e não colinérgico-NANC e por se constituir um importante mediador vasoativo liberado através do endotélio (Bugá *et al.*, 1992). Nesse sentido, avaliamos a participação desta importante via de sinalização para a função erétil (Burnett *et al.*, 1992), através do uso dos fármacos L-NAME e 7-NI, inibidores inespecíficos da NOS endotelial e da NOS neuronal. O efeito relaxante da UGN não foi alterado nem por L-NAME (FIGURA 12), tampouco, por 7-NI (FIGURA 13). Portanto, o relaxamento evocado por UGN, em tiras de corpos cavernosos humanos, mostrou-se independente da liberação de NO, tanto de fonte endotelial quanto neuronal. Não existindo, portanto, um “cross-talk” significativo entre essas vias. Pelo menos, quando o estímulo inicial se dá através da ativação da guanilato ciclase de membrana.

O passo posterior foi tentar descartar definitivamente a possibilidade da guanilato ciclase solúvel estar envolvida, de alguma maneira, no efeito

relaxante da UGN. Para tanto, utilizamos o ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazola [4,3-a]quinoxalin-1ona), um inibidor específico do grupo heme das GCs, que tem sido utilizado para demonstração da participação de GCs em vários processos fisiológicos, como por exemplo, o relaxamento de corpos cavernosos humanos (Teixeira *et al.*, 1998a; Teixeira *et al.*, 2001).

Reforçando nossos dados anteriores e descartando por vez a participação do NO e de seu efetor GCs, nossos dados mostram que ODQ não apresenta um bloqueio significativo no relaxamento produzido por UGN em tiras de corpo cavernoso humano pré-contraídas por fenilefrina (FIGURA 14). Esses achados estão de acordo com os trabalhos de Vente (Vente *et al.*, 2007), que demonstraram que os efeitos de ANP e BNP após ligação a receptores GC-A não foram afetados quando os tecidos foram previamente incubados com ODQ. Mostrando que o efeito relaxante, provavelmente, estaria relacionado com a ligação direta de peptídeos natriuréticos com o seu receptor encontrado na membrana. Entretanto, nossos achados, demonstram também uma forte tendência ao bloqueio desse efeito relaxante da UGN pelo ODQ. Com isso, podemos inferir, caso esse dado se confirme com o aumento do número de experimentos, que o ODQ pode inclusive estar exercendo seu efeito através de um bloqueio de GCm, uma vez que a UGN não atravessa a membrana para ativar a GCs. Dessa forma, UGN atua através de um mecanismo independente da via NO/GC/GMPc

Nesse sentido, o próximo passo seria o de avaliar a possível participação da UGN através de receptores guanilato ciclase de membrana no efeito relaxante em CCH.

Para tanto, avaliamos a participação da GC de membrana no efeito relaxante de CCH, através da isatina (2,3-dioxindol), único composto não-peptídeo endógeno que age como antagonista do sistema de peptídeos natriuréticos, inibindo inespecificamente as GC de membrana (Medvedev *et al.*, 2002).

Verificamos então que a isatina inibiu a resposta relaxante de CCH induzidas por UGN (FIGURA 15). Com essa informação, podemos então sugerir que a resposta relaxante da UGN em CCH pode estar relacionada com a ligação desse peptídeo diretamente ao seu receptor de membrana, ou a um receptor alternativo com atividade guanilato ciclase como sugerido por Sindic *et al.*, 2002 e Carrithers *et al.*, 2004. Entretanto, poderíamos ter realizado uma curva concentração-resposta para o isatina, com o intuito de encontrar uma concentração efetiva para o bloqueio nas preparações que utilizamos. Devido ao escasso número de doações de tecidos, este procedimento ficaria impraticável, mas resolvemos pesquisar essa concentração em trabalhos que utilizaram esse inibidor. Com isso, identificamos a concentração encontrada por Medvedev para bloquear o efeito do ANP, BNP e CNP, bloqueando GC-B, em membranas de coração de rato (Medvedev *et al.*, 1999) e também em GC-A em cérebro de ratos (Medvedev *et al.*, 1999).

Com o intuito de melhor caracterizar o efeito inibidor de GC de membrana, através da isatina, realizamos um outro grupo de experimentos, contemplando um bloqueio idêntico ao anterior, dessa vez, utilizando um agonista de GC-A e outro agonista de GC-C, ANP e STa, respectivamente (FIGURAS 16 e 17). Os resultados encontrados corroboram com os encontrados anteriormente. Assim, a isatina bloqueou todos os agonistas de GC de membrana estudados. Dessa forma, além dos trabalhos já citados e adicionados aos nossos achados no tocante a todos os agonistas de GC de membrana utilizados por nós, juntos eles refletem que a via de sinalização desses peptídeos está, muito provavelmente, relacionada à ligação desses peptídeos a receptores de membrana, via guanilato ciclase, mas não necessariamente ao receptor GC-C. Esta seria, se confirmada, a primeira demonstração de bloqueio, apesar de parcial, de receptor GC-C por isatina, tendo sido previamente demonstrado bloqueio de receptores GC-A e GC-B (Medvedev *et al.*, 1999).

Neste sentido, há várias evidências recentes, apontando os efeitos da UGN de maneira GC-C independente como, por exemplo, demonstrando o efeito natriurético com concomitante aumento de GMPc pela UGN em camundongos knockout para GC-C (Carrihers *et al.*, 2004). Assim como em trabalhos demonstrando um efeito da UGN independente de GC-C envolvido na regulação do transporte de água e eletrólitos em ductos coletores corticais de ratos (Sindic *et al.*, 2005).

Além do mais, um outro importante aspecto é a de que o isatina bloqueia não apenas GC de membrana, mas também isoforma solúvel, conforme demonstrado por Medvedev e colaboradores em estudos com plaquetas humanas (Medvedev *et al.*, 2001). No entanto, como apresentado anteriormente, o efeito da UGN não está relacionado a ativação NO-dependente da GCs. Portanto, esses achados com a isatina devem estar realmente relacionados à sua atividade bloqueadora de GCm.

Dessa forma, faz-se necessário avaliar outras vias para explicar esses efeitos relaxantes encontrados, podendo estar relacionados aos canais de potássio, pois mediante ação hiperpolarizante, vários subtipos desses canais regulam o movimento intracelular de cálcio, modulando assim, o grau de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular (Venkaterswarlu *et al.*, 2002).

Nesse sentido, avaliamos a possibilidade da participação de alguns canais de K⁺ no efeito relaxante da UGN, através da utilização da associação iberiotoxina/apamina e também da glibenclamida, bloqueadores de canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta, média e de baixa condutância e canais de K⁺ ativados por ATP, respectivamente.

Primeiramente, levamos em consideração os achados de Amorim que em túbulos de ratos microperfundidos por uroguanilina, aumentando a secreção de potássio, mas que foi conseguido o bloqueio desses efeitos

através da iberiotoxina e que, portanto, parece ser dependente de canais de potássio, voltagem dependente, do tipo cálcio sensível chamado de maxi-K (Amorim *et al.*, 2006). Entretanto, em nossa pesquisa, o relaxamento induzido por UGN não foi afetado, de forma significativa, pela associação iberiotoxina/apamina (FIGURA 19), mostrando que os canais de potássio do tipo cálcio sensível estudados parecem não ter relação com a regulação de tônus da musculatura lisa peniana.

Além do mais, glibenclamida um bloqueador misto de canais de potássio ATP-dependente e de canais de cloreto do tipo CFTR, não altera o relaxamento induzido por UGN. Este efeito, portanto, pareceu não estar relacionado com a atividade destes canais.

Considerando a importância da regulação do tônus de células musculares lisas através da atividade do canal de K⁺ tipo Kir ('inward rectifier') os quais ativados via receptores NPR-C, promovendo hiperpolarização e conseqüente relaxamento (Ahluwaia e Hobbs, 2005), existe a alternativa do efeito da UGN acontecer por ativação do receptor NPR-C, com subsequente ativação de canal de K⁺ do tipo Kir. Nesse sentido, seria necessária a utilização de outros bloqueadores como, por exemplo, tetraetilamônio e Ba²⁺, para testarmos esta hipótese. Outra abordagem seria a utilização de bloqueador de NPR-C, M372049, (Veale *et al.*, 2000) para efetivamente avaliarmos o papel do receptor NPR-C nos fenômenos aqui descritos. Além do mais, o receptor NPR-C é o mais abundante dos receptores para peptídeos natriuréticos,

correspondendo a 94 % dos receptores em células endoteliais sendo, portanto, um alvo importante para estes ligantes (Anand-Srivastava, 2005).

Por outro lado, levando em consideração que a função de GMPc como mediador do relaxamento de músculo liso cavernoso é muito bem caracterizada (Andersson, 2001) e que a redução da sua degradação, através de um inibidor de PDE (Priviero *et al.*, 2007), é bastante efetiva para facilitação de respostas eréteis, testamos a hipótese de que um inibidor de PDE poderia aumentar o efeito relaxante da UGN, caso a via de sinalização fosse através de GC de membrana.

Nesse sentido, realizamos um grupo experimental com um inibidor de PDE 5, vardenafila, para avaliarmos essa possível potencialização do efeito relaxante da UGN em CCH. Nessa direção, encontramos um considerável aumento na resposta máxima de relaxamento pela UGN quando incubado com vardenafila (FIGURA 20), demonstrando que o efeito da UGN estaria relacionado com a via das GC de membrana, uma vez que um inibidor da degradação de GMPc foi utilizado para o aumento da resposta, portanto, esse segundo mensageiro provavelmente está sendo produzido após ligação UGN a seu receptor.

Resolvemos quantificar a possível elevação dos níveis de GMPc, assim como de AMPc, como forma de se obter um dado funcional importante relacionado a ligação dos peptídeos estudados com seus receptores, uma vez que trabalhos recentes mostram a importância desses nucleotídeos cíclicos na

regulação do tônus erétil e, que ainda existe um “cross-talk” entre esses mediadores (Ückert *et al*, 2004).

A exposição de corpos cavernosos humanos a UGN e ANP, não alterou significativamente os níveis de AMPc (FIGURA 22) em relação ao controle basal.

Por outro lado, os níveis de GMPc foram praticamente triplicados (FIGURA 23) quando expostos a UGN e ANP em relação aos níveis basais. Este dado vem a relacionar dois importantes pontos que são: aumento de GMPc pela ligação desses peptídeos a receptores de membrana acoplados a guanilato ciclase, bem como, a importância dessa via para o tratamento da disfunção erétil masculina através da elevação desse segundo mensageiro. A elevação intracelular deste nucleotídeo promove uma cascata de transdução de sinais que desencadeia diversos efeitos celulares, como por exemplo, relaxamento de células musculares lisas, provando que a via guanilato ciclase parece definitivamente estar sendo recrutada para exercer os efeitos relaxantes da musculatura lisa de corpos cavernosos evocadas por UGN e ANP, agonistas preferenciais de GC-C e GC-A, respectivamente.

Dessa forma, a expressão desses receptores de membrana se fez necessária para melhor relacionar os achados funcionais com efeitos relacionados aos receptores de membrana estudados. Nesse sentido, avaliamos a expressão de GC-A, GC-B, GC-C e NPR-C em CCH através de método qualitativo.

Todos os receptores foram expressos em CCH, excetuando-se a isoforma GC-C. Logo, todos os efeitos da UGN avaliados até aqui podem ser por uma via diferente de GC-C, como proposto por trabalhos anteriormente mencionados responsáveis pelos efeitos da GN e UGN na natriurese em camundongos “Knockout” para GC-C (Carrithers *et al.*, 2004), assim como, em trabalhos mostrando um efeito independente de GC-C envolvido na regulação do transporte de água e eletrólitos em ductos coletores corticais de ratos (Sindic *et al.*, 2005). Entretanto, existe a possibilidade da isoforma GC-C ter uma baixa taxa de expressão nos tecidos estudados, necessitando, portanto, de um método com maior capacidade de detecção, como por exemplo, “real time RT-PCR”.

Outro importante ponto do nosso estudo é a comparação das potências relativas aos peptídeos natriuréticos estudados, já que, o CNP, em trabalhos com corpos cavernosos humanos (Küthe *et al.*, 2003) mostrou-se menos potente em seu efeito relaxante, tanto em relação ao ANP, quanto a UGN.

Além do mais, neste estudo de Küthe, o CNP revelou-se menos eficiente também na elevação dos níveis intracelulares de GMPc, quando comparados com ANP, apesar do ANP não ter produzido efeito relaxante significativo e estes autores não terem evidenciado a expressão do receptor GC-A.

No entanto, os corpos cavernosos humanos no trabalho de Kütke e colaboradores (2003) foram obtidos de dois pacientes que fizeram implante de prótese peniana e quatro que fizeram cirurgia para mudança de sexo. Estes tecidos, portanto, não refletem nem uma expressão fisiológica plena destes receptores e nem uma função normal destas vias devido ao uso de hormônios exógenos por um grupo e a medicamentos e disfunção endotelial e nitrérgica em outro.

Nossos doadores eram na sua grande maioria jovens que tiveram morte por traumatismo crânio-encefálico (TCE) e que não tinham histórico de fatores de risco cardiovascular, tendo, portanto, a resposta obtida nestes tecidos uma maior relevância fisiológica.

A pergunta que devemos responder é: como a UGN aumenta GMPc se o receptor ao qual UGN tem maior afinidade (GC-C) não está expresso? Uma alternativa é que exista certa “promiscuidade” de ligação dos agonistas entre os receptores para peptídeos natriuréticos. Esta hipótese é sustentada por dados de duas naturezas. Primeiramente, GN e UGN são responsáveis pelo transdução do sinal quimiosensorial em epitélio olfatório através da ligação a receptores GC-D (Leinders-Zufall et al., 2007; Duda e Sharma, 2007). Dessa forma, poderia ainda a UGN ter exercido seus efeitos em corpos cavernosos humanos ao ligar-se a outra isoforma de GCm. Em segundo lugar, a interação antagonista entre peptídeos natriuréticos foi demonstrada por Santos-Neto e colaboradores (2003). O antagonismo entre ANP e o UGN mostrado pode refletir competição pelo mesmo alvo, não necessariamente aos receptores aos

quais estes peptídeos tem maior afinidade. Neste sentido, na ausência de GC-A, ANP pode ligar-se em GC-B e na ausência de GC-C, UGN pode, teoricamente, ligar em GC-A ou GC-B. Assim, Kütthe *et al.* (2003) demonstraram um aumento de GMPc, através da ANP, em tecidos que não expressavam GC-A, Carrithers *et al.* (2004) demonstraram efeito diurético e natriurético com aumento comcomitante de GMPc em animais “Knockout” para GC-C e Sindic *et al.* (2002) demonstraram hiperpolarização induzida por UGN com aumento de GMPc de maneira GC-C independente.

Esta hiperpolarização demonstrada por Sindic e colaboradores (2002) de modo GC-C independente, pode inclusive explicar nossos dados em relação ao relaxamento de tiras de corpos cavernosos humanos pré-contraídos com fenilefrina. No entanto, este mecanismo (via canais de potássio do tipo Kir) não foi efetivamente testado no presente estudo.

As isoformas de guanilato ciclase de membrana podem se constituir em importantes alvos para o tratamento da disfunção erétil masculina. Por apresentar um relevante efeito relaxante de corpos cavernosos humanos, assim como, promover elevação dos níveis de GMPc associado a esse efeito. Essa pode se mostrar vantajosa, pois se sobrepõe a etapas importantes, como a exemplo da liberação de NO, uma vez que pacientes acometidos de DE tem normalmente algum grau de disfunção nitrérgica, podendo, dessa forma, abranger um maior número de pacientes que não respondem adequadamente a terapêutica atualmente disponível. É possível ainda, ser utilizada

isoladamente ou em associação com drogas já disponíveis, como inibidores de PDE₅, onde pudemos observar um sinergismo de efeitos.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- UGN relaxou tiras de corpos cavernosos humanos através de um mecanismo independente do NO, tanto por parte da NOS quanto da guanilato ciclase solúvel.
- UGN, STa e ANP relaxaram tiras de corpos cavernosos humanos através da ligação aos receptores de membrana.
- O efeito relaxante da UGN foi reforçado quando somado a um inibidor de PDE 5.
- UGN, STa e ANP não elevaram os níveis de AMPc em CCH.
- UGN, STa e ANP elevaram os níveis de GMPc em CCH.
- Os receptores GC-A, GC-B e NPR-C encontraram-se expressos no tecido erétil estudado.
- UGN tem seu efeito relaxante em CCH independente de GC-C.
- Os receptores de membrana acoplados a via guanilato ciclase mostraram-se importantes alvos para o tratamento de disfunção erétil masculina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA, A; HOBBS, A.J. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just hyperpolarizing factor. *TRENDS in Pharmacol Sci.* Vol. 26 (3), 2005.

AMORIM, J.B.O; MUSA-AZIZ, R; LESSA, L.M.A; MALNIC, G; FONTELES, M.C. Effect of uroguanylin on potassium and bicarbonate transport in rat renal tubules. *Can J Physiol Pharmacol*, 84: 1003-1010, 2006.

ANAND-SRIVASTAVA M.B, FRANKS, D.J, CANTIN, M, GENEST, J. Atrial natriurect factor inhibits adenylyl cyclase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 121: 855-62, 1984.

ANAND-SRIVASTAVA M.B, GENEST, J, CANTIN, M. Inhibitory effect of atrial natriurect factor on adenylyl cyclase activity in adrenal cortical membranes. *FEBS Lett*, 181: 199-202, 1985.

ANAND-SRIVASTAVA M.B, CANTIN, M. Atrial natriurect factor receptors are negatively coupled to adenylyl cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 138: 427-36, 1986.

ANAND-SRIVASTAVA M.B, VINAY, P, GENEST, J, CANTIN, M. Effect of atrial natriuretic factor on adenylyl cyclase in various nephron segments. *Am J Physio*, 251: F417-23, 1986.

ANAND-SRIVASTAVA M.B. Atrial natriuretic peptide-C receptor and membrane signalling in hypertension. **J. Hypertens.** 15(8), 815-26, 1997.

ANDERSSON, K.E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev.**, v.53, n.3, p.417-50, 2001.

ANDERSSON, K.E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol Rev.**, v.75, p.191–236, 1995.

ANDERSSON, K.E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol Rev.**, v.75, p.191–236, 1995.

ARCHER, S.L. Potassium channels and erectile dysfunction. **Vascular Pharmacol.** 38:61-71. 2002.

BRADFORD, M.M; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72: 248-254, 1976.

BRENNER, B.M; DALLAMAN, B.J; GUNNING, M.E; ZEIDEL, M.L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiol Rev.** 70: 665-99, 1990.

BROWN, P.R; KOUTSAIMANIS, K.G; DE WARDENER, H.E. Effect of urinary extracts from salt-loaded man on urinary sodium excretion by the rat. **Kidney Int,** 2 (1): 1-5, 1972.

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

CAREY, R.M. Evidence for a splanchnic sodium input monitor regulating renal sodium excretion in man: lack of dependence upon aldosterone. **Circulation Res.**, 43:19-23, 1978.

CARRITHERS S.L.; OTT, C.E.; HILL, M.J.; JOHNSON B.R.; CAI, W.; CHANG, J.J.; SHAH, R.G.; SUN, C.; MANN, E.A.; FONTELES, M.C.; FORTE, L.R.; JACKSON, B.A.; GIANELLA, R.A.; GREENBERG, R.N.: Guanylin and Uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. **Kidney Int.**, 65: 40-53, 2004.

CRANE, J.K.; WEHNER, M.S.; BOLEN, E.J.; SANDO, J.J.; LINDEN, J.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L.: Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli(STa) and protein kinase C. **Infect Immun.** 60: 5004-5012, 1992.

CHRIST, G.J. Editorial: Membrane bound guanylyl cyclase as a potential molecular target for the treatment of erectile dysfunction. **J Urol.** 169:1923. 2003.

CLARKSON, E.M, RAW, S.M, DE WARDENER, H.E. Two natriuretic substances in extracts of urine from normal man when salt-depleted and salt-loaded. **Kidney Int.** 10(5): 381-94, 1976.

CURRIE MG, FOK KF, KATO J, MOORE RJ, DUFFIN KL, SMITH CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci**, v.89, p. 947-51, USA, 1992.

DE WARDENER, H.E, MILLS, I.H, CLAPHAM, W.F, HAYTER, C.J. Studies on the efferent mechanism of de sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. **Clin Sci.** 21: 249-58, 1961.

FAN X, HAMRA FK, LONDON RM, EBER SL, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, SMITH CE, CURRIE MG, FORTE LR. Structure and activity of uroguanylin isolated from urine and intestine of rats. **Am J Physiol** 273:E957-64, 1997a.

FAN X., HAMRA F.K., FREEMAN R.H., EBER S.L., KRAUSE W.J., LIM R.W. PACE V.M., CURRIE M.G., FORTE L.R. Uroguanylin: cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and preprouroguanylin from plasma. **Biochem Biophys Res Commun** 219:457-62, 1996.

FAN X., WANG Y., LONDON R.M., EBER S.L., KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., FORTE L.R. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive renal, central nervous, reproductive and lymphoid systems.

Endocrinology 138:4636-48, 1997b.

FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FERREIRA, M.G.; FORTE, L.R.:
Effects of ANP, urodilatin and uroguanylin in the perfused rat kidney. **FASEB J.**,
11:A8, 1997.

FONTELES, M.C; GREENBERG, R.N; MONTEIRO, H.S.A; CURRIE, M.G;
FORTE, L.R. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in
the isolated perfused kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.** 275: F191-F197,
1998.

FORTE L.R. Guanylin regulatory peptides: structures, biological activities
mediated by cyclic GMP and pathobiology. **Regulatory Peptides**, 81:25-39,
1999.

FORTE L.R. Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and
experimental therapeutics. **Pharmacol Ther** 104:137-62, 2004.

FORTE L.R., THORNE P.K., EBER S.L., KRAUSE W.J., FREEMANN R.H.,
FRANCIS S.H., CORBIN J.D. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-
stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. **Am
J Physiol** 263:C607-15, 1992.

FORTE, L.R.; CURRIE, M.G.: Guanylin: a peptide regulator of epithelial transport. **FASEB J.**, 9:643-650, 1995.

HAMRA F.K., EBER S.L., CHIN D.T., CURRIE M.G., FORTE L.R. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:2705-10, 1997.

HAMRA F.K., FAN X., KRAUSE W.J., FREEMAN R.H., CHIN D.T., SMITH C.E., CURRIE M.G., FORTE L.R. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure and modulation of bioactivity by proteases. **Endocrinology** 137:257-65, 1996b.

HAMRA FK, FORTE LR, EBER SL, PIDHORODECKYJ NV, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, CHIN DT, TOMPKINS JÁ, FOK KF, SMITH CE, DUFFIN KL, SIEGEL NR, CURRIE MG. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10464-8, 1993.

HAMRA FK, FORTE LR, EBER SL, PIDHORODECKYJ NV, KRAUSE WJ, FREEMAN RH, CHIN DT, TOMPKINS JÁ, FOK KF, SMITH CE, DUFFIN KL, SIEGELNR, CURRIE MG. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:10464-8, 1993.

HAMRA FK, KRAUSE WJ, SMITH CE, FREEMAN RH, CURRIE MG, FORTE LR. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. **Am J Physiol** 270:G708-16, 1996a.

HAMRA FK, KRAUSE WJ, SMITH CE, FREEMAN RH, CURRIE MG, FORTE LR. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. **Am J Physiol** 270:G708-16, 1996a.

HAMRA, F.K.; FORTE, L.R.; EBER, S.L.; PIDHORODECKYJ, N.V.; KRAUSE, W.J.; FREEMAN, R.H.; CHIN, D.T.; TOMPKINS, J.A.; FOK, K.F.; SMITH, C.E.; DUFFIN, K.L.; SIEGEL, N.R.; CURRIE, M.G.: Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:10464-10468, 1993.

HASEGAWA, M.; HIDIKA, Y.; WADA, A.; HIRAYAMA, T.; SHIMONISHI, Y.: The relevance of N-linked glycosylation to the binding of a ligand to guanylate cyclase C. **Eur J Biochem** 263: 338-345, 1999.

HIRATA, M, CHANG G-H, MURAD, F. Stimulatory effect of atrial natriurect factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovin aortic smooth muscle cells. **Biochem Biophys Acta**. 1010: 346-51, 1989.

KIM, N.; VARDI, Y.; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLDSTEIN, I.; DE TEJADA, I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. **J Clin Invest.**, v.91, n.2, p.437-442, 1993.

KIM, SUNG ZOO; KIM, SUHN HEE; PARK, JONG KWAN; KOH, GOU YOUNG; CHO, KYUNG WOO. Presence and biological activity of C-type natriuretic peptide-dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. **J Urology.**,v.159, n.5, p.1741-1746, 1998.

KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. **N Engl J Med.**, v.321, n.24, p.1648-1659, 1989.

KUTHE., ANDREA; REINECKE., MANFRED; UCKERT., STEFAN; BECKER., ARMIN; DAVID., IVANA; HEITLAND., ALEKSANDRA; STIEF., CHRISTIAN G., FORSSMANN., WOLF-GEORG; MAGERT., HANS-JURGEN. Expression of Guanylyl cyclase B in the Human Corpus Carvenosum Penis and the Possible Involvemente of its Ligand G-type Natriuretic Polypeptide in the Induction of Penile Erection. **J Urol** V. 159, n.5, p. 1918-1922, 2003.

LEINDERS-ZUFALL, T; COCKERHAM, R.E; MICHALAKIS, S; BIEL, M; GARBERS, D.L; REED, R.R; ZUFALL, F; MUNGER, S.D. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 104, 36: 14507-14512, 2007.

LENNANE, R.J.; PEART, W.S.; CAREY, R.M.; SHAW, J.: A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. **Clin. Sci. Mol. Med.**, 49:433-436, 1975.

LEVIN. E.R, GARDNER, D.G, SAWSON, W.K. Natriurect peptides. **N Engl J Med.** 261: 321-8. 1998.

LUE, T.F Neurogenic erectile dysfunction. **Clin Auton Res.** 2001 Oct;11(5):285-94.

MCKINLAY, J.B. The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. **Int J Impot Res.**, v. 4, p.S6-S11, 2000.

MEDVEDEV, A; SANDLER, M; GLOVER, V. The influence of isatin on guanylyl cyclase of rat heart membranes. **Eur J Pharmacol.** 384(2-3):239-41, 1999.

MEDVEDEV, A; BUSSYGYNA, O; PYATAKOVA, N; GLOVER, V; SEVERINA, I. Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets. **Biochem Pharmacol**, 63: 763-766, 2002.

MONCADA, I; MARTINEZ-SALAMANCA, J.I; ALLONA, A; HERNANDEZ, C. Current role of penile implants for erectile dysfunction. **Curr Opin Urol.** (6):375-80. Review, 2004.

LAU,L.C; ADAIKAN, P.G. Mechanisms of direct relaxant effect of sildenafil, tadalafil and vardenafil on corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol.** 17;541(3):184-90, 2006.

MINAMINO, N; NISHIKIMI, T. Natriuretic peptides in the cardiovascular system. **Handbook of Biologically Active Peptides.** 1199-1207, 2006.

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

MOREIRA, JR. E.D.; ABDO, C.H.; TORRES, E.B.; LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, v.58, n.4, p.583-588,2001.

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

POTTER, L.R.; GARBERS, D.L.: Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptors causes desensitization. **J Biol Chem** 267:14531-14534, 1992.

PRIVIERO, F.B.M; LEITE, R; WEBB, R.C; TEIXEIRA, C.E. Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin.* 28 (6): 751-755, 2007.

RAE GA, CALIXTO JB. Effects of endothelins on nerve-mediated contractions of the mouse vas deferens. **Life Sci.** v. 47(17) p.83-9, 1990.

RANGE, S.P.; HOLLAND, E.D.; BASTEN, G.P.; KNOX, A.J.: Regulation of guanosine 3,5-cyclic monophosphate in ovine tracheal epithelial cells. **Br J Pharmacol** 120: 1249-1254, 1997.

ROSE, R.A, LOMAX, A.E, KONDO, C.S, ANAND-SRIVASTAVA, M.B, GILES, W.R. Effects of C-type natriuretic peptide on ionic currents in mouse sinoatrial node: a role for the NPR-C receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 286: H1970-H1977, 2004.

RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide synthesis, release, and metabolism. **Pharmacol Rev.** 44: 479-602. 1992.

SAVILLE, M.A.; GEER, P.G.; WANG, B.C.; LEADLEY, R.A.; GOETZ, K.L.: A high-salt meal produces natriuresis in humans without elevating plasma atriopeptin. **Proc. Soc Exp. Biol. Med.**, 188:387-393, 1988.

SANTOS-NETO, M.S; CARVALHO, A.F; MONTEIRO, H.S.A, FORTE, L.R; FONTELES, M.C. Interaction of atrial natriuretic peptide, urodilatin, guanylin

and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. **Regul Pept.** 36(1-3):14-22, 2006.

SCHULZ S., CHRISMAN, T.D.; GARBERS, D.L.: Cloning and expression of guanylin its existence in various mammalian tissues. **J Biol Chem** 267: 16019-16021, 1992.

SINDIC, A.; VELIC, A.; BASOGLU, C.; HIRSCH, J.R.; EDEMIR, B.; KUHN, M.; SCHLATTER, E.: Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. **Kidney Int** 68: 1008-1017, 2005.

SINDIC, A.; BASOGLU, C.; CERCI, A; HIRSH, J.R.; POTTHAST, R.; KUHN, M.; GUANECAR, Y.; VISWESWARIAH, S.S.; SCHLATER, E.: Guanylin, uroguanylin and STa activate guanylate cyclase C and/or a PT-sensitive G protein in human proximal tubule cells. **J Biol Chem** 277: 177758-17764, 2002.

SINDIC, A.; SCHLATER, E.: Cellular effects of Guanylin and Uroguanylin. **J Am Soc Nephrol** 17: 607-616, 2006.

STEERS, W.D. Pharmacologic treatment of erectile dysfunction. **Reviews in Urology**, v.4, n.3, p.S17-S25, 2002.

STIEF, C.G.; UCKERT, S.; BECKER, A.; TRUSS, M.C.; JONAS, U. The effect of the specific phosphodiesterase (PDE) inhibitors on human and rabbit cavernous tissue in vitro and in vivo. **J Urol.**, v.159, n.4, p.1390-3, 1998.

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

TEIXEIRA, C.E; FARO, R; MORENO, R.A; RODRIGUES NETTO N JR; FREGONESI, A; ANTUNES, E; DE NUCCI, G. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum induced by scorpion venom. **J Urol**, 57: 816-820, 2001a.

TERESA DUDA; SHARMA, R.K. ONE-GC membrane guanylate cyclase, a trimodal odorant signal transducer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008.

ÜCKERT, S, HEDLUND, P, WALDKIRCH, E, SOHN, M, JONAS, U, ANDERSSON, K.E, STIEF, C.G. Interaction between cGMP- an cAMP- pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. **World J Urol**. 22: 261-266, 2004.

VAANDRAGER A.B., TILLY B.C., SMOLENSKI A., SCHNEIDER-RASP S., BOT A.G.M., EDIXHOVEN M., SCHOLTE B.J., JARCHAU T., WALTER U., LOHMANN, S.M., POLLER W.C., DEJONGE H.R. cGMP stimulation of cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I. **J Biol Chem** 272:4195-200, 1997b.

WALDMAN, S.A; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev.**39(3):163-96, 1987.

WARDENER, H.E.; CLARKSON, E.M. Concept of natriuretic hormone. **Physiological Rev.**, 65:658-759, 1985.

VEALE, C.A; ALFORD, V.C; AHARONY, D; BANVILLE, D.L; BIALECKI, R.A; BROWN, F.J. The discovery of non-basic atrial natriuretic peptide clearance receptor antagonists. **Part 1: Bioorg Med Chem Lett**, 10: 1949-52, 2000.

VENKATERSWARLU, K., GIRALDI, A., ZHAO, W., WANG, H., Z., MELMAN, A., SPEKTOR, M AND 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.

VENTE, J; MARKERINK-VAN ITTERSUM, M; GILLESPIE,J.I. Natriuretic peptide responsive, cyclic monophosphate producing structures in the guinea pig bladder. **J Urol.** 177: 1191-1194, 2007.

VIJAYACHANDRA, K, GURUPRASAD, M; BHANDARI, R; MANJUNATH, U,H;
SOMESH, B.P; SRINIVASAN, N; SUGUNA, K; VISWESWARIAH,
S,S.Biochemical characterization of the intracellular domain of the human
guanylyl cyclase C receptor provides evidence for a catalytically active
homotrimer. **Biochemistry**. 39(51):16075-83, 2000.

YANDLES, T.G, Biochemistry of natriuretic peptides. **J Intern Med**. 235: 561-
76. 1994.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 01: *FASEB J.* 21: 571.7

Uroguanylin Relaxes Human Corpus Cavernosum and is Potentiated by Vardenafil

Manassés Claudino Fonteles¹, Clauber Mota de Sousa², João Batista Gadelha de Cerqueira², Francisco José Arnaud Batista², Cláudia Ferreira Santos², Lúcio Flávio Gonzaga Silva² and Nilberto Robson Falcão Nascimento²

¹ Biological Sciences, Mackenzie University, Rua da Consolação, 896, Higienópolis, São Paulo, 01302-907, Brazil, ² 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 ± 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 ± 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](#)