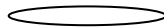


JOSE MARIA FERREIRA LA FUENTE DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES PROSTANOIDES REGULADORES
DO TÓNUS DO MÚSCULO LISO TRABECULAR HUMANO**



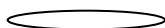
**VALOR DA COMBINAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PGE₁ NA TERAPÊUTICA
INTRACAVERNOSA**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

Porto 2003

JOSE MARIA FERREIRA LA FUENTE DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO DOS RECEPTORES PROSTANOIDES REGULADORES
DO TÓNUS DO MÚSCULO LISO TRABECULAR HUMANO**



**VALOR DA COMBINAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PGE₁ NA TERAPÊUTICA
INTRACAVERNOSA**

Dissertação de candidatura ao Grau de Doutor em Ciências Médicas
apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar,
da Universidade do Porto

Orientador - Prof. Iñigo Saenz de Tejada

Co – Orientador – Prof. Adriano Pimenta

Porto 2003

INDICE

PREFÁCIO

3

ABREVIATURAS

7

SUMÁRIO

10

1 – FISIOLOGIA DA ERECÇÃO

1.1 – MECANISMOS NEUROGÊNEOS

16

1.1.1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL

17

1.1.2 – SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

22

A – Neurotransmissão adrenérgica

22

B – Neurotransmissão colinérgica

23

C – Neurotransmissão não adrenérgica não colinérgica

23

1.2 – MECANISMOS VASCULARES

25

2 – DINÂMICA DA ERECÇÃO

28

2.1 – MECANISMOS REGULADORES DO TONUS DO MÚSCULO LISO DO PÊNIS

2.1.1 – Sistema Adrenérgico

28

2.1.2 – Endotelina

29

2.1.3 – Papel dos nucleótidos cíclicos

A – A via do AMPc

30

B – O óxido nítrico e a via do GMPc

31

2.1.4 – Substâncias dadores de óxido nítrico

35

A – S-Nitrosoglutatião

2.1.5 – Outros Mecanismos

37

A – Hiperpolarização celular

B – Comunicações intercelulares

3 – ANTAGONISMO FUNCIONAL DA ERECÇÃO

39

3.1 – PAPEL DOS PROSTANÓIDES

39

3.2 – RECEPTORES PROSTANÓIDES RELAXANTES

41

3.3 – RECEPTORES PROSTANÓIDES CONTRÁCTEIS

41

4 - OBJECTIVOS DO TRABALHO E METODOLOGIA

4.1 – Relevância Clínica da PGE₁

47

4.2 – Metodologia

50

4.3 – Avaliação Estatística

55

5 – RESULTADOS

56

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

72

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

83

8 – BIBLIOGRAFIA

110

PREFÁCIO

“ Todo hombre puede ser, si se lo propone, el escultor de su propio cerebro ”

Ramon y Cajal

Nada surge do acaso pois o trabalho prolifera em todos em íntima reciprocidade. Talvez possamos comparar esta jornada, pela Ciência, ao crescimento duma Criança. Depois de nascer e ganhar a forma de adulto ela vai para a Escola aprender a ler, escrever, conhecer outras pessoas, ter novas experiências, criar novos Amigos, exprimir criatividade e irreverência. Chega com naturalidade a adulto - no que se encontra hoje – e mantém o mesmo querer em aprender, saber, trabalhar, partilhar. Não aceita o conformismo e com entusiasmo constrói projectos, enquanto modera os sucessos e supera os insucessos. A 'Escola' moldou a Criança e criou mudanças.

O desempenho da actividade hospitalar durante 20 anos, no campo da Andrologia, deu-lhe a conhecer as angústias dos doentes com disfunção eréctil. O aparecimento recente da farmacoterapia eficaz, com mecanismos de activação diferentes, levou ao aumento na consulta externa de doentes "fármaco-resistentes", de tratamento complexo e com uma grande expectativa numa resposta terapêutica satisfatória. Entretanto, as profundas modificações na fisiopatologia e abordagem da disfunção eréctil, levam-no a adquirir e a procurar consolidar os novos conhecimentos nesta área da Medicina nas águas límpidas das Ciências básicas. Procurou desta forma, construir uma ponte entre a investigação laboratorial e a actividade clínica, com o objectivo de melhorar a qualidade dos cuidados a dispensar aos Doentes. Neste contexto e na perspectiva de manter a Unidade de Andrologia funcional, capaz de responder a esta mudança, criou uma nova consulta externa, multidisciplinar, de "Disfunções Sexuais".

Em Maio de 2003 foi iniciada a " ponte " entre a actividade clínica e a investigação básica, alicerçada entre o Serviço de Urologia do HGSA e o Laboratório de Farmacologia do ICBAS, com as primeiras experiências no tecido cavernoso humano para estudo da modulação purinérgica.

Agora, se pode compreender que este trajecto na sua actividade profissional era um imperativo mesmo sem esta dissertação de candidatura a Doutoramento.

Deixo aqui o reconhecimento para os que tornaram possível este trabalho:

Ao Prof. Iñigo Saenz de Tejada um reconhecimento muito pessoal pela forma cordial como me recebeu na Fundação e por toda a orientação neste trabalho desde o primeiro dia. Pela sua disponibilidade e estímulo. Pela sua confiança e exigência.

Ao Dr. Adriano Pimenta, co-orientador de Doutoramento e meu Director de Serviço. Por me estimular o gosto pela Ciência e a sua capacidade de trabalho. Pelo exemplo de Mar da sua vida.

Ao Javier Angulo, à Tina, à Sonia e a todos do Laboratório pelo prazer de os conhecer, me receberem e darem a oportunidade de trabalhar na Fundação. Pelos seus conselhos e encorajamento, em particular, no início deste trabalho. Pelos bons momentos vividos.

Ao Antonio Allona, pela forma como me recebeu e o apoio que me facultou no Hospital Ramon y Cajal, pela energia que irradia e estima.

Ao Prof. Linhares Furtado, ao Francisco Rolo, e a todos os Colegas do Serviço de Urologia e Transplantação dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pela sua disponibilidade para colaborar no trabalho. Pelo seu Bom exemplo e Amizade.

Ao José Soares, pelo seu apoio incomensurável e imprescindível. Pela serenidade das nossas conversas. Por saber ser Amigo.

Aos meus Colegas do Serviço de Urologia do Hospital Geral de Santo António pela memória perene dos cruzamentos da nossa vivência.

Afinal, como na infância, a Escola continua, nada está no fim pois tudo começa de novo.

Esclarece que integrado neste grupo de trabalho efectuou o planeamento, a execução das experiências, a análise dos resultados e a versão da publicação que faz parte integrante desta dissertação:

Javier Angulo, Pedro Cuevas, *Jose M. La Fuente*, Jose M. Pomerol, Eduardo Ruiz-Castañé, Ana Puigvert, Sonia Gabancho, Argentina Fernandez, Peter Ney & Iñigo Sáenz de Tejada.

Regulation of human penile smooth muscle tone by prostanoid receptors

British Journal of Pharmacology, 136: 23-30, 2002.

Outros trabalhos desenvolvidos durante a preparação para esta dissertação e apresentados em Reuniões científicas :

Javier Angulo, Pedro Cuevas, *La Fuente Carvalho J.*, Rolo F., Rodriguez Vela L., Gabancho Iglesias S., Fernandez Ayerdi A., Ney P., Saenz de Tejada I.

La Diabetes altera la regulation que ejercen los receptores de prostanoïdes sobre el tono del musculo liso del pene humano.

LVXI Congresso Nacional de Urologia

14 de Maio de 2001 - Granada, Espanha

Javier Angulo, Pedro Cuevas, Fernandez Ayerdi A., Gonzalez Corrochano R., Moncada Iribarre I., *La Fuente Carvalho J.*, Rolo F., Saenz de Tejada I.

El envejecimiento reduce las respuestas erectiles in vivo y deteriora la relajación del cuerpo cavernoso en un modelo de conejo.

LXVII Congresso Nacional de Urologia

8 de Maio de 2002 - Murcia, Espanha

Javier Angulo, P. Cuevas, R. Gonzalez-Corrochano, *J. La Fuente*, A. Astobieta, L. Rodriguez-Vela, F. Rolo, E. Ruiz-Castañé, S. Videla and I. Saenz de Tejada.

Calcium dobesilato enhances the efficacy of PDE5 inhibitors on erectile function in diabetes

VIII Congresso da European Society Sexuality and Impotence Research (ESSIR)

2-4 de Dezembro de 2002

ABREVIATURAS

AA	– Ácido Araquidónico
AC	– Adenililciclase
Ach	– Acetilcolina
ADP	– Adenosina Difosfato
AMPC	– Adenosina 3' - 5' Monofosfato ciclico
APOM	– Área Pré - Óptica Medial
ATP	– Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	– Cálcio livre
DAG	– Diacilglicerol
EHRF	– Factor Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
ET- ₁	– Endotelina 1
GC	– Guanililciclase
GMPc	– Guanosina 3' - 5' Monofosfato ciclico
GTP	– Guanosina Trifosfato
Hgb	– Hemoglobina
5-HT	– 5-Hidroxytriptamina
IP ₃	– Inositol trifosfato
L-NAME	– N ^G -nitro-L-arginina metil ester
NA	– Noradrenalina
NANC	– Não adrenérgica Não colinérgica
NE	– Norepinefrina
NO	– Óxido Nítrico
NOS	– Sintase do Óxido Nítrico
nNOS	– Sintase óxido nítrico neuronal
eNOS	– Sintase óxido nítrico endotelial
iNOS	– Sintase óxido nítrico induzível
nPGi	– Núcleo Paragigantocelular
NPS	– Nitroprussiato de Sódio
NPV	– Núcleo Paraventricular
PAG	– Substância Periaqueductal Cinzenta
PDE	– Fosfodiesterase
PG	– Prostaglandina
PGH ₂	– Prostaglandina H ₂

PGI ₂	– Prostaciclina
PGE ₀	– Prostaglandina E ₀
PGE ₁	– Prostaglandina E ₁
PGE ₂	– Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	– Prostaglandina F _{2α}
PKA	– Proteínaquinase A
PKC	– Proteínaquinase C
PKG	– Proteínaquinase G
PLC	– Fosfolipase C
R – DP	– Receptores da PGD ₂
PVN	– Núcleo Paraventricular
R - EP	– Receptor da Prostaglandina E
R – FP	– Receptores da PGF _{2α}
R - IP	– Receptores da PG I ₂
R - P	– Receptor Prostanóide
R - TP	– Receptores do Tromboxano A ₂
SNO - Glu	– S-Nitrosoglutatião
TXA ₂	– Tromboxano A ₂
VIP	– Péptido Intestinal Vasoactivo

Este trabalho foi realizado com a colaboração do Serviço de Histologia do Departamento de Investigação do Hospital Ramon y Cajal e a Fundação para a Investigação e Desenvolvimento da Andrologia (FI+DA), em Madrid, sob a orientação do Prof. Iñigo Saenz de Tejada.

RESUMO

Resumo

O relaxamento do músculo liso trabecular é um passo fundamental na dinâmica da erecção. Os prostanóides são um grupo de mediadores envolvidos em múltiplos processos biológicos, incluindo a regulação do tónus do músculo liso trabecular humano e, como a acção mediada por cada um deles depende directamente do seu receptor na membrana celular, a caracterização dos diferentes tipos de receptores-prostanóides revela um grande interesse clínico.

Neste trabalho caracterizamos, em primeiro lugar, os receptores-prostanóides responsáveis pelas respostas contrácteis e relaxantes induzidas pelos prostanóides. A administração de ácido araquidónico (AA; 100 μ M) produziu o relaxamento das amostras de corpo cavernoso humano (CCH), o qual foi abolido pelo inibidor da ciclooxigenase, indometacina, e potenciado pelo antagonista dos receptores do tromboxano (R-TP), SQ29548. Este facto sugere a produção endógena de prostanóides a partir do AA, por acção da ciclooxigenase, que promovem respostas relaxantes e contrácteis para a regulação do tónus do músculo liso do corpo cavernoso humano.

Os receptores TP são responsáveis pelas respostas contrácteis induzidas pelos prostanóides no CCH, pois o análogo do Tromboxano A_2 , U46619, produziu uma contracção potente do CCH (EC_{50} 8.3 \pm 2.8 nM), sendo necessárias concentrações muito elevadas de $PGF_{2\alpha}$ (EC_{50} 6460 \pm 3220 nM) e do agonista selectivo dos receptores FP, fluprostenol, (EC_{50} 29540 \pm 14040 nM) para provocarem contracções apreciáveis do CCH. Além disso, estas respostas contrácteis foram inibidas pelo antagonista selectivo dos receptores TP, SQ29548 (0.02 μ M). Por outro lado, o agonista dos receptores EP_1 / EP_3 , sulprostone, não produziu nenhuma contracção nas tiras de CCH.

Em relação aos receptores-prostanóides responsáveis pelas respostas relaxantes no CCH, apenas as prostaglandinas da série E (PGE_1 , PGE_2) e o agonista-selectivo dos receptores EP_2 / EP_4 , butaprost, produziram relaxamento consistente destes tecidos (EC_{50} 93.2 \pm 31.5; 16.3 \pm 3.8; 1820 \pm 1284 nM, respectivamente).

Podemos concluir que a produção endógena de prostanóides pode regular o tónus do músculo liso trabecular humano por intermédio de receptores-especificos da membrana celular. Os receptores-TP medeiam a contracção enquanto os receptores EP_2 e / ou EP_4 medeiam as respostas de relaxamento.

Este grupo de prostanóides tem importância clínica, pelo facto de um deles, a PGE₁ (alprostadil) administrada por via intracavernosa, ser utilizada no tratamento da disfunção eréctil. Ela tem a capacidade de promover uma erecção satisfatória em 60 a 70% dos doentes, mas a dose-eficaz a administrar a cada doente apresenta uma enorme variabilidade, entre 0.5 e 20 µg, sendo necessário em alguns doentes aumentar para 40 µg. Neste trabalho procuramos caracterizar, de maneira individualizada, as respostas clínicas da PGE₁, individualmente, e relacioná-las com o relaxamento induzido *in vitro* nas amostras de tecido cavernoso recolhido a esses mesmos doentes. Verificamos a existência duma grande variabilidade nas respostas do CCH após a administração de PGE₁, tendo-se obtido valores muito diferentes de EC₅₀ e do relaxamento máximo. Constatamos também que uma má resposta clínica à PGE₁ se relaciona *in vitro* com valores mais elevados de EC₅₀ deste prostanóide e com um relaxamento máximo menor comparado com os doentes que têm uma resposta clínica parcial ou completa. Estes dados sugerem-nos que a eficácia da PGE₁ está condicionada pela variabilidade da resposta relaxante do CCH a este prostanóide.

O relaxamento do músculo liso trabecular humano não é mediado, exclusivamente, pela via do AMPc mas também por outras vias como a do GMPc, a qual desempenha um papel muito importante. Assim, na perspectiva de aumentar a eficácia clínica da PGE₁, e na continuidade do trabalho antes desenvolvido no laboratório, fomos avaliar a sua combinação com uma outra substância, um dador de óxido nítrico, capaz de activar a via do GMPc. Verificamos que o S-nitrosoglutatião (SNO-Glu), um dador de óxido nítrico do grupo dos S-nitrosotiois, produziu de forma consistente o relaxamento completo do músculo liso trabecular, mesmo nas amostras que responderam mal à PGE₁ isolada. A combinação de PGE₁ + SNO-Glu, na proporção molar de 1:100, produziu um relaxamento do CCH mais potente que qualquer uma das moléculas usadas em separado. A combinação de PGE₁ + SNO-Glu promove a activação das duas vias relaxantes fundamentais como se comprova pelo aumento, simultâneo, dos níveis tecidulares de AMPc e de GMPc no CCH. Observamos, além disso, a existência de sinergismo entre as duas moléculas, o que confere a esta combinação uma maior eficácia no relaxamento do CCH.

Esta informação inovadora permite propôr a combinação PGE₁ + SNO-Glu para a terapêutica intracavernosa da disfunção eréctil com possíveis vantagens clínicas, em relação, ao uso separado de cada uma delas.

Summary

We have characterised the prostanoid receptors involved in the regulation of human trabecular smooth muscle tone. Arachidonic acid induced relaxation of human corpus cavernosum strips (HCC) that was blocked by the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, and augmented by the thromboxane receptor (TP) antagonist, SQ29548, suggesting that endogenous production of prostanoids regulates penile smooth muscle tone. TP-receptors mediate contraction of HCC since the agonist of these receptors, U46619, potently contracted HCC (EC_{50} 8.3 ± 2.8 nM) and the contractions produced by prostaglandin $F_{2\alpha}$ and the selective FP agonist, fluprostenol, at high concentrations (EC_{50} 6460 ± 3220 nM and 29540 ± 14040 nM, respectively) were inhibited by the selective TP-receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μ M). The EP_1 / EP_3 receptors-agonist, sulprostone, not produced any contraction in same strips of the HCC.

EP-receptors are responsible for prostanoid-induced relaxant effects in HCC strips because only prostaglandin E_1 (PGE_1), prostaglandin E_2 and the EP_2 / EP_4 receptor agonist, butaprost, produced consistent relaxation of this tissue (EC_{50} 93.8 ± 31.5 ; 16.3 ± 3.8 and 1820 ± 1284 nM, respectively).

In summary, endogenous production of prostanoids may regulate penile smooth muscle contractility by way of specific receptors. TP-receptors mediate contraction in HCC strips while the relaxant effects of prostanoids are mediated by EP_2 and / or EP_4 receptors in HCC strips.

Many men with erectile dysfunction have been successfully treated with intracavernosal injection of PGE_1 but this treatment is ineffective in 30 - 40% of patients. One of the pitfalls of this therapy is the extreme variability of the dose necessary to achieve erection, it ranges between 0,5 and 40 μ g and the reasons are not yet fully understood. We have characterised PGE_1 -induced relaxation of isolated human penile smooth muscle correlating this response in vitro to the clinical response to this drug. Large variability in the EC_{50} values and maximal relaxation induced by PGE_1 was observed between tissues of different patients. The patients with poor clinical response to intracavernosal alprostadil (PGE_1) showed significantly larger EC_{50} values and smaller maximal relaxation to this prostanoid compared to patients with partial or complete clinical response to this drug. An additional goal of this work was to evaluate the effects of the combination of PGE_1 with S-nitrosoglutathion (SNO-Glu) on relaxation of isolated human penile smooth muscle. SNO-Glu consistently produced complete or near complete relaxation of HCC strips, even when the tissues responded

poorly to PGE₁. The combination of PGE₁ + SNO-Glu in a 1:100 molar ratio produced relaxant responses in HCC which were significantly more potent than those elicited by individual administration of the compounds. The analysis of these responses demonstrated a synergistic effect of PGE₁ and SNO-Glu to relax HCC strips. The combination of PGE₁ + SNO-Glu simultaneously increased the levels of both cAMP and cGMP in HCC tissue. Our results suggest that the clinical effectiveness of intracavernosal administration of PGE₁ is related to the variability of the relaxation responses of human trabecular tissue to this drug.

The synergistic interaction of PGE₁ and SNO-Glu makes this combination an effective method to cause penile smooth muscle relaxation, a necessary step to initiate and maintain penile erection

Sommaire

Le relâchement du muscle lisse trabéculaire est un pas fondamental dans la dynamique de l'érection. Les prostanoïdes sont un groupe de médiateurs présents dans de multiples processus biologiques, y compris la régulation du tonus du muscle lisse trabéculaire humain et, comme l'action exercée par chacun d'entre eux dépend directement de son récepteur dans la membrane cellulaire, la caractérisation des différents types de récepteurs-prostanoïdes s'avère d'un grand intérêt clinique.

Dans cette étude, nous caractérisons, tout d'abord, les récepteurs-prostanoïdes responsables des réponses contractiles et relâchantes, induites par les prostanoïdes. L'administration d'acide arachidonique (AA; 100 μ M) a provoqué le relâchement des échantillons de corps caverneux humain (CCH), lequel a été annulé par l'inhibiteur de la cyclooxygénase, l'indométacine, et potentialisé par l'antagoniste des récepteurs du thromboxane (R-TP), SQ29548. Ce fait suggère une production endogène des prostanoïdes à partir de AA, par action de la cyclooxygénase, lesquels déclenchent des réponses contractiles et relâchantes pour la régulation du tonus du muscle lisse du corps caverneux humain.

Les récepteurs TP sont responsables des réponses contractiles induites par les prostanoïdes dans le CCH car l'analogue du thromboxane A_2 , U46619, a déclenché une contraction puissante du CCH (EC_{50} 8.3 \pm 2.8 nM), en effet, des concentrations très élevées de $PGF_{2\alpha}$ (EC_{50} 6460 \pm 3220 nM) et de l'agoniste sélectif des récepteurs FP, fluprostenol, (EC_{50} 29540 \pm 14040 nM) ont été nécessaires pour provoquer des contractions appréciables du CCH. En outre, ces réponses contractiles ont été inhibées par l'antagoniste sélectif des récepteurs TP, SQ29548 (0.02 μ M). L'agoniste des récepteurs EP_1 / EP_3 , sulprostone, n'a entraîné aucune contraction sur les échantillons de CCH.

En ce qui concerne les récepteurs-prostanoïdes responsables des réponses relâchantes sur le CCH, seules les prostaglandines de la série E (PGE_1 ; PGE_2) et l'agoniste sélectif des récepteurs EP_2 / EP_4 , butaprost, ont déclenché un relâchement consistant de ces tissus (EC_{50} 93.2 \pm 31.5; 16.3 \pm 3.8; 1820 \pm 1284 nM, respectivement).

Nous pouvons en conclure que la production endogène de prostanoïdes peut réguler le tonus du muscle lisse trabéculaire par l'intermédiaire de récepteurs-spécifiques de la membrane cellulaire. Les récepteurs-TP mesurent la contraction tandis que les récepteurs EP_2 et / ou EP_4 mesurent les réponses du relâchement.

Ce groupe de prostanoides a une importance clinique dans la mesure où l'un d'entre eux, la PGE₁ (alprostadil) administrée par voie intracaverneuse, est utilisée dans le traitement du dysfonctionnement érectile. Elle a la capacité de déclencher une érection satisfaisante chez 60 à 70% des malades mais la dose-efficace à administrer à chaque malade présente une énorme variabilité, entre 0.5 et 20 µg, et pour certains malades, il sera même nécessaire de l'augmenter jusqu'à 40 µg. Au cours de cette étude, nous cherchons à caractériser, de manière individualisée, les réponses cliniques de la PGE₁ et de les comparer au relâchement induit *in vitro* aux échantillons de tissu caverneux recueilli sur ces mêmes malades. Nous constatons l'existence d'une grande variabilité dans les réponses du CCH, après l'administration de PGE₁, ayant été obtenues des valeurs très différentes de EC₅₀ et du relâchement maximum. Par ailleurs, nous constatons qu'une mauvaise réponse clinique à PGE₁ a un rapport *in vitro* avec des valeurs plus élevées de EC₅₀ de ce prostanoides et un relâchement maximal moindre en comparaison avec ceux qui ont une réponse clinique partielle ou complète. Ces données nous suggèrent que l'efficacité de la PGE₁ est conditionnée par la variabilité de la réponse relâchante du CCH à ce prostanoides.

Le relâchement du muscle lisse trabéculaire humain ne se mesure pas, exclusivement, par la voie du AMPc mais également par d'autres voies, comme celle du GMPc, qui joue un rôle très important. Aussi, dans le but d'augmenter l'efficacité clinique de la PGE₁, et en continuité du travail développé sur cet sujet au laboratoire, avons-nous décidé d'évaluer sa combinaison avec une autre substance, un donneur d'oxyde nitrique, capable d'activer la voie du GMPc. Nous constatons que le S-nitrosoglutation (SNO-Glu), un donneur d'oxyde nitrique du groupe des S-nitrosotriols, a déclenché de manière consistante, le relâchement complet du muscle lisse trabéculaire, même sur les échantillons ayant mal répondu à la PGE₁ isolée. Nous constatons que la combinaison de PGE₁ + SNO-Glu, dans la proportion molaire de 1:100, a entraîné un relâchement du CCH plus puissant qu'aucune autre des molécules utilisées séparément. La combinaison de PGE₁ + SNO-Glu entraîne l'activation des deux voies relâchantes fondamentales comme on peut le constater par l'augmentation simultanée des niveaux tissulaires de AMPc et de GMPc dans le CCH. En outre, nous observons l'existence d'une synergie entre les deux molécules ce qui confère à cette combinaison une grande efficacité dans le relâchement du CCH.

Cette information innovatrice permet de proposer la combinaison PGE₁ + SNO-Glu pour le traitement intracaverneux de la dysfonction érectile, avec de possibles avantages cliniques par comparaison à l'usage séparé de chacune d'entre elles.

1 – FISILOGIA DA ERECÇÃO

1.1 – MECANISMOS NEUROGÉNEOS

1.1.1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL

1.1.2 – SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

A – Neurotransmissão adrenérgica

B – Neurotransmissão colinérgica

C – Neurotransmissão não adrenérgica não colinérgica

1.2 – MECANISMOS VASCULARES

INTRODUÇÃO

1 - FISIOLÓGIA DA ERECCÃO

1.1 - MECANISMOS NEUROGENEOS

A ereccão do pênis compreende um conjunto complexo de acontecimentos neuro-endócrinos e vasculares, interrelacionados, que culminam na acumulação de sangue para a rigidez do órgão. Esta resulta de processos vasculares locais, que dependem da integração de mecanismos hormonais e neurológicos, iniciados a vários níveis do Sistema Nervoso Central. O conhecimento destes diferentes mecanismos e a sua interligação ainda não está completo, no entanto, é reconhecido que todos os impulsos sensitivos e hormonais reguladores do comportamento sexual são integrados no cérebro e, posteriormente, enviam sinais indutores pela espinal medula para os órgãos genitais externos.

Os sistemas olfactivo, táctil e sensitivo são muito importantes para a motivação sexual, porque recebem e enviam impulsos directamente para a Amígdala medial e desta para o Núcleo Paraventricular (NPV) e para a Área Pré-Óptica Medial (APOM) do Hipotálamo. A região do NPV e da APOM integram os sinais sensitivos e os hormonais, e estão interrelacionadas com outras zonas do cérebro, incluindo o Sistema Limbico, o Hipocampo e o Cortex Cerebral. O Núcleo Paragigantocelular (nPGi) é um centro serotoninérgico com uma função inibidora da ereccão. O Locus Coeruleus contém os neurónios noradrenérgicos que têm um efeito estimulador central e inibitório periférico.

O Sistema Nervoso Periférico compreende o sistema autónomo e o sistema somático. O plexo pélvico, constituinte do sistema nervoso autónomo e localizado na face lateral da próstata, recebe os impulsos dos nervos hipogástricos e pélvicos. Envia ramificações para os órgãos pélvicos incluindo a bexiga, uretra, glândulas sexuais e pênis. A sua ramificação mais longa, o nervo cavernoso, contém fibras simpáticas e parassimpáticas que integram a inervação para o pênis, as glândulas bulbo-uretrais e os músculos ano-coccigeos (Lepor e col., 1985). A inervação somática para os órgãos pélvicos, provém do nervo pudendo, compreende uma porção sensitiva e uma porção motora. As ereccões reflexogéneas desencadeiam-se, no arco reflexo sagrado, dentro da espinal medula parassimpática (S₂ – S₄). (Fig. 1)

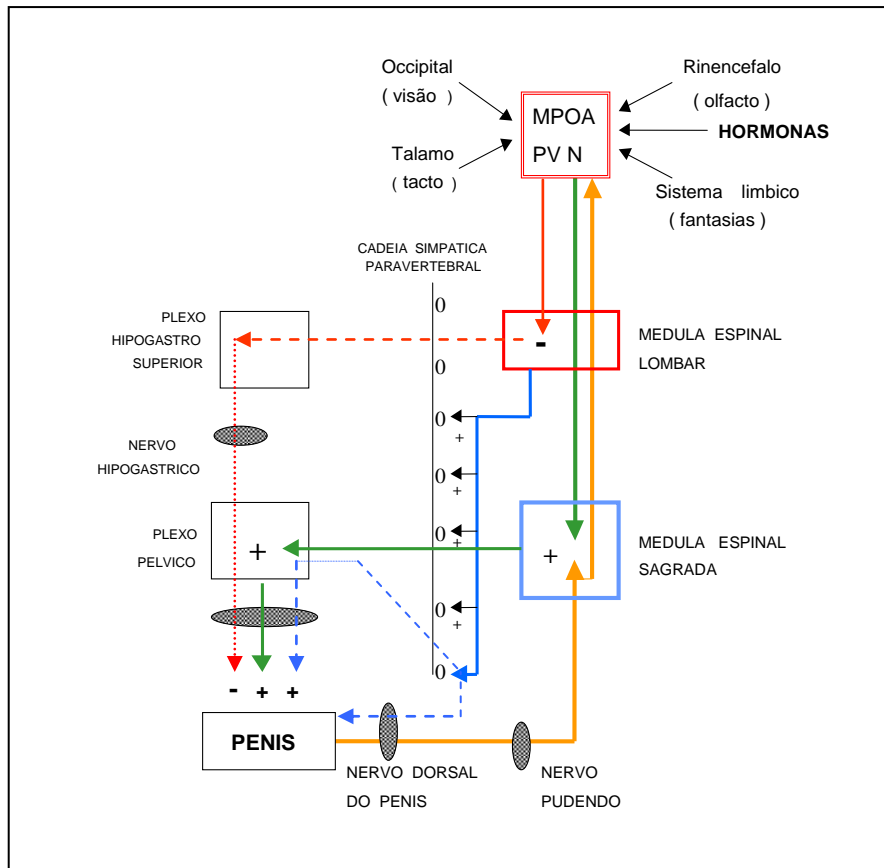


Fig. 1 - Diagrama das vias neurogêneas centrais e periféricas da ereção

1.1.1 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O envolvimento do Sistema Nervoso Central na dinâmica da ereção é inquestionável, mas os circuitos neurológicos e os neurotransmissores envolvidos na fisiologia ainda não estão bem conhecidos. Os mecanismos centrais envolvidos no controle da ereção incluem as vias supra-espinhais bem como as da espinal medula.

Entre os diversos neurotransmissores centrais (Fig.2), têm sido atribuídas funções importantes para a serotonina, a dopamina, o óxido nítrico, a oxytocina e a noradrenalina (Argiolas e col. 1995).

Serotonina

O envolvimento da serotonina (5-Hidroxytriptamina; 5-HT) presente a nível espinhal, supra-espinhal e periférico na função erétil é complexo, com repercussões na ereção, na ejaculação e no comportamento sexual (Andersson e Wagner, 1995).

A complexidade deste envolvimento deve-se à presença de inúmeros tipos de receptores de 5-HT nos centros cerebrais, como no núcleo paragigantocelular (nPGi), na comissura cinzenta dorsal e no núcleo parassimpático sagrado. As vias da 5-HT parecem exercer um efeito inibidor global no comportamento sexual, muito embora estas vias possam ser inibitórias ou facilitadoras conforme o tipo de receptor 5-HT envolvido no SNC (Ahlenius e col., 1989). Os receptores da 5-HT responsáveis pela erecção são do subtipo 5-HT_{2C} (Steers e col., 1990), pois a sua acção eréctil pode ser bloqueada por antagonistas dos receptores 5-HT_{2C} e não pelos antagonistas dos receptores 5-HT_{2B}. Os receptores 5-HT_{2C}, além de mediar a resposta eréctil, também aumentam os níveis de oxytocina circulante (Bagdy e col. 1992). Os inibidores da sintase de NO (NOS) administrados por via intracavernosa inibem a resposta eréctil induzida pelos receptores 5-HT_{2C}, o que supõe a oxytocina e NO estarem envolvidos nas respostas mediadas pelos receptores 5-HT_{2C} (Melis e col. 1997; Andersson e col., 1995). Portanto, a 5-HT está implicada na função sexual masculina e parece desempenhar uma acção fundamental no mecanismo neurogéneo central da erecção peniana (Andersson e col., 1995).

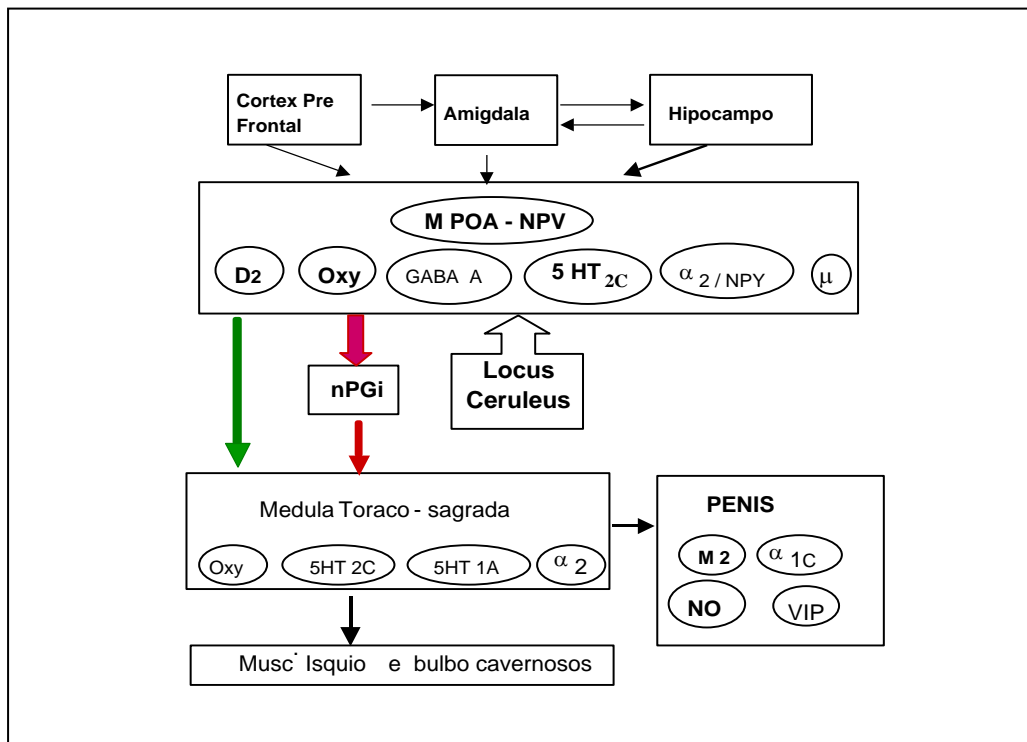


Fig. 2 – Esquema de neurotransmissores centrais

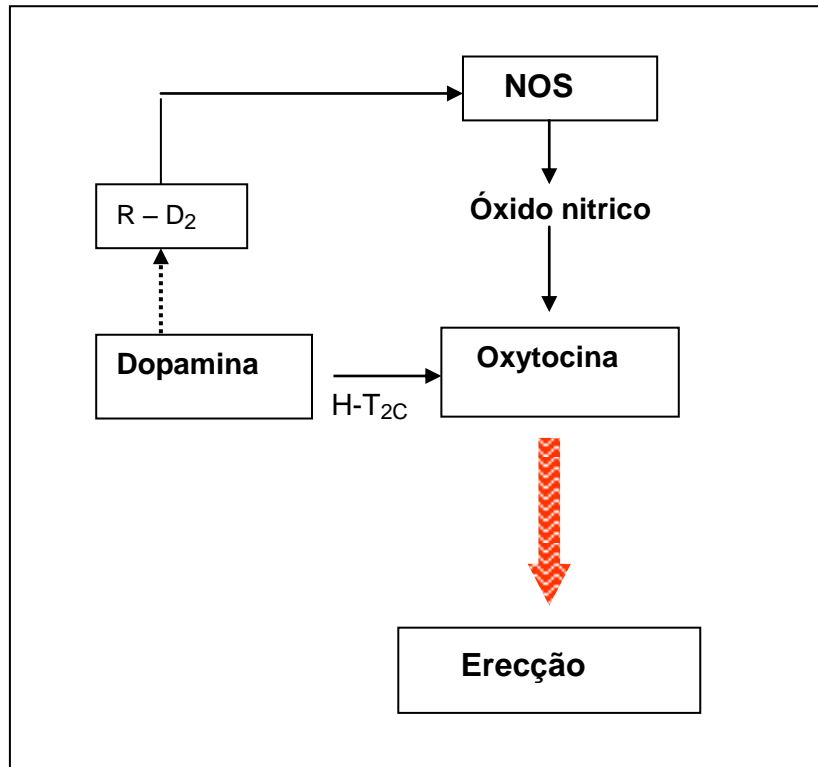
Dopamina

A dopamina está implicada no mecanismo global da erecção por induzir um efeito erectogéneo central. Os neurónes dopaminérgicos centrais encontram-se localizados no hipotálamo com projecções para a Área Pré-Óptica Medial (APOM) e o Núcleo Paraventricular (NPV). Foram identificados outros neurónes dopaminérgicos, que a partir do hipotálamo caminham na via da dopamina diencefalo-espinhal para a espinhal medula lombo-sagrada (Skagerberg e col., 1985) e, por este mecanismo, participam na regulação central dos componentes autonómico e somático do pénis. Foram identificados dois tipos de receptores para a dopamina (D_1 e D_2), sendo a erecção mediada pelos receptores D_2 localizados no NPV (Sibley e col., 1999). A estimulação destes receptores induz a activação da enzima NOS para formar NO e a activação do sistema oxytocinérgico. Os neurónes dopaminérgicos em contacto com as células oxytocinérgicas no núcleo paraventricular libertam a oxytocina e esta, através do sistema oxytocinérgico, vai desencadear a resposta erétil (Argiolas e col. 1995).

Os agonistas da dopamina, como a apomorfina, têm actividade erétil porque activam os receptores D_2 . A apomorfina injectada no NPV (e não na APOM) aumenta a emissão seminal (pela contracção dos músculos estriados bulbo-cavernoso, isquio-cavernoso e do colo vesical) e o relaxamento da musculatura lisa trabecular do pénis, (Andersson e col., 1995), o que revela para além da acção erétil também tem efeito na emissão seminal e na função vesical (Pehek e col., 1989).

Oxytocina

As projecções oxytocinérgicas medulares provenientes do NPV e da APOM, implicadas na erecção, exercem a sua acção no sistema nervoso autónomo parassimpático sagrado e, em menor grau, no sistema nervoso somático (Tang e col., 1998). A oxytocina, além do papel na contracção uterina e na secreção da prolactina, tem funções na neuromodulação e na neurotransmissão. A oxytocina também estimula a produção de óxido nítrico no NPV (Melis e col., 1997) e a activação desta via oxytocinérgica pode ser induzida pela dopamina e pelos agonistas dos receptores $5-HT_{2C}$, como o trazodone (Sibley e col., 1997). A oxytocina encontra-se, portanto, envolvida no comportamento sexual e na indução da erecção.



Noradrenalina

A informação sobre a activação dos neurónes noradrenérgicos centrais localizados, fundamentalmente, no Locus Coeruleus ainda é escassa. Funcionam como iniciadores do envolvimento sexual e os estudos disponíveis sugerem que a activação noradrenérgica é capaz de iniciar a erecção, enquanto a sua inibição pode deprimir a iniciativa sexual (Biltran e col., 1987; Rampin, 2000; Giuliano e col., 2000).

ACTH e Peptídeos

As hormonas adrenocorticotrófica (ACTH) e alfa-melanocito (α -MSH) têm estado associadas com a resposta erétil. A administração destes peptídeos na região inter-cerebro-ventricular induz a erecção peniana, o estiramento do corpo e a emissão de sons durante o orgasmo. A maioria dos efeitos do α -MSH / ACTH são mediados pelos receptores da melanocortina. Estes peptídeos parecem actuar na região pre-ventricular do hipotálamo para induzirem a erecção. O mecanismo para induzir a erecção mediada pela ACTH é diferente da acção da dopamina e da oxytocina no NPV. Este efeito potencial da α -MSH para induzir a erecção ainda não está clarificado.

A Substância P é um péptido presente no sistema nervoso central com uma acção neurotransmissora no comportamento, na ansiedade, na depressão e a nível vascular periférico. Tem uma forte actividade dilatadora por relaxamento sobre o músculo liso arteriolar, pelo contrário causa contracção no músculo liso venoso, intestinal e bronquico. Os efeitos da substância P são mediados por proteínas Gs acopladas a receptores de membrana do tipo NK1.

O Neuropeptide Y está presente em altas concentrações no cérebro e no sistema nervoso periférico. Este neuropeptideo encontra-se localizado nos neurónes noradrenérgicos e tem uma acção vasoconstritora, mediada por receptores (Y) acoplados a proteínas Gs, que inibem a adenililciclase, e activam a fosfolipase C.

Óxido nítrico

O óxido nítrico, para além do papel bem definido nos mecanismos periféricos, encontra-se envolvido nos mecanismos centrais da erecção. Pode modular o comportamento sexual e a erecção peniana (Lorrain e col., 1996), após a activação da Área Pré-óptica Medial (Sato e col., 1999) e do Núcleo Paraventricular (Melis e col., 1997) induzida pela apomorfina, pelos agonistas da 5-HT_{2C} e pela oxytocina. A administração de inibidores da NOS no Núcleo Paraventricular impede as respostas erécteis induzidas pelos agonistas dopaminérgicos, oxytocinérgicos e serotoninérgicos (Melis e col., 1997). Verificou-se também uma produção aumentada de NO no NPV de ratos-machos durante a erecção (sem contacto genital) e durante a cópula, o que confirma ser o óxido nítrico um mediador fisiológico central da erecção peniana (Melis e col., 1998), e sugere a presença dum sistema central do NO / GMPc, para além do existente no corpo cavernoso, e ambos serem responsáveis pela indução da erecção (Sato e col., 2001).

1.1.2 – SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

As estruturas do pênis recebem terminações nervosas simpáticas, parassimpáticas e sensitivas (Andersson e col., 1995). Na fase de repouso predomina a contracção da musculatura lisa induzida pelo estímulo adrenérgico. A erecção é induzida por estimulação directa do sistema parassimpático ou a inibição do sistema simpático. As terminações nervosas autónomas contêm vesículas preenchidas por uma substância, denominada neurotransmissor, que após a chegada da onda de despolarização do impulso nervoso, libertam-no para difundir entre as células musculares lisas. Este neurotransmissor vai estabelecer, normalmente, o contacto num local específico da membrana celular, chamado receptor, e desencadear o efeito esperado. Os neurotransmissores actuam sobre o tónus contráctil do tecido muscular liso do corpo cavernoso por três tipos diferentes de neurotransmissão autónoma:

- A) Neurotransmissão adrenérgica
- B) Neurotransmissão colinérgica
- C) Neurotransmissão não adrenérgica não colinérgica (NANC)

A - Neurotransmissão adrenérgica

O neurotransmissor é a noradrenalina (NA). Foram identificados vários tipos de receptores adrenérgicos nas artérias e no músculo liso trabecular, cada um com uma função diferente (De Groat e col., 1993). Verifica-se uma maior predominância dos receptores α_1 no tecido muscular liso do corpo cavernoso, em relação às estruturas vasculares e, até ao momento, foram identificados os subtipos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} / α_{1L} .

Os receptores do subtipo α_1 , pós-sinápticos, são os responsáveis pela contracção do músculo liso trabecular em resposta à estimulação da noradrenalina e com um papel importante na dinâmica da erecção (Davis e col., 1999).

Entre os receptores do subtipo α_2 , uns são pré-sinápticos e outros pós-sinápticos. Os receptores α_2 pré-sinápticos, além da sua localização nas terminações adrenérgicas, encontram-se também nas terminações NANC, e modulam este tipo de neurotransmissão, pois produzem a inibição das respostas mediadas pela estimulação dos nervos nitrérgicos (Simonsen e col., 1997). Estes receptores α_2 pré-sinápticos também actuam na modulação da transmissão adrenérgica pois regulam, por mecanismo retro-activo, a libertação da NA (Saenz de Tejada e col., 2000) (Fig. 4).

Os receptores α_2 pós-sinápticos originam vasoconstrição pela estimulação da noradrenalina. A noradrenalina libertada nas terminações adrenérgicas estimula os

receptores α_2 existentes nas artérias helicinas e no tecido muscular liso do corpo cavernoso, e deste modo contribuem para o estado de flacidez peniana. Os androgéneos modulam esta resposta dos receptores α_2 no músculo liso cavernoso (Reilly and col., 1997).

Os receptores β_2 induzem o relaxamento do músculo liso trabecular, como se verifica pela acção de fármacos β -adrenérgicos específicos (Costa e col., 1993).

B - Neurotransmissão colinérgica

A neurotransmissão colinérgica encontra-se distribuída pelos ganglios autonómicos do plexo paravertebral, do plexo pélvico e pelo tecido erétil. Os tecidos penianos são muito ricos em estruturas nervosas colinérgicas (Andersson e col., 1995). A Acetilcolina (Ach) origina vasodilatação dum forma indirecta, pois actua sobre os receptores muscarínicos (subtipo M_3) pós-sinápticos do endotélio e este, por sua vez, liberta NO que vai actuar como mediador do efeito relaxante na célula muscular lisa.

A actividade parassimpática não tem uma equivalência paralela às acções da acetilcolina, porque podem ser libertados outros neurotransmissores pela inervação colinérgica como, por exemplo, o óxido nítrico (Hedlund e col., 2000).

A actividade colinérgica, parassimpática, pode facilitar a erecção, por inibir a libertação de NA após estimulação dos receptores muscarínicos (M_2) pré-sinápticos nas terminações adrenérgicas (Saenz de Tejada e col. 1989) e por facilitar a libertação de NO e VIP pelos nervos NANC. (Fig. 4)

C - Neurotransmissão não adrenérgica não colinérgica (NANC)

Suspeitou-se a existência de outro tipo de neurotransmissão pois comprovou-se, que a atropina com acção bloqueadora muscarínica, não inibia a erecção induzida por estimulação eléctrica das terminações parassimpáticas (Saenz de Tejada e col., 1988). Após inibição da neurotransmissão adrenérgica e colinérgica a estimulação das terminações nervosas do corpo cavernoso produzia respostas relaxantes mediadas por uma outra substância, posteriormente, denominada Óxido nítrico (Ignarro e col., 1990; Kim e col., 1991; Rajfer e col., 1992). Verificou-se mais tarde que a maioria destas terminações nervosas do pénis contém a enzima NOS (Hedlund e col., 2000). Foi, igualmente, identificado o polipeptido intestinal vasoactivo (VIP) nestas estruturas nervosas (nervos vipérgicos) (Dail, 1993). Os seus receptores (tipo 1 e tipo 2) ligam-se na membrana celular a uma proteína Gs estimuladora da adenililciclase, conduz a

aumento intracelular de AMPc e, por este mecanismo, produz o relaxamento do músculo liso trabecular (Hedlund e col., 1995). No entanto, continua por conhecer se o VIP tem outras acções, nomeadamente prolongar o efeito relaxante inicial do NO, e assim o tempo da erecção pelo que o seu papel não está clarificado na dinâmica da erecção peniana. (Fig. 4)

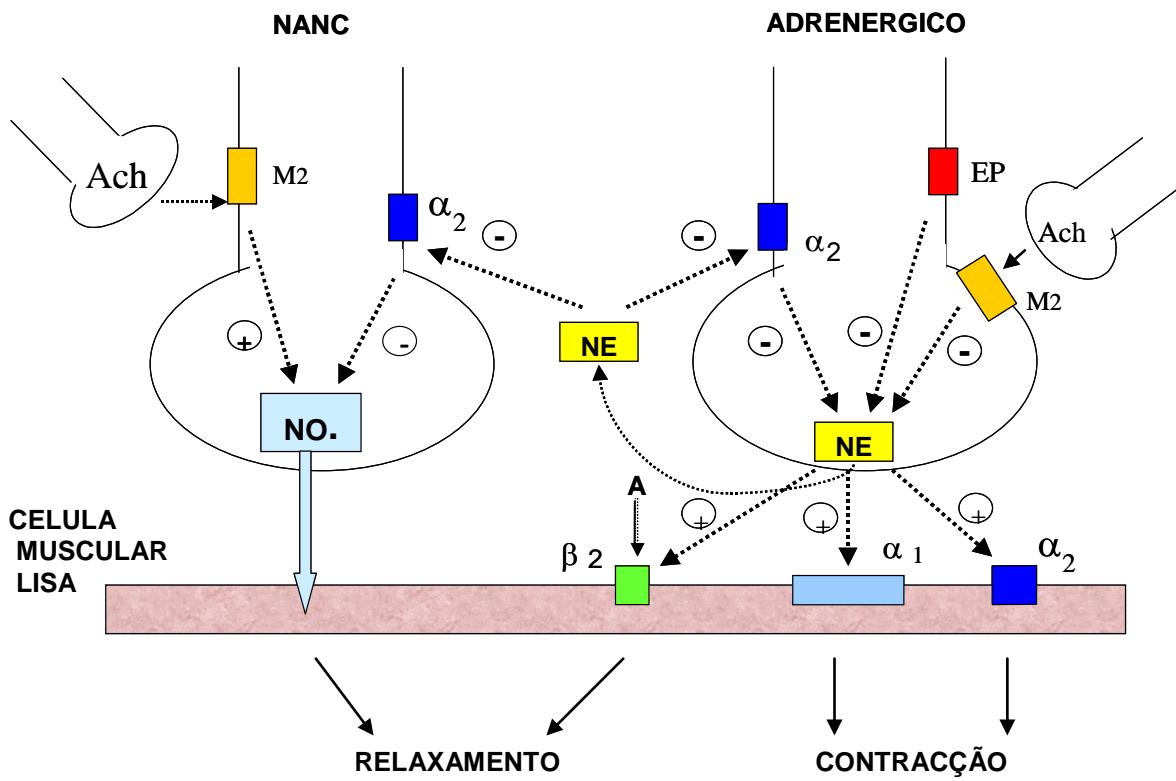
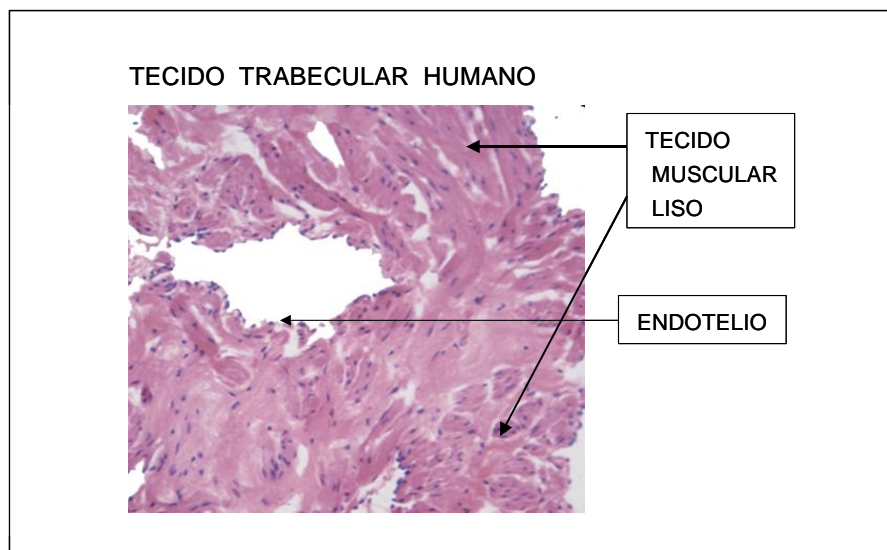


Fig. 4

1.2 - MECANISMOS VASCULARES

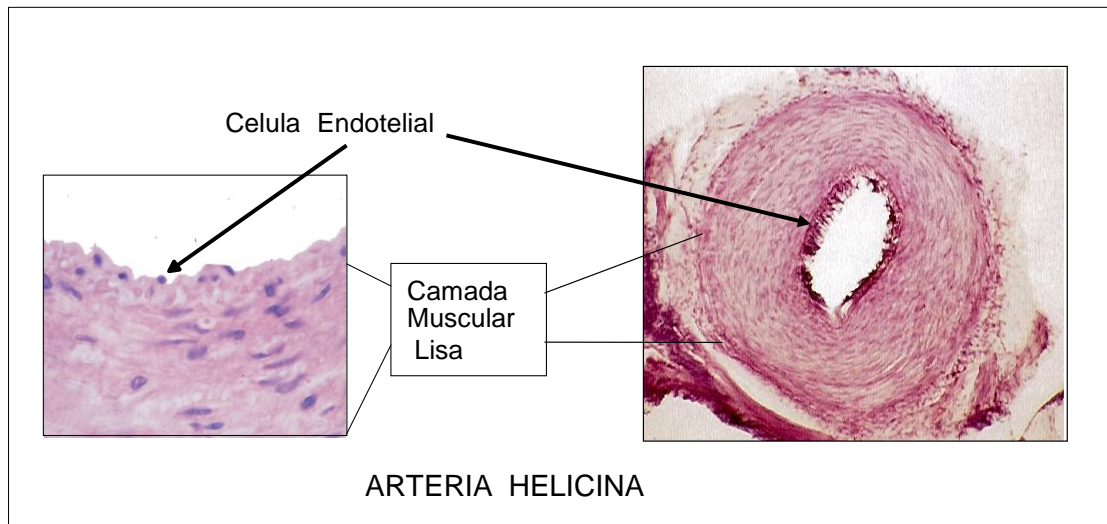
No estado flácido o músculo liso trabecular encontra-se contraído sob a influência do sistema nervoso simpático noradrenérgico e da endotelina (Saenz de Tejada e col., 1989; Christ e col., 1995). Neste estado o fluxo arterial é mínimo, apenas para a manutenção do metabolismo celular, e os gases do sangue são equivalentes ao sangue venoso (pO_2 entre 30 – 40 mmHg). Durante a erecção verifica-se um notável aumento do fluxo de sangue dentro do pénis com expansão das paredes trabeculares e dos espaços lacunares. Os espaços lacunares, ou sinusóides, são espaços vasculares forrados pelo endotélio que intercomunicam, amplamente, entre si. Este aumento do fluxo de sangue arterial leva à elevação súbita da tensão parcial de oxigénio (pO_2), os valores da pressão intracavernosa aproximam-se da pressão arterial sistémica, o que vai conduzir à rigidez completa.

As comunicações entre os sinusóides facilitam a passagem do sangue dum espaço para o outro e, ao mesmo tempo, transmitem a pressão no sentido da zona proximal para a distal do pénis. Estes espaços lacunares têm maior diâmetro na região central, a que circunda a artéria cavernosa, e diminuem progressivamente na direcção da periferia para junto da túnica albuginea. (Fig. 5).



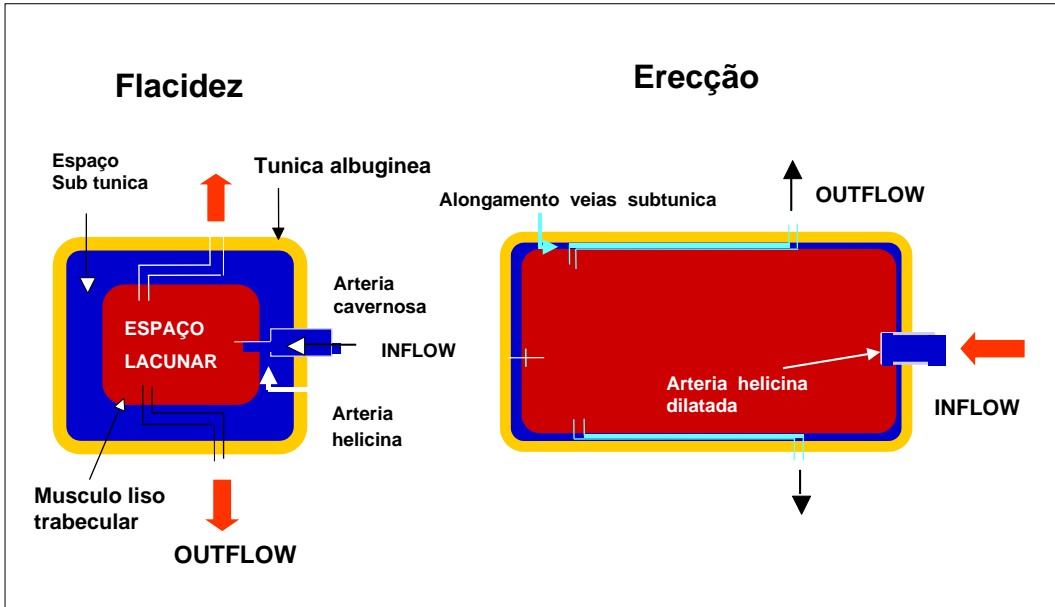
Esta disposição anatómica constitui um obstáculo à drenagem venosa dos corpos cavernosos durante a erecção. No estado flácido, a drenagem venosa do pénis ocorre numa forma fácil e, globalmente, a baixa resistência. As pequenas veias formam uma rede por baixo da albuginea, coalescem entre si para formarem as veias emissárias, perfuram a túnica albuginea e drenam directamente, ou através das veias circunflexas, nas veias profundas (Fuchs e col., 1989).

O sangue arterial para os corpos cavernosos do pênis provém da artéria pudenda interna que, antes de penetrar no crura, divide-se em três ramos – a artéria bulbo-uretral, a artéria cavernosa e a artéria dorsal do pênis. A artéria cavernosa, a mais importante na dinâmica da ereção, dá origem ao longo do seu trajecto a múltiplas artérias helicinas, as quais circundam e/ou desaguam nos espaços lacunares. (Fig. 6)



O fluxo arterial penetra nestes espaços expande os sinusóides e as paredes trabeculares contra a túnica albuginea. O mecanismo que retém o sangue arterial no interior dos corpos cavernosos, conhecido por mecanismo corporo-veno-oclusivo depende, fundamentalmente, da capacidade relaxante do músculo liso trabecular e da compressão das veias emissárias pela túnica albuginea (Fournier e col., 1987).

O relaxamento do músculo liso trabecular, associado ao aumento da pressão intrasinusoidal, expandem a túnica albuginea até ao limite da sua expansibilidade. Durante a ereção, as veias ficam estiradas, o que diminui o seu diâmetro e, ao ficarem mais estreitas e mais longas, oferecem maior resistência à drenagem do sangue. A integridade deste mecanismo corporo-veno-oclusivo permite manter a pressão intracavernosa elevada com um débito arterial de manutenção muito baixo (1 a 5 ml/min para manter a pressão entre 60 - 100 mmHg durante a ereção) (Saenz de Tejada e col., 1991).



2 – DINÂMICA DA EREÇÃO

2.1– MECANISMOS REGULADORES DO TONUS DO MÚSCULO LISO DO PÊNIS

2.1.1 – Sistema Adrenérgico

2.1.2 – Endotelina

2.1.3 – Papel dos nucleótidos cíclicos

A – A via do AMPc

B – O óxido nítrico e a via do GMPc

2.1.4 – Substâncias dadores de óxido nítrico

A – S-Nitrosoglutatião

2.1.5 – Outros Mecanismos

A – Hiperpolarização celular

B – Comunicações intercelulares

2 – DINÂMICA DA ERECCÃO

2.1 - MECANISMOS REGULADORES DO TONUS DO MÚSCULO LISO DO PÊNIS

A erecção inicia-se a partir da libertação de mediadores pelas terminações nervosas e pelo endotélio vascular, os quais vão ocasionar o relaxamento do músculo liso do pénis. O músculo liso do pénis engloba o músculo liso da camada média das artérias helicinas e o componente muscular das trabéculas dos espaços sinusóidais (Padma-Nathan, 1990). A actividade contráctil fisiológica do músculo liso do pénis depende de múltiplos factores, como a produção de agonistas (neurotransmissores, hormonas e produtos derivados do endotélio), um número adequado de receptores na membrana celular, a integridade dos mecanismos de transdução, a interacção das proteínas contrácteis e as comunicações intercelulares das células musculares lisas (conexões).

O exame ultra-estrutural da célula muscular lisa evidência a existência de estruturas filamentosas finas, grossas e intermédias. Os filamentos finos são constituídos de actina e os grossos de miosina. Os intermédios contêm desmina ou vimentina. Após a fosforilação da miosina pelo ATP, formam-se uniões entre as cabeças globulares da cadeia leve de miosina e a actina. Estas pontes dão origem ao tonus contráctil do músculo liso, que se mantém à custa de baixo gasto de energia (Christ e col., 1995). A contracção do músculo liso do pénis depende do aumento da concentração intracelular do cálcio livre, para o que são activados os diferentes mecanismos, de forma a facilitarem a entrada na célula de cálcio do compartimento extracelular e / ou a libertação de cálcio acumulado nas organelas intracelulares, sobretudo no reticulo sarcoplasmático (Nahorski e col., 1994).

2.1.1 – Sistema adrenérgico

A detumescência do pénis é mediada, principalmente, pela estimulação das terminações nervosas adrenérgicas cujo neurotransmissor, a noradrenalina, actua nos receptores adrenérgicos. A contracção da artéria cavernosa é mediada, fundamentalmente, por estimulação dos receptores α_2 - adrenérgicos, mas no músculo liso trabecular predomina a contracção mediada pelos receptores α_1 - adrenérgicos (Hedlund e col., 1985; Saenz de Tejada e col., 1989). A activação dos receptores α_1 - adrenérgicos provoca aumento da concentração intracelular de cálcio livre, resulta da acção da fosfolipase C, que promove a libertação de diacilglicerol (DAG) e do inositoltrifosfato (IP₃). O DAG estimula a proteinaquinase C (PKC) e o IP₃ estimula os

seus receptores nos reservatórios intracelulares de cálcio provocando a sua saída para o citoplasma. O estímulo adrenérgico origina a vasoconstrição das artérias e a contracção do músculo liso trabecular do que resulta a redução do fluxo arterial e o colapso dos espaços sinusoidais. A contracção do músculo liso trabecular coincide com o início da descompressão das veias emissárias, o que facilita a drenagem dos corpos cavernosos, e assim o esvaziamento dos espaços lacunares (Saenz de Tejada e col., 1991). A estimulação dos receptores β -adrenérgicos ocasiona relaxamento do músculo liso arterial e trabecular sendo o subtipo β_2 , provavelmente, o mais importante mediador deste efeito relaxante, pois induz o aumento de AMPc intracelular. No sistema vascular a expressão dos receptores β_2 – adrenérgicos com capacidade relaxante vai diminuindo com o avançar da idade, pelo que vão predominar os mecanismos constritores α - adrenérgicos (Dhabuwala e col., 1985; Hedlund e col., 1985).

2.1.2 – Endotelina

O endotélio elabora substâncias com actividade vasodilatadora (PGEs, PGI₂, Óxido nítrico) e outras com actividade vasoconstritora (TxA₂, endotelinas). As endotelinas contribuem para a manutenção do tónus contráctil do pênis (Andersson e col. 1990) tendo sido identificadas três isoformas de endotelinas (ET-1; ET-2; ET-3). A ET-1 é sintetizada no corpo cavernoso, a nível do endotélio vascular e libertada para o músculo liso trabecular (Saenz de Tejada e col., 1991).

Os receptores da endotelina estão presentes em vários tecidos do organismo incluindo o tecido muscular liso vascular, o músculo cardíaco, o sistema nervoso central, os pulmões, os rins, a suprarrenal e o intestino. Foram identificados dois tipos de receptores, ET_A e ET_B acoplados a proteínas Gs da membrana celular. O tipo ET_A, encontra-se localizado nas células musculares lisas e tem uma elevada afinidade para a ET-1, enquanto o tipo ET_B encontra-se no endotélio vascular onde medeia a libertação de PGI₂ e do óxido nítrico. Depois de activados, os receptores de endotelina induzem o aumento da concentração intracelular de cálcio, que resulta do influxo de cálcio extracelular pelos canais de cálcio da membrana, e da estimulação da fosfolipase C com a formação de inositoltrifosfato (que liberta cálcio do retículo endoplasmático) e de diacilglicerol (que activa a proteína kinase C) que em conjunto levam a fosforilação da cadeia leve de miosina e contracção celular.

As endotelinas, incluindo a ET-1, apresentam por este mecanismo uma potente actividade vasoconstritora (Christ e col. 1995), sendo certo que para além deste efeito,

a endotelina-1 tem uma potente actividade mitogénea nas células musculares lisas vasculares e cardíacas, regula o tónus do músculo liso cavernoso e modula o efeito contráctil de outras substâncias, como por exemplo a noradrenalina (Costa e col., 1993) e, por este mecanismo aumentam o tónus contráctil permanente no corpo cavernoso (Saenz de Tejada e col., 1991)

2.1.3 – PAPEL DOS NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS

A - Via do AMPc

No músculo liso trabecular do pênis, as prostaglandinas E (PGE_1 e PGE_2), podem interagir com receptores específicos (R-EP), acoplados a proteínas Gs, e proceder à estimulação da enzima adenililciclase (AC). Esta, a partir da 5'-trifosfato de adenosina (ATP), estimula a síntese intracelular de 3'-5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), o mediador principal do efeito erectogéneo da PGE_1 (Miller e col., 1994). A acumulação deste nucleótido cíclico, leva a diminuição da concentração intracelular do cálcio livre e, como consequência, ao relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. Este mecanismo tem-se revelado muito eficiente no relaxamento do músculo liso do pênis, como se constata pelos efeitos erecteis da PGE_1 administrada por via intracavernosa (Porst, 1996). O AMPc vai ser inactivado, posteriormente, pelas enzimas fosfodiesterases de tipo 2 e 3 (PDE2 e PDE3) (Stief e col., 1995). A via de relaxamento do músculo liso peniano mediada por AMPc também é activada pela acção de outros mediadores como o VIP (Hedlund e col., 1995), através de receptores específicos na membrana celular, e pela NA através dos receptores β_2 - adrenérgicos (Costa e col., 1993). (Fig. 7).

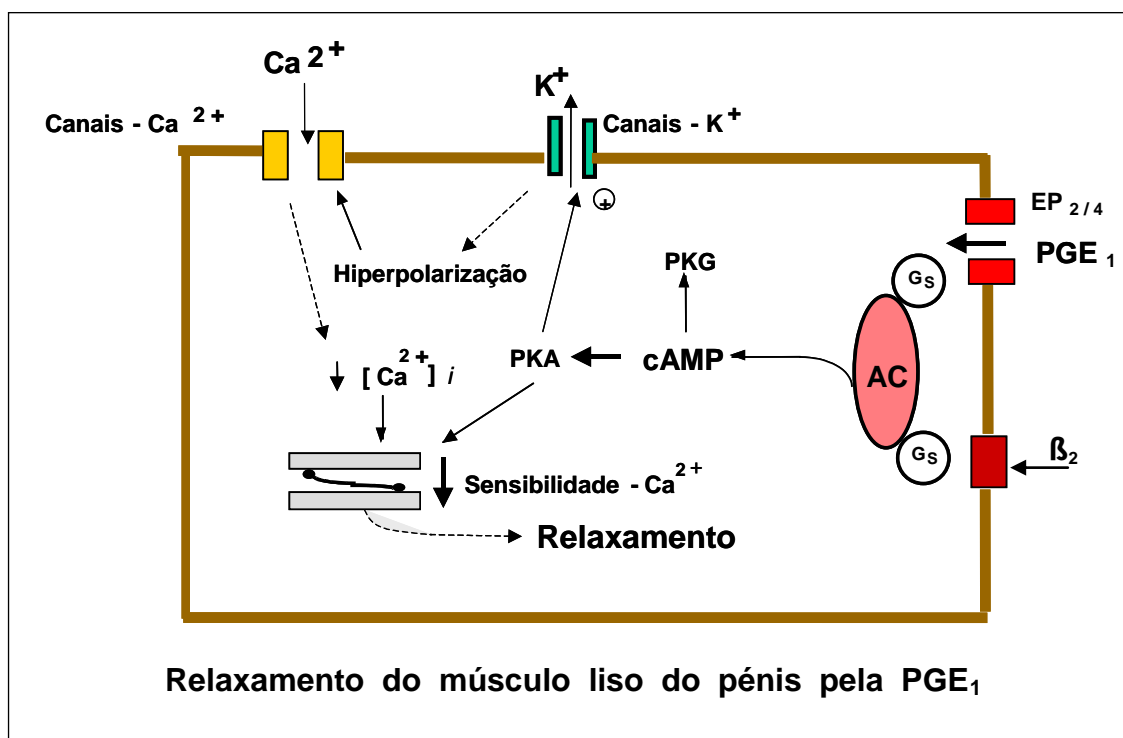


Fig. 7

B – O Óxido nítrico e a via do GMPc

A produção endógena de óxidos de nitrogénio, na forma de iões nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) era conhecida apenas nos macrófagos no sistema de defesa do organismo contra infecções.

Estudos recentes têm revelado que muitas células sintetizam óxido nítrico e esta molécula tão simples pode desempenhar funções fundamentais na regulação do sistema nervoso, imunológico e cardiovascular. Anteriormente, Robert Furchgott e Zawadzki tinham verificado em 1980 que preparações isoladas de músculo liso vascular após a estimulação com acetilcolina, o endotélio libertava um vasodilatador de acção muito curta o qual não era bloqueado pelos inibidores da ciclooxigenase, como era a prostaciclina. Eles chamaram, então, a essa substância o Factor Relaxante Derivado do Endotélio (FRDE). A partir desta descoberta foram realizados muitos trabalhos em simultâneo, até que em 1987, três centros independentes verificaram que o FRDE e o Óxido nítrico seriam a mesma substância. A importante contribuição para a identificação do óxido nítrico e das suas funções biológicas em vários tecidos do organismo mereceu a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad, em 1998, o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina.

O NO é um gás altamente difusível formado por um átomo de nitrogénio com um de oxigénio e tem um electrão-livre não parelhado. Este radical livre ($\text{NO}\cdot$) é uma molécula altamente reactiva e instável com um papel modulador em várias actividades biológicas incluindo a dilatação dos vasos sanguíneos, a inibição da agregação plaquetária, a estimulação da actividade citotóxica dos macrófagos e a neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico. O óxido nítrico desempenha um papel fundamental no relaxamento do músculo liso cavernoso (Rajfer e col., 1992; Ignarro e col., 1989; Kim e col., 1991; Andersson, 1995), sendo produzido a nível do endotélio vascular e das terminações nervosas nitrérgicas.

O Óxido nítrico é sintetizado por uma família de enzimas denominadas sintases de óxido nítrico (NOS). Estas sintases do óxido nítrico (NOS) são as responsáveis pela sua produção utilizando como substracto o aminoácido L-arginina e o oxigénio molecular (O_2). Esta reacção requer um conjunto de cofactores, entre eles o NADPH, o dinucleotido adenina-flavina (FAD), a tetrahydrobiopterina (BH_4) e a calmodulina (CaM) activada pelo cálcio (Moncada e col., 1988). (Fig. 8)

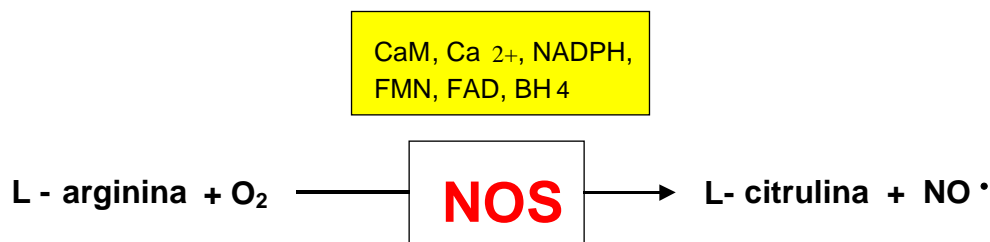


Fig. 8

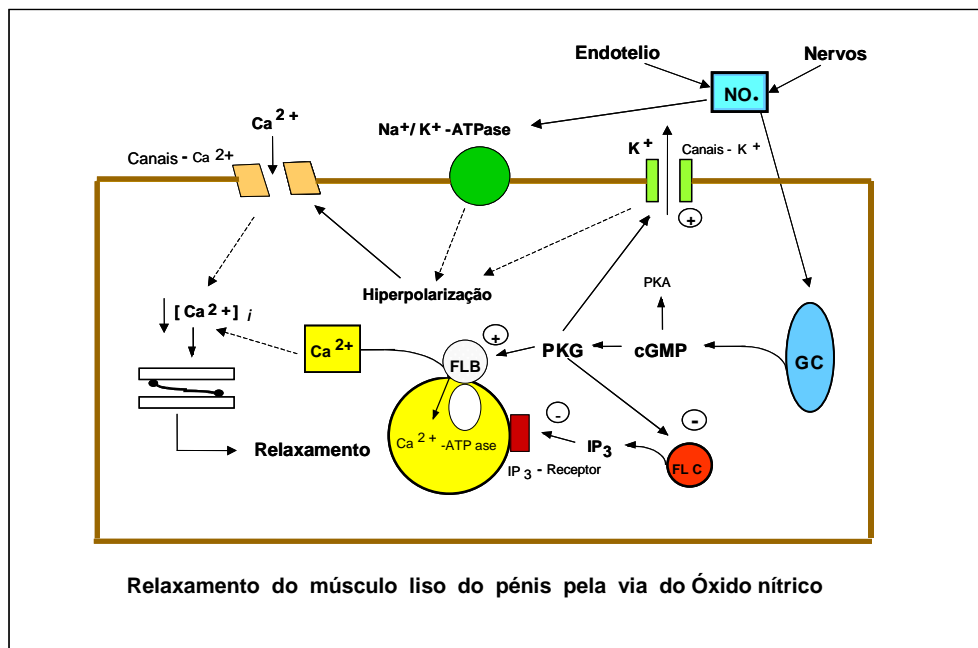
São conhecidas três isoformas da NOS, sendo cada uma delas importante para a síntese de NO. A isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS) encontra-se localizada no SNC e nas terminações nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC). A isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) encontra-se no endotélio vascular e trabecular. A isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (iNOS), encontra-se nos macrófagos e pode estar expressa no músculo liso, em algumas condições patológicas, todavia ainda não se conhece nenhum papel na fisiologia da erecção.

A administração, em modelos animais de inibidores da Sintase de NO leva a inibição das respostas erécteis (Holmquist e col., 1991).

Assim, a formação de NO no tecido peniano depende do controle neurogéneo (nervos nitrérgicos) e do endotélio vascular. O óxido nítrico derivado do endotélio e das terminações nitrérgicas induz relaxamento do músculo liso, por activar a enzima guanililciclase, o que aumenta da síntese de GMPc (Forstermann e col., 1986; Saenz de Tejada e col., 1991). Existe um conjunto de doenças do sistema cardiovascular, incluindo a hipertensão arterial (Calver e col., 1992; Panza e col., 1990), a hipercolesterolemia (Creager e col., 1992), a diabetes mellitus (Saenz de Tejada e col., 1989; Calver e col., 1992), a aterosclerose (Forstermann e col., 1988; Zeiher e col., 1991) que estão associadas a alterações da via da L-arginina-NO, pois tem-se constatado uma deterioração das respostas mediadas pelo NO no corpo cavernoso associada a estas patologias (Saenz de Tejada e col., 1988; Azadzoi e col. 1992). Ao contrário, do que ocorre com muitas outras substâncias reguladoras do relaxamento do músculo liso, o NO não necessita dum receptor-especifico na membrana celular para exercer o seu efeito relaxante. O NO atravessa com facilidade a membrana celular, liga-se à enzima guanililciclase (GC), que sofre uma alteração conformacional na molécula produzindo a sua activação. A guanililciclase estimula a conversão da 5'-guanosina-trifosfato (GTP) em 3',5'-guanosina-monofosfato ciclico (GMPc). A acumulação de GMPc intracelular vai dar origem a uma cascata de acontecimentos,

cujo resultado final é a diminuição do cálcio livre intracelular e o consequente relaxamento do músculo liso trabecular (Andersson e col., 1995).

O NO tem, igualmente, a capacidade de abrir os canais de potássio, bem como activar a bomba de sódio / potássio (Gupta e col., 1995) e assim produzir a hiperpolarização da célula muscular lisa que leva ao encerramento dos canais de cálcio e promover o relaxamento celular. (Fig 9)

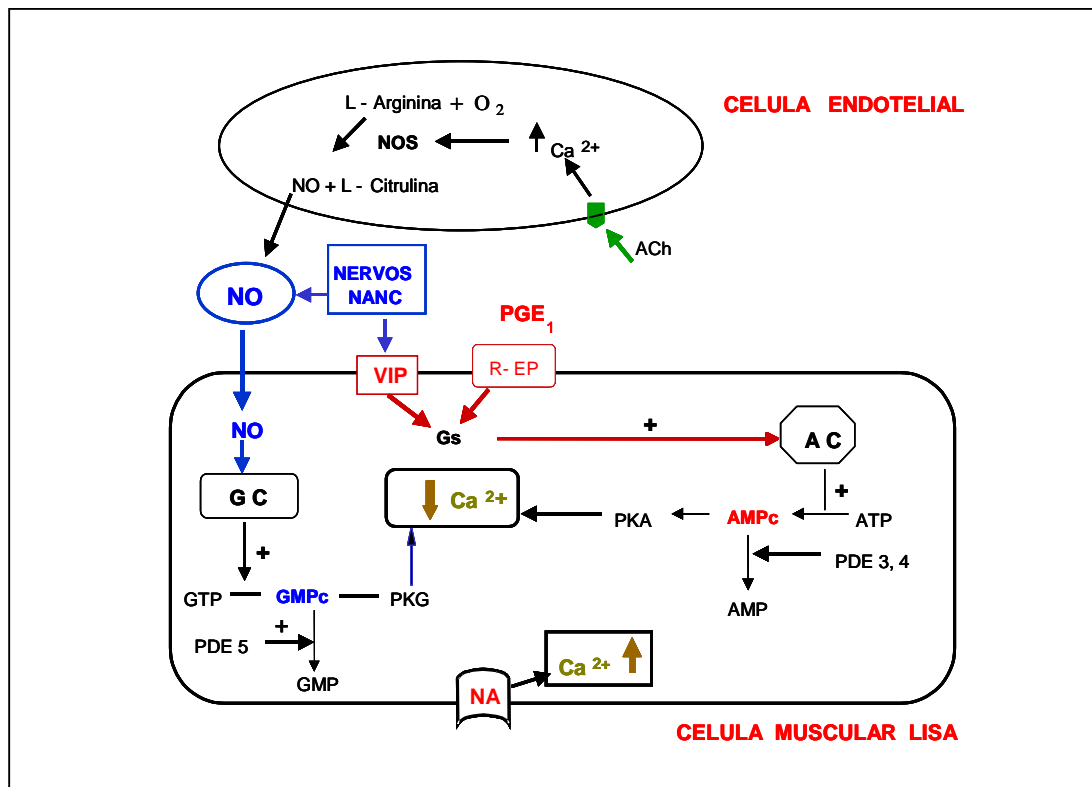


As acções biológicas dos nucleótidos cíclicos (AMPC e GMPC) terminam por efeito de enzimas intracelulares da família das fosfodiesterases (PDEs). Foram identificadas até ao momento, 11 famílias diferentes de PDEs no organismo (Fawcett e col., 2000) com um padrão específico de distribuição nos diferentes órgãos (Beavo et al., 1994). Estas onze famílias de fosfodiesterases identificadas nos tecidos de mamíferos, têm uma distribuição muito variável nos vários tecidos e tipos celulares, o que lhes confere um papel importante na modulação de diversos processos fisiológicos. Estudos em tecidos isolados in vitro têm demonstrado que a inibição da PDE₂, PDE₃, PDE₄ e PDE₅ facilita o relaxamento do músculo liso do pênis. Estudos anteriores demonstraram a presença da PDE₅ nas plaquetas, no tecido muscular liso vascular, brônquico e visceral, e também ser a PDE predominante no corpo cavernoso humano. A sua inibição in vivo leva a acumulação de GMPC o que tem permitido restaurar a erecção em homens com disfunção erétil.

A PDE₁₁ foi identificada, recentemente, no músculo liso do corpo cavernoso, leito vascular do pênis, próstata, hipófise e coração. O seu papel funcional ainda não é completamente conhecido pelo que tem sido objecto de investigação. Tem-se descrito

a existência e a actividade de diferentes isoenzimas de PDE no corpo cavernoso humano (PDE₂, PDE₃, PDE₄ e PDE₅) (Boolell e col., 1996; Taher e col., 1994), ainda que se tenha detectado a presença do ARNm para PDE1, PDE7, PDE8 e PDE9 (Kütthe e col., 2001). Quatro destas isoenzimas, PDE1, PDE2, PDE5 e PDE9 são capazes de hidrolizar GMPc, mas a PDE5 tem alta selectividade para este nucleótido (Beavo e col., 1995), pelo que tem sido objecto de grande investigação experimental e clínica. Os fármacos que inibem esta enzima têm possibilidade de potenciar a fisiologia normal da erecção por aumentarem os níveis intracelulares de GMPc disponível para o relaxamento do corpo cavernoso (Naylor, 1998).

O óxido nítrico também é um importante neurotransmissor sistémico que, entre outros efeitos, medeia o relaxamento do músculo liso vascular. Assim, pode ocorrer uma acção sinérgica entre os inibidores da PDE5 e os nitratos orgânicos acentuando o efeito hipotensor destes. Este sinergismo clínico está de acordo com a acção destes fármacos, em passos diferentes na via do NO / GMPc, pois os nitratos aumentam a formação de GMPc por activação da guanilciclase enquanto os inibidores da PDE5 diminuem a hidrólise do GMPc. Assim, a administração concomitante de inibidores de PDE5 aos doentes submetidos a tratamento regular, ou intermitente, com nitratos orgânicos deve ser contra-indicado.



2.1.4 – SUBSTÂNCIAS - DADORAS DE ÓXIDO NITRICO

Alguns fármacos contêm NO na sua estrutura com capacidade para o libertar, como por exemplo, os nitratos, o nitroprussiato ou a nitroglicerina, os quais têm sido amplamente utilizados na clínica (Feelisch, 1991). Estes nitrovasodilatadores causam vasodilatação pela via do NO / GMPc, verificando-se uma correlação entre os níveis de GMPc e a capacidade relaxante dos vasos sanguíneos. Estes fármacos, se administrados por via sistémica, além da capacidade vasodilatadora (Collier e col., 1978) têm graves efeitos secundários, como a hipotensão postural profunda e cefaleias violentas. Foi, igualmente, demonstrado que o NO e essas substâncias dadoras de NO são vasodilatadores potentes das artérias de resistência do pénis (Simonsen e col., 1995) e do músculo liso trabecular (Rajfer e col., 1992). Existem diferentes famílias de compostos dadores de NO, que diferem tanto na sua natureza química como na forma de libertar o NO da sua estrutura, assim por exemplo, a linsidomine (SIN-1) liberta o óxido nítrico numa forma espontânea (Feelisch, 1991), mas tem uma potência vasodilatadora reduzida (Berkenboom e col., 1989) porque, ao mesmo tempo que liberta NO também dá origem ao anião superóxido (O_2^-), como se constata ao adicionar a superóxido dismutase (SOD) ao meio, a qual retira o anião superóxido e aumenta a potência relaxante do SIN-1 (Feelish e col., 1989).

2.1.4.1 – O S-Nitrosoglutatão

Um grupo destes compostos dadores de óxido nítrico, são os chamados S-nitrosotiois, que resultam da reacção dum nitrito orgânico (-NO) com um grupo tiol (-SH) para dar lugar à formação de um nitrosotiol (-SNO). A comparação do potencial relaxante de alguns S-nitrosotiois, com outros nitrovasodilatadores, permite constatar que a entrada na célula da molécula intacta de S-nitrosotiol (Ignarro e col., 1985) ou a libertação espontânea de NO não são os factores mais importantes para a capacidade relaxante. Tem sido sugerido que o NO após ser libertado sofre um processo catalítico para facilitar a rápida difusão no próprio músculo liso vascular (Ignarro e col., 1991). Embora o mecanismo exacto de libertação do óxido nítrico a partir dos S-nitrosotiois não esteja ainda bem definido, no entanto, ela é necessária para poder exercer a sua actividade biológica e farmacológica (Feelisch, 1991). Os nitrosotiois ocorrem de forma endógena e existem em condições fisiológicas em vários tecidos do organismo (Ignarro e col., 1981).

O S-Nitrosoglutatião (SNO-Glu) pertence a este grupo de compostos (Fig. 11). O glutatião é um composto intracelular solúvel que contém um grupo sulfidril (-SH) e intervém em muitas reacções celulares. O glutatião interaccua em condições fisiológicas com o óxido nítrico para dar origem a um composto estável, o S-Nitrosoglutatião (SNO-Glu). Este Nitrosoglutatião pode aumentar a semi-vida ou funcionar como transportador-endógeno de NO para exercer as suas acções no organismo. Tem sido demonstrada a sua capacidade para relaxar o músculo liso vascular (MacAllister e col., 1995), assim como o músculo liso trabecular (Gupta e col., 1995). O glutatião vascular encontra-se em quantidades diminuídas na diabetes mellitus e na aterosclerose pelo que a anulação dos efeitos nocivos dos radicais livres que ele realiza, nas permutas intra / extracelulares, também está diminuída o que vai aumentar a incidência de complicações patológicas cardio-vasculares.

2.1.5 – OUTROS MECANISMOS

A – Hiperpolarização celular

A hiperpolarização da célula muscular lisa constitui um dos mecanismos possíveis de relaxamento pois, a abertura dos canais de potássio induzida pela proteinaquinase A (PKA)-dependente do AMPc (Mulhall e col., 1999), pela proteinaquinase G (PKG) - dependente do GMPc (Mulhall e col., 1999) ou mesmo pelo próprio GMPc (Christ e col., 1995) negativa o potencial de membrana, o que provoca o encerramento dos canais de cálcio e, como consequência, o relaxamento do músculo liso.

Independente deste mecanismo, provocado pela acção dos nucleótídeos cíclicos, tem sido proposto que o NO a nível da célula muscular lisa do corpo cavernoso estimula directamente a abertura dos canais de potássio, assim como activa a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (Gupta e col. 1995). Esta bomba de sódio, extrai 3 cargas positivas do interior da célula e introduz apenas 2, o que hiperpolariza a célula e leva também ao encerramento dos canais de cálcio.

No tecido trabecular do corpo cavernoso do pénis humano existe uma enorme quantidade de terminações nervosas do tipo não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) com imunoreactividade para a nNOS (Juenemann e col., 1987) que contêm, igualmente, o Polipéptido Intestinal Vasoactivo (VIP) (Dail e col., 1993). O verdadeiro significado fisiológico da localização conjunta ainda não está clarificado (Taher e col. 1997). Este peptideo foi originalmente extraído do pulmão do porco, mais tarde também do duodeno, e encontra-se difusamente distribuído no sistema nervoso central, sistema nervoso periférico e no vascular. Tem uma acção vasodilatadora a nível pulmonar, coronário, **intestinal**, renal e vasos cerebrais. Sabe-se que os receptores-VIP (tipo 1 e 2) **que** medeiam a sua acção, encontram-se acoplados a proteínas-Gs, as quais estimulam a adenililciclase (AC) e aumentam a concentração intracelular de AMPc no músculo liso trabecular do pénis. Pensa-se que o relaxamento do corpo cavernoso mediado pelo VIP possa depender de prostanóides e também envolver a produção de NO (Kim e col., 1993), o que pode vir a permitir a combinação de compostos dadores de óxido nítrico e VIP no tratamento da disfunção eréctil (Juenemann e col., 2002). O verdadeiro papel do VIP na fisiologia da erecção tem sido um aspecto muito debatido mas, até ao momento, ainda não está clarificado.

No músculo liso trabecular a activação dos canais de potássio (tipo maxi- K^+) mediada pelo AMPc (Fan, 1995) bem como a hiperpolarização celular podem ser induzidas por acção da PGE_1 .

As células do endotélio vascular sintetizam e libertam mediadores vasoactivos em resposta a estímulos físicos (ex. batimentos cardíacos, estiramentos provocados pelos fluidos) ou a substâncias neuro-humorais (ex. acetilcolina, bradikinina). O óxido nítrico e a prostaciclina são os factores relaxantes derivados do endotélio melhor caracterizados (Taylor e col., 1988; Chen e col., 1988). Em estudos recentes foi identificada uma via relaxante associada a hiperpolarização **do endotélio vascular** com maior relevo nas artérias de pequeno calibre, como as artérias coronárias, as renais e as de resistência do pénis (Shimokawa e col., 1996). Um dos mecanismos indutores do sinal de hiperpolarização do tecido muscular liso vascular dependente do endotélio parece ser a bradikinina libertada do endotélio pelo estímulo físico dos batimentos cardíaco. Ela pertence ao grupo das kininas, e este grupo de peptídeos derivados dos kininogénios, tem uma actividade vasodilatadora potente a nível cardíaco, intestinal, rim e músculo esquelético. Os efeitos biológicos da bradikinina são mediados por receptores na membrana celular, da família das proteínas Gs, sendo o tipo B₂ os que parecem apresentar maior afinidade.

Este efeito vasodilatador ocorre na presença de inibidores da ciclooxigenase (indometacina) e pode ser mediada pela libertação dum factor relaxante dependente-endotélio (óxido nítrico / factor hiperpolarizante). Os estudos sugerem que a activação de receptores nas células endoteliais, por aqueles estímulos físicos, leva síntese de prostanóides sintetizados pela via do citocromo P450, a activação da adenililciclase com formação de AMPc e da abertura dos canais de K⁺-dependentes de cálcio da célula endotelial. A hiperpolarização endotelial difunde-se pelas comunicações endo-endoteliais (Edwards e col., 1999) e para as células musculares lisas adjacentes ao endotélio, através das comunicações mio-endoteliais, o que pode vir a explicar a velocidade de propagação dos estímulos relaxantes da erecção do pénis (R. Busse e col., 2002).

Esta via adicional de relaxamento do músculo liso vascular tem sido atribuída a um factor, que ainda não está bem caracterizado, denominado Factor Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (FHDE) (Félétou e col., 1999).

No sistema venoso as kininas têm um efeito contráctil, que pode resultar da estimulação directa do músculo liso venoso ou da libertação de prostaglandinas constritoras, como a PGF2 α (B. Katzung, 2001).

B – Modulação Purinérgica

Existe o consenso que os nucleótidos purinérgicos, a adenosina trifosfato (ATP) libertada nas terminações nervosas não adrenérgicas não colinérgicas (NANC) e os produtos do seu metabolismo (ADP; AMP) estão envolvidos em vários processos neurotransmissores e neuromoduladores. Os receptores purinérgicos mediadores das respostas de ATP, adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) encontram-se distribuídos por todos os tecidos musculares lisos, células imunológicas, plaquetas e células endoteliais vasculares (Sandra Fillipi e col., 1999).

Os nucleótidos purinérgicos têm uma potente actividade vascular a qual pode ser constritora por actividade dos receptores do subtipo P_{2x} ou vasodilatadora através dos receptores do subtipo P_{2y} (M. Shaley e col., 1999).

Os receptores do subtipo P_{2x} estão presentes nas células musculares lisas do corpo cavernoso e a sua activação induz a contracção. Entre os receptores do subtipo P_{2y} , uns estão localizados nas células endoteliais vasculares e induzem relaxamento por um mecanismo dependente do endotélio (Olsson e col., 1990), pois após a estimulação pela Ach, ou por um agonista P_{2y} -purinérgico, verifica-se relaxamento do músculo liso vascular pela produção de factores-endoteliais relaxantes, e entre eles o óxido nítrico parece ter um papel fundamental.

Outros estudos sugerem que os receptores P_{2y} também se podem localizar no tecido muscular liso trabecular, mas neste tecido não parece serem capazes de induzir relaxamento por um mecanismo dependente do endotélio. Ainda não é bem conhecido o subtipo de receptor purinérgico para o ATP no músculo liso cavernoso e envolvido no relaxamento (Sandra Fillipi e col., 1999).

A Adenosina (ADP) é gerada pela hidrólise do ATP por acção extracelular de transportadores de nucleosídeos bi-direccionais. O ADP parece activar preferencialmente entre os receptores P_1 dos terminais nervosos, os do subtipo A_{2A} (Correia Sá e col., 1994). Estes estudos foram realizados em animais de laboratório, o que significa que no homem os mecanismos envolvidos podem ser diferentes. Assim podemos salientar a importância de se realizarem experiências farmacológicas em tecido cavernoso humano para se retirarem melhores conclusões e se desenvolverem novos conhecimentos na fisiologia da disfunção eréctil.

C – Papel das comunicações inter-celulares

Temos descrito factores que interactuam na modulação da fisiologia da erecção mas, apesar disso, algumas questões ainda não estão clarificadas como, por exemplo, o mecanismo responsável pela rapidez da resposta, quase imediata, induzida pelos mecanismos da erecção ou após a injeção intracavernosa de PGE₁.

É interessante a forma de distribuição terminal das fibras nervosas autonómicas no tecido muscular liso. Neste, as fibras nervosas são escassas, dispersas, não formam uma rede intrincada e complexa como seria previsível. Esta disposição anatómica da inervação autonómica, associada à escassez das fibras nervosas, faz-nos pensar na existência dum mecanismo responsável pela contracção síncrona do tecido muscular bem como pela rapidez da resposta relaxante. As comunicações intercelulares do tecido muscular liso podem, muito provavelmente, estar implicadas neste mecanismo de transmissão. Formam

um conjunto de canais intercelulares, constituídos por proteínas conhecidas por conexinas (Campos e col., 1993), capazes de assegurar a continuidade do citoplasma entre as células adjacentes (Christ e col., 1993). Esta disposição entre células adjacentes facilitaria a passagem de iões e segundos mensageiros envolvidos no mecanismo de relaxamento (Christ e col., 1992). No entanto, estas funções no mecanismo fisiológico da erecção ainda não estão completamente conhecidas e merecem um estudo mais profundo.

3 – ANTAGONISMO FUNCIONAL DA ERECÇÃO

3.1 – PAPEL DOS PROSTANÓIDES

3.2 – RECEPTORES PROSTANÓIDES RELAXANTES

3.3 – RECEPTORES PROSTANÓIDES CONTRÁCTEIS

3 – ANTAGONISMO FUNCIONAL DA ERECÇÃO

3.1 – PAPEL DOS PROSTANÓIDES

O termo “prostanóide” engloba uma família de substâncias sintetizadas a partir de percursores de ácidos gordos constituintes da membrana celular: o ácido linoleico, o ácido timolónico e o ácido araquidónico, sendo este último o mais importante (von Dorp e col., 1964). O ácido araquidónico (AA) faz parte dos fosfolípidos da membrana e é libertado por acção da enzima fosfolipase A₂ e fosfolipase C. Na síntese dos prostanóides, o ácido araquidónico sofre num primeiro passo a catalização da enzima ciclooxigenase e, posteriormente, um conjunto de reacções em cascata por enzimas específicas para a síntese de cada família-prostanóide. Os prostanóides existem em condições fisiológicas em vários tecidos do organismo, com o papel de moduladores ou mediadores dum considerável número de processos, sendo os seus efeitos mediados por receptores específicos na membrana celular (Coleman e col., 1994).

A actividade das prostaglandinas (PGs) foi observada pela primeira vez por Kurzrok e Lieb, em 1930, no fluido seminal humano. Esta observação foi confirmada e desenvolvida por von Euler (1935). Porém, foram necessários vinte anos para Bergström e Sjövall (1957) conseguirem purificar as primeiras PGs, a PGE₁ e a PGF_{2α}. Na década seguinte, as PGs incluíam outros membros como a PGD₂. O interesse por este grupo de substâncias foi crescendo e culminou com a descoberta de dois novos compostos - o TxA₂ (Hamberg e col., 1975) e a PGI₂ (Moncada e col., 1976).

Na década de 70, ficou clarificado que as prostaglandinas têm capacidade de desencadear uma diversidade de acções, com uma grande instabilidade química, embora não fosse conhecido o mecanismo, nem os locais de actuação na membrana celular (os receptores-prostanóides). Foi desenvolvido um esforço para identificar e classificar estes receptores-prostanóides (R-P) com o objectivo de obter PGs estáveis e com efeitos mais específicos (Kuechl e col., 1973; Powell e col., 1974). Os estudos funcionais iniciados por Ahlquist (1948), com a intenção de estudar os receptores de membrana responsáveis pelos efeitos da noradrenalina e a adrenalina, acabaram por serem fundamentais na clarificação dos diferentes receptores-prostanóides. Nessa altura, foi possível classificar os receptores adrenérgicos nos subtipos α e β , e que ainda se mantêm actuais. O seu trabalho foi desenvolvido, e anos mais tarde (Lands e col. 1967) subdividiu o grupo β , em β_1 e β_2 , o que na época foi considerado um facto assinalável.

Esta área de estudo tornou-se atractiva e interessante, pois o mesmo prostanóide desencadeava acções diferentes conforme o órgão-alvo, como também os prostanóides induziam efeitos distintos nas mesmas amostras isoladas de tecido muscular liso (Pickles, 1967). Nos anos seguintes procurou-se definir padrões consistentes de actividades dos agonistas-prostanóides (Anderssen e col., 1980; Gardiner e Collier, 1980). Foi descrita a primeira classificação de receptores-prostanóides fundamentada nos estudos funcionais com agonistas e antagonistas (Kennedy e col., 1982; Coleman e col., 1983). Nesta sua classificação, Coleman (1983) descreveu a existência de cinco tipos - DP, EP, FP, IP; TP - cada um deles específico para cada prostaglandina natural - PGD₂; PGE₂; PGF₂α; PGI₂; TxA₂. A família dos R-EP foi subdividida, mais tarde, em EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (Coleman e col., 1987).

Os estudos posteriores evidenciaram a presença de receptores-prostanóides funcionais em vários tecidos do organismo como o fígado, o músculo liso, os adipócitos, o corpo lúteo, as plaquetas e o cérebro. No final da década de 60 (Butcher e col., 1968) demonstraram que as prostaglandinas da série E no músculo liso eram capazes de estimular a adenililciclase e aumentar o AMPc (Kuehl e col., 1972). No entanto, a compreensão deste efeito era complexo pois a PGE₁ nas plaquetas induzia aumento de AMPc enquanto a PGE₂ induzia a diminuição (Shio e Ramwell, 1972) e justificava os efeitos opostos verificados na agregação plaquetária. Assim, a PGE₁ favorece a inibição enquanto a PGE₂ potencia a agregação plaquetária (Shio e Ramwell, 1971), o que evidencia o paralelismo entre o AMPc e o efeito funcional da prostaglandina.

3.2 – RECEPTORES PROSTANÓIDES RELAXANTES

A - RECEPTORES EP

Os receptores EP (R-EP) medeiam um conjunto de actividades biológicas que, além da contracção e do relaxamento do músculo liso, aumentam a libertação de neurotransmissores, inibem a lipólise, a secreção ácida do estômago e os mediadores da inflamação (Coleman e col., 1994). Estas múltiplas acções biológicas apontam, claramente, para a presença de vários subtipos de R-EP.

a - Subtipo EP₁

Os receptores EP₁ foram os primeiros a serem identificados. Apresentam uma distribuição global no organismo, pois podem encontrar-se na traqueia, no aparelho gastro-intestinal, no miométrio, no útero e na bexiga dos roedores (Senior e col., 1991). A acção mediada pelos receptores EP₁, acoplados a proteínas Gi, capazes de diminuir a concentração intracelular de AMPc (Watabe e col., 1993). O sulprostone foi o primeiro agonista EP₁ a ser identificado, mas também apresenta grande afinidade sobre os receptores EP₃ (Bunce e col., 1990). Não se descreveu, até ao momento, nenhum agonista-selectivo dos receptores EP₁, sendo que o iloprost apresenta maior potencia nos R-EP₁, que nos EP₂ e EP₃, mas também é um agonista dos R-IP.

Em relação à actividade dos antagonistas-selectivos dos EP₁, o SC-19220, (Sanner, 1969) tem uma actividade anestésica local (Poll e col., 1989) e o AH6809 apresenta, igualmente, uma actividade antagonista nos R-DP (Coleman e col., 1985).

b - Subtipo EP₂

Apresentam uma distribuição disseminada no músculo liso, onde produzem sempre o relaxamento, nas células epiteliais gástricas, nas células inflamatórias e nos nervos sensitivos aferentes (Coleman e col., 1987). Identificaram-se alguns agonistas para os receptores EP₂ mas têm, simultaneamente, actividade para os receptores EP₃, o que tem dificultado o seu estudo. O butaprost tem uma actividade agonista-selectiva, embora reduzida, nos R-EP₂ (Gardiner, 1986), com uma actividade 100 vezes menor que a PGE₂. Foram identificados outros agonistas como o AY23626 (Coleman e col., 1987) e o misoprostol, mas também têm actividade para os R-EP₃ (Coleman e col., 1994) o que limita muito a sua utilidade. No músculo liso induzem o relaxamento após estimulação de proteínas Gs que activam a adenililciclase e aumentam as concentrações do AMPc (Honda e col., 1993).

Não se conhece, até ao momento, um antagonista-selectivo destes receptores.

c - Subtipo EP₃

Os receptores EP₃ parecem ser os mais difíceis de caracterizar, pois apresentam uma distribuição em vários órgãos como o aparelho gastrointestinal (inibem a secreção ácida) (Reeves e col., 1988), útero, veias, nervos autonómicos (inibem a libertação do neurotransmissor), no SNC (hipotálamo, área pré-optica medial, locus coeruleus) (Sugimoto, 1994), em adipócitos (medeiam a inibição da lipólise) (Strong e col., 1992), na zona medular renal (inibem a reabsorção de água) (Sonnenburg e col., 1988) e nas plaquetas. Nestas, apresentam uma actividade pró-agregante plaquetária (Jones e Wilson, 1990) e embora não induzam a agregação por efeito directo são capazes de potenciar outros agentes agregantes. Os receptores EP₃ estão envolvidos na inibição da secreção gástrica induzida pela histamina (Reeves e col., 1988), pelo que têm sido desenvolvidos estudos para a sua utilização na clínica como anti-ulceroso gástrico. Encontram-se acoplados a proteínas Gi que inibem as concentrações intracelulares de AMPc (Sonnenburg e col., 1990).

O agonista dos receptores EP₁, sulprostone, evidência também uma fraca actividade nos R-EP₃ (Bunce e col., 1990). Existem vários agonistas potentes dos R-EP₃, pois foram inicialmente desenvolvidos com objectivos anti-ulceroso gástrico (Collins, 1986), no entanto, estes agonistas também apresentam actividade para outros receptores prostanóides, sendo o euprostil e o GR63799 os que apresentem maior selectividade para os R-EP₃ (Reeves e col., 1988; Bunce e col., 1990).

Ainda não se conhece nenhum composto com actividade antagonista dos R-EP₃.

d - Subtipo EP₄

Este subtipo EP₄, foi o mais recente dos receptores EP a ser identificado na veia safena de coelho (Lydford e col., 1996). Sabia-se que o relaxamento do músculo liso da veia safena era mediado por um R-EP mas por nenhum dos conhecidos até esse momento (EP₁, EP₂, EP₃) (Coleman e col., 1994). Os R-EP₄ encontram-se distribuídos também na veia jugular do coelho, traqueia do rato e no útero do hamster (Lawrence e col., 1992; Lydford e col., 1993).

Os R-EP₄ aparecem acoplados a proteínas Gs, com estimulação da adenilciclase, o que leva a aumento das concentrações intracelulares de AMPc (Kennedy e col., 1982). Outra característica dos receptores EP₄, em relação aos restantes, é o facto de poderem ser bloqueados por antagonistas dos R-TP (Coleman e col., 1994).

B - RECEPTORES IP

A PGI₂ é sintetizada pelo endotélio vascular e desempenha um importante papel no tónus vascular local e como anti-agregante das plaquetas (Moncada, 1982). Não surpreende, portanto, que os receptores IP tenham uma localização predominante nas plaquetas e no músculo liso vascular arterial (Oliva e col., 1987). Os R-IP podem-se encontrar noutros tecidos, particularmente, nas terminações dos nervos sensitivos e, por este facto, podem estar envolvidos em síndromes dolorosas (Birrell e col., 1993).

A PGI₂ tem sido utilizada na clínica como inibidor da agregação plaquetária e vasodilatador no tratamento de doenças vasculares oclusivas. A maior dificuldade no estudo da PGI₂ é a sua instabilidade química, com uma duração de acção muito curta, o que tem dificultado diferenciar os receptores IP vasculares e os das plaquetas. Esta dificuldade tem conduzido à procura de análogos-selectivos mais estáveis, tendo sido o iloprost, o primeiro a ser identificado (Schrör e col., 1981), que in vivo tem uma duração de acção longa (Skuballa e col., 1985). Recentemente, foi descoberto o cicaprost (Sturzebecher e col., 1985), outro agonista dos R-IP, mais selectivo e potente que o iloprost.

Os R-IP aparecem acoplados a proteínas Gs que activam a adenililciclase (Siegl e col., 1997; Hashimoto e col., 1990). A formação de AMPc parece ser o único sinal de transdução para os R-IP, no entanto, têm surgido referências sobre a PGI₂ e os análogos que sugerem a possibilidade dos R-IP poderem ser mediados por outra via que induz relaxamento, a do Factor Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (FHDE),

3.3 - RECEPTORES PROSTANÓIDES CONTRÁCTEIS

A – RECEPTORES TP

Os Receptores do tromboxano A_2 (R-TP) distribuem-se, difusamente, no músculo liso trabecular (Hedlund e col., 1989), no leito vascular (arterial e venoso), nas plaquetas, nos miofibroblastos, nas células mesangiais do rim e no epitélio do tracto gastrointestinal (Coleman e col., 1994). Têm um papel muito importante na actividade vasoconstritora e na agregação plaquetária (Coleman e col., 1989; Malmsten e col., 1976). Existe uma ampla variedade de agonistas selectivos dos R-TP, sendo o mais difusamente usado o U46619 (Nakano e col., 1988) por ter maior selectividade e um perfil farmacológico semelhante ao TXA_2 (Coleman e col., 1989). Este agonista, U46619, provoca a contracção do músculo liso vascular (Yamagishi e col., 1992) e, quando se adiciona a células em cultura de músculo liso verifica-se aumento de IP_3 . Faz pensar que a contracção do músculo liso em resposta aos agonistas do TxA_2 , envolve a interacção duma proteína G (Gq), acoplada à fosfolipase C (PLC) com a libertação de IP_3 e o Diacilglicerol (DAG) com aumento da concentração do cálcio intracelular. É interessante referir que o tecido muscular liso vascular também contém receptores TP (Uski e col., 1995; Hedlund e col., 1985).

O SQ29548 (Hedberg e col. 1988) é um antagonista selectivo dos R-TP muito utilizado nas experiências de laboratório.

B - RECEPTORES FP

A $PGF_{2\alpha}$ é o agonista natural dos receptores FP (R-FP), embora não seja selectiva, pois pode ter alguma actividade nos R-EP e R-TP. O fluprostenol, um análogo da $PGF_{2\alpha}$, tem uma potencia e selectividade elevadas para os R-FP (Duckes e col., 1974; Coleman, 1987). Em relação às suas funções biológicas, os receptores FP existem numa enorme variedade de tecidos, particularmente no corpo lúteo, onde parecem desempenhar um papel fundamental no ciclo reprodutor da mulher (Dennefros e col., 1983). Em alguns roedores, e também no homem, os R-FP têm actividade na contractilidade do miométrio (Whalley e col., 1980; Senior e col., 1992). No cão existem R-FP no músculo liso das vias aéreas com uma forte actividade contráctil (Coleman e col., 1985). O tecido onde o seu estudo tem sido muito positivo, é no músculo esfíncteriano da iris, onde os R-FP medeiam a contracção (Coleman e col., 1987). Neste, têm provado serem eficazes na diminuição da pressão intra-ocular

e, por esta razão, utilizados na clínica no tratamento do glaucoma (Woodward e col., 1989).

Os R-FP actuam na proteína Gq, que activa a fosfolipase C, liberta DAG e o IP₃ que medeiam a mobilização do cálcio do retículo sarcoplasmático e, deste modo, aumentam a sua concentração no citoplasma produzindo a contracção celular (Behrman e col., 1985).

C - RECEPTORES DP

O estudo dos receptores DP tem sido difícil por existirem sempre em associação com outro tipo de receptor prostanóide. Encontram-se distribuídos nas plaquetas, no músculo liso vascular, no útero, no aparelho gastro-intestinal e no sistema nervoso central (Coleman e col., 1993). Entre as respostas mediadas pelos receptores DP, encontra-se a inibição da agregação plaquetária (MacIntyre e col., 1987) e a libertação de neurotransmissores do sistema nervoso autónomo.

Tem sido identificada uma actividade excitante em alguns nervos sensitivos aferentes e assim poderem induzir hiperalgesia (Ferreira e col., 1983; Horiguchi e col., 1986).

A descoberta do agonista selectivo dos R-DP, BW245C (Caldwell e col., 1979) e do antagonista, N-0164 (MacIntyre e col., 1977) permitiu identificar a actividade dos receptores DP na membrana celular, os quais se encontram ligados a proteínas Gs capazes de estimular a adenililciclase e a formação de AMPc (Kuehl e col., 1973).

OBJECTIVOS

4 – OBJECTIVOS

4.1 - RELEVÂNCIA CLÍNICA DA PGE₁ NA DISFUNÇÃO ERÉCTIL

A injeção intracavernosa de Prostaglandina E₁ (PGE₁) foi utilizada, pela primeira vez, no diagnóstico e tratamento da disfunção erétil em 1982 (Virag e col., 1984). Após a injeção no corpo cavernoso, a PGE₁ é metabolizada, na sua primeira passagem pelos pulmões, entre 80 a 90% da quantidade administrada. A PGE₁ limita a incorporação de lipoproteínas de baixa densidade nas paredes vasculares (por este mecanismo diminui os fenómenos de aterosclerose) e reduz também os efeitos do TGFβ₁ - factor transformante do crescimento β₁, (Moreland e col., 1994) durante o estado de hipoxia celular e / ou na fase de flacidez (Saenz de Tejada e col., 1993). Esta inibição dos TGFβ₁ é muito importante para o relaxamento do músculo liso trabecular que associada à acção inibidora na adesão dos leucócitos (Kubs, 1992) e da agregação plaquetária parece proteger o pénis da trombose durante a erecção prolongada (Smith, 1989) e explicar a quase ausência de fibrose dos corpos cavernosos nos doentes integrados no esquema de auto-injeção de PGE₁, se a comparar com o grupo da papaverina.

Os índices de resposta clínica à injeção intracavernosa de PGE₁ variam entre 60 e 70% nos doentes com disfunção erétil (Buvat e col. 1996, 1998; Linet e Ogring 1996; Porst 1996). Esta análise global, fundamentada na extensa experiência clínica em todo o mundo, permite reconhecer na injeção intracavernosa de PGE₁, uma opção terapêutica eficaz para a disfunção erétil. No entanto, apesar do índice elevado de respostas clínicas eficientes verificamos, por razões ainda não esclarecidas, que um número considerável de doentes não responde a esta terapêutica e apresentam uma grande variabilidade na dose a administrar. Esta pode variar entre 0,5 a 20 µg (Linet e Ogring, 1996) e nalguns casos houve necessidade de aumentar a dose para 40 µg (Porst, 1996). Este autor apresentou, em 1996, a experiência clínica por todo o mundo com a utilização de fármacos vasoactivos administrados por via intracavernosa no tratamento da disfunção erétil. A PGE₁, comparada com a papaverina isolada ou a papaverina em associação com a fentolamina, apresenta uma eficácia clínica superior e um risco mínimo de priapismo (0,36%).

Na análise comparativa com outros fármacos constata-se que a dor no local da injeção (ou apenas uma sensação desconfortável) foi a maior queixa dos doentes tratados com a PGE₁. No entanto, a presença de nódulos ou fibrose dos corpos cavernosos foi muito menor. A taxa de abandono do método ainda é elevada, tendo presente a relação eficácia elevada / reduzida morbilidade (Porst e col., 1998). As

razões mencionadas para o seu abandono foram várias, como seja o aparecimento de erecções espontâneas, problemas com a companheira, a insatisfação com o método e, nalguns casos, a falta de eficácia como acontece entre 30 e 40% dos doentes (Arrondo, 1997).

4.2 – OBJECTIVOS DO TRABALHO:

- 1 – Caracterizar os receptores prostanóides que medeiam a contracção e o relaxamento do músculo liso trabecular do corpo cavernoso humano.

- 2 – Analizar as respostas do músculo liso trabecular humano à exposição in vitro da PGE₁, de forma individualizada, e a sua relação com as respectivas respostas clínicas da PGE₁ intracavernosa nos mesmos doentes.

- 3 – Avaliar os efeitos da combinação de PGE₁ com o SNO-Glu no relaxamento do músculo liso trabecular do pénis

METODOLOGIA

4.3 – METODOLOGIA

Tecidos de corpo cavernoso humano

As amostras de tecido cavernoso humano foram obtidas em homens com disfunção erétil, estudados em vários centros, no momento da colocação duma prótese peniana. Todos os protocolos das experiências foram aprovados pela Comissão de Ética.

Os tecidos recolhidos foram mantidos entre 4 - 6°C, numa solução M-400 (composta em 100 ml: manitol - 4,19 g; KH_2PO_4 - 0,205 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,97 g; KCl - 0,112 g; NaHCO_3 - 0,084 g; a pH 7,4) e, utilizados entre 2 e 16 horas após a extracção (Simonsen e col., 1997).

Câmara de estudo de órgãos

Recolhemos de cada amostra várias tiras de tecido cavernoso com a forma cilíndrica de 6 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro. Utilizando fios de seda 3 / 0, atamos um nó em cada extremo da tira do tecido cavernoso. Em seguida, fixamos o extremo superior ao transdutor de força e o extremo inferior à lâmina do copo de vidro ficando, deste modo, as tiras de corpo cavernoso mergulhadas totalmente na câmara de órgãos. Preenche - se cada câmara com 8 ml de líquido de Krebs - Henseleit (KHS), mantida a 37 °C de temperatura, oxigenada com 95% CO_2 / 5% O_2 , e o pH 7,4. A solução KHS tem a seguinte composição, expressa em mM:

NaCl - 115; KCl - 4,6; CaCl_2 - 2,5; KH_2PO_4 - 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; NaHCO_3 - 25; EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; Glicose 11,1

As câmaras encontram-se rodeadas por um circuito fechado de água destilada, que se aquece num banho termo-regulador ajustado para manter a temperatura do KHS no interior das câmaras a 37° C. O transdutor de força está ligado a um sistema informático MacLab de registo digital dos dados (AD Instruments, Castle Hill, Austrália).

Esquema da tina de órgãos

Após a montagem deste sistema começamos a estirar o tecido cavernoso a partir duma força inicial de 1,5 a 2 gramas. Assim vai permanecer, sem qualquer manipulação, durante 60 minutos (de forma que o tecido cavernoso estabilize o tonus basal). Durante este período de tempo procedemos a lavagens periódicas da câmara de órgãos com o líquido de KHS, a fim de serem retirados alguns restos de sangue, os quais vão-se desprendendo, lentamente, do tecido cavernoso. Após este período de estabilização os tecidos são expostos a fenilefrina numa concentração de $1\mu\text{M}$. Esperamos que surja uma curva em planalto, para registar a amplitude da contracção, e lavamos de imediato mais duas vezes com líquido de KHS. Aguardamos 15 minutos para que o tecido cavernoso estabilize por completo. Provocamos novo estiramento, para 0,5 a 1 grama superior, e voltamos a aguardar 5 minutos, para que o tecido volte a estabilizar. Voltamos a repetir a dose de $1\mu\text{M}$ de fenilefrina, para nova contracção do tecido cavernoso, esperando que se estabeleça nova curva em planalto, para a registarmos. O tecido deve aumentar contracção de forma progressiva. Repetimos esta manobra até verificarmos que, entre dois estiramentos sucessivos, o aumento é inferior a 10%. Este é o ponto de tensão isométrica óptima do tecido o qual tem o valor médio de 4 a 6 gramas. Cada amostra de tecido foi, desta forma estirada gradualmente, até à tensão isométrica óptima determinada pela resposta contráctil máxima a $1\mu\text{M}$ de fenilefrina (Kim e col., 1991; Azadzo e col., 1992). Suspendemos, neste momento, os estiramentos do tecido cavernoso.

Lavamos novamente o tecido, e adicionamos nitroprussiato de sódio a 0,1 mM, com o objectivo de provocar o relaxamento completo do tecido cavernoso, incluindo o seu tonus espontâneo. O relaxamento deve ser máximo pelo que marcamos, este ponto, como ponto zero. Realizamos, então, lavagens sucessivas (4 a 5 vezes) para retirar todo o nitroprussiato de sódio, e aguardamos 20 minutos. Depois, adicionamos líquido de KHS com 120 mM de potássio (KKHS) para provocar uma contracção teórica máxima do tecido cavernoso. A solução KKHS é igual à solução KHS, mas o NaCl foi substituído por KCl. Aguardamos até obtermos uma curva em planalto, e registamos o grau de contracção. Lavamos, em seguida, várias vezes (4 a 5 no total) durante 30 minutos.

Para estudar as respostas contrácteis sobre as tiras do tecido de corpo cavernoso humano, administramos concentrações crescentes de agonistas contrácteis, sem estimular o seu tonus basal. Nalguns casos, as respostas foram estudadas na presença do antagonista dos receptores do tromboxano A₂, o SQ29548 (0,02 µM), que adicionamos ao banho 20 minutos antes de realizar a curva da dose - resposta. As respostas contrácteis são expressas como a percentagem da contracção obtida após a exposição do tecido a KKHS. Todos os dados são expressos como a média ± do erro de referência (SEM).

As respostas relaxantes, uma vez alcançada a contracção estável induzida pela adição prévia de fenilefrina (1µM), foram avaliadas pela adição progressiva de concentrações crescentes dos compostos nas amostras de tecido cavernoso. Nas experiências com ácido araquidónico (AA) adicionou-se apenas uma concentração (100 µM) e determinou-se o grau de relaxamento em relação ao tempo. As respostas relaxantes são expressas como a percentagem do relaxamento total (perda do tonus) induzido pela adição de 0,1mM de HCl de papaverina na câmara de órgãos no final das experiências. Todos os dados são expressos como a média ± do erro de referência (SEM).

Determinação da quantidade de nucleótidos cíclicos no tecido trabecular humano

Fomos quantificar os nucleótidos cíclicos, AMPc e o GMPc, do tecido muscular liso trabecular após exposição aos diferentes tratamentos. Neste sentido, deixamos as amostras de tecido cavernoso humano estabilizar durante 90 minutos no banho em KHS borbulhado com 95% O₂ e 5% CO₂. Em seguida, cada amostra de tecido foi estirada, progressivamente, para a tensão isométrica óptima determinada pela

resposta contráctil a 1 μM de fenilefrina. Depois de esperar 45 minutos para estabilização, foram contraídas com fenilefrina (1 μM) e tratados com controle ou PGE_1 em concentrações diferentes durante 5 minutos. Foram congeladas imediatamente em nitrogénio líquido e armazenadas a -80°C , sendo retiradas apenas para extracção de nucleótidos cíclicos. Nesta fase, depois de retiradas do congelador, e ainda congeladas, foram pulverizadas. Estes tecidos, assim pulverizados, foram homogenizados em 3 ml de ácido tricloroacético a 6% e, posteriormente, centrifugados durante 20 minutos, entre 0°C e 4°C , a 5.000 r.p.m. num Rotor J A 20, a $\pm 2.000\text{ g}$. Uma vez centrifugados, deixamos o sedimento no fundo do tubo de ensaio, aspiramos o sobrenadante (contém os nucleótidos dissolvidos no ácido tricloroacético). Congelamos o sedimento de imediato a -20°C , para podermos determinar as proteínas. Para extraírmolos o ácido tricloroacético e o separarmos dos nucleótidos, adicionamos ao sobrenadante éter etílico saturado com água. Para isso, adicionamos a cada 500 ml de éter etílico 50 ml de água, deixamos repousar durante 15 minutos e decantamos a água. Adicionamos éter etílico saturado, quatro vezes (12 ml) a quantidade da porção aquosa, e agitamos num misturador eléctrico durante 30 segundos. Esta mistura fica em repouso durante 15 minutos. A camada aquosa fica no fundo do tubo de ensaio por ter maior densidade. Aspiramos a camada superior (camada etérea), e adicionamos novamente éter etílico saturado, numa quantidade quatro vezes a porção aquosa e agitamos durante 30 segundos. Repetimos estas manobras mais três vezes. No final, a porção aquosa que contém os nucleótidos é congelada de imediato, em gelo seco, para serem extraídos mais tarde. Esta mistura, agora solidificada vai ser colocada num liofilizador, a pressão e temperatura negativas, para liofilizar os nucleótidos cíclicos, ou seja, retirar toda a água que sob estas condições passa do estado sólido a gasoso (sublimação). Nestas condições podem ficar armazenadas a -20°C , até que sejam reconstituídos em 500 ml de tampão para determinar a concentração de AMPc y GMPc pelo método Elisa, usando um conjunto da Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI).

Os dados das experiências são expressos em picomoles (pmoles) de AMP ou GMP por mg de proteína tecidular

Determinação das proteínas

Em virtude dos fragmentos de tecido terem tamanhos diferentes, a quantidade de proteínas e de nucleótidos cíclicos neles contidos, seriam proporcionais ao tamanho. Com o objectivo de uniformizar a relação entre a quantidade de nucleótidos cíclicos / efeito farmacológico, procedemos à determinação da quantidade de proteínas, que reflectem melhor o tamanho do tecido, e expressamos os nucleótidos cíclicos em picomoles de AMP ou GMP por mg de proteína tecidual.

As proteínas foram determinadas usando o método Lowry com albumina de soro bovino como referência (Lowry e col., 1951).

Drogas e Materiais

O ácido araquidónico, a fenilefrina, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), o U46619 (9, 11-dideoxy-9 α , 11 α -epoxymethano $PGF_{2\alpha}$) e a indometacina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

O sulprostone, o fluprostenol, a prostaglandina E_2 (PGE_2) e a prostaglandina D_2 (PGD_2) foram adquiridos à Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

O SQ29548 foi adquirido à Research Biochemical International (Natick, MA).

A prostaglandina E_1 - α -ciclodextrina (PGE_1 - α CD) foi fornecida pela Schwarz-Pharma.

O SNO-Glu foi cedido por gentileza pela Nitromed Inc. (Bedford, MA).

O butaprost foi uma oferta do Dr. Gardiner da Bayer PLC.

Os derivados prostanóides foram dissolvidos na concentração 10 mM em etanol e diluidos em água destilada no momento das experiências.

A PGE_1 - α -CD e as drogas não-prostanóides foram dissolvidas em água destilada no momento das experiências.

A indometacina foi dissolvida em 1,5 mM de Na_2CO_3 .

4.4 – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Para a comparação de curvas completas de dose – resposta empregou-se a análise da variância (ANOVA) de dois factores, que permite a comparação estatística a um tempo de todas as concentrações empregadas. Para esta análise empregou-se o programa informático StatView para computadores Apple.

Quando se comparou o resultado pontual de dois grupos (por exemplo, EC₅₀) empregou-se a análise da t Student. Quando houve mais de dois grupos empregou-se um ANOVA dum só factor seguido dum teste Student-Newman-Keuls. Para estas análises utilizou-se o programa informático GraphPad InStat para computadores Apple. Um $p < 0.05$ considera-se estatisticamente significativo.

A determinação de sinergismo para a combinação de PGE₁ e SNO-Glu foi realizada de acordo com o “ método isobole” (Berenbaum, 1989). Este método aplica a equação $d_a / D_a + d_b / D_b = 1$, para definir efeitos aditivos entre dois agentes A e B, onde d_a e d_b são as concentrações dos agentes A e B na combinação necessária para obter um determinado nível do efeito, que no nosso estudo foi o relaxamento; D_a e D_b são as concentrações das drogas, isoladas, e necessárias para obter o mesmo nível de efeito. Aplicando esta equação, a cada doente, determinamos as concentrações teóricas da combinação de PGE₁ e SNO-Glu (sempre na relação molar de 1:100) necessárias para obtermos níveis diferentes, e previamente especificados, de relaxamento do músculo liso trabecular (10%, 20% , 40% , 60% e 70%), quando são assumidos, apenas, os efeitos aditivos entre estes dois agentes.

$$\frac{[\text{PGE}_1] \text{ na combinação}}{[\text{PGE}_1] \text{ isolada}} + \frac{100 \cdot [\text{PGE}_1] \text{ na combinação}}{[\text{SNO-Glu}] \text{ isolado}} = 1$$

[PGE₁] é a concentração teórica de PGE₁ na combinação, necessária para obter um nível específico de relaxamento, quando apenas estão presentes efeitos aditivos. Neste estudo a [SNO-Glu] é 100 vezes mais elevada que a [PGE₁].

Com estes dados, construímos uma curva teórica, a qual foi comparada com a curva obtida nas experiências usando a combinação de PGE₁ com SNO-Glu.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

Avaliação do antagonismo funcional entre os prostanóides contrácteis e os relaxantes

Com o objectivo de avaliar a presença dum antagonismo funcional entre os prostanóides, contrácteis e relaxantes, adicionamos 100 μM de ácido araquidónico (AA) a amostras de tecido cavernoso humano, prèviamente, contraídas com fenilefrina e verificamos que provocava relaxamentos modestos.

Quando adicionamos a estas amostras a indometacina (10 μM), a qual bloqueia a síntese de prostanóides por uma acção inibidora sobre a ciclooxigenase, verificamos que inibia os relaxamentos induzidos pelo AA. Pelo contrário, ao adicionar um antagonista dos R-TP (SQ29548), verificamos um relaxamento acentuado em resposta ao AA (Fig. 12), o que sugere a formação de prostanóides contrácteis e relaxantes a partir do AA.

Fig. 12 – Efeitos do tratamento com indometacina (10 μM) ou SQ29548 (0.02 μM) na perda de tonus induzida pela adição de ácido araquidónico (AA: 100 μM) nas tiras de músculo liso trabecular humano contraídas com fenilefrina. Os dados são expressos como a média \pm SEM da percentagem do relaxamento total induzido por 0.1 mM de HCl papaverina. *n* indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências. *** indica $p < 0.005$ versus resposta controle por um teste de dois-factores ANOVA.

Análise das respostas contrácteis induzidas pelos prostanóides no músculo liso trabecular humano

Fomos analisar as respostas farmacológicas induzidas pelo análogo do tromboxano A_2 (U46619), pela $PGF_{2\alpha}$, pelo agonista dos R-FP (fluprostenol) e pelo agonista dos R-EP₁ e R-EP₃ (sulprostone) nas amostras de tecido cavernoso humano. Verificamos que o U46619 apresenta uma potente actividade contráctil do músculo liso trabecular (EC_{50} 8.3 ± 2.8 nM). A $PGF_{2\alpha}$ produziu também respostas contrácteis, porém com concentrações muito mais elevadas (EC_{50} 6460 ± 3220 nM) e o agonista selectivo dos receptores FP, fluprostenol, foi ainda menos potente (EC_{50} 29540 ± 14040 nM).

O agonista dos R – EP, do tipo EP₁ e EP₃ (sulprostone), não induziu nenhuma actividade contráctil, pelo que podemos deduzir que estes receptores EP não medeiam as respostas contrácteis no tecido cavernoso humano. (Fig. 13)

Fig. 13 – Respostas contrácteis induzidas pelo análogo do tromboxano A_2 , U46619 (0.01 nM a 3 μ M); pela prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$ 1 nM a 100 μ M); pelo agonista do receptor FP, fluprostenol (1 nM a 100 μ M) e o agonista para os receptores EP₁ e EP₃, sulprostone (1 nM a 100 μ M) nas tiras de músculo liso trabecular humano. Os dados são expressos como a média \pm SEM da percentagem da contracção induzida por 120 mM K^+ (KKHS). *n* indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências.

Fomos em seguida, analisar os efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores TP (SQ29548), que não modificou o tónus basal, nas curvas de dose-resposta induzida pelo U46619, e verificamos um deslocamento da curva para a direita (EC_{50} 115.2 ± 39.9 nM), sem alteração da resposta máxima (Fig.14).

Fig. 14 – Efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores TP, SQ29548 (0.02 μ M) nas respostas contrácteis induzidas pelo análogo do tromboxano A_2 , U46619 (0.01 nM a 3 μ M) nas mesmas tiras de músculo liso trabecular humano. Os dados são expressos como a média \pm SEM da percentagem de contracção máxima obtida na ausência de SQ29548. n indica o número de doentes a quem se retirou o tecido para as experiências. *** indica $p < 0.005$ versus resposta controle por um teste de dois factores ANOVA.

Procedeu-se da mesma maneira, o bloqueio dos R-TP com SQ29548 (0.02 μ M), o que provocou uma inibição significativa das respostas contrácteis induzidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o fluprostenol (Fig. 15 A e Fig.15 B).

Fig. 15 A – Efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores TP, SQ29548 (0.02 μ M) nas respostas contrácteis induzidas pela prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$: 1 nM a 100 μ M) nas mesmas tiras de músculo liso trabecular humano. Os dados são expressos como a média \pm SEM da percentagem de contracção máxima obtida na ausência de SQ29548. *n* indica o número de doentes a quem se retirou o tecido para as experiências. *** indica $p < 0.005$ versus resposta controle por um teste de dois factores ANOVA.

Fig. 15 B – Efeitos do tratamento com o antagonista dos receptores TP, SQ29548 (0.02 μ M) nas respostas contrácteis induzidas pelo agonista dos receptores FP, fluprostenol (1nM a 100 μ M) nas mesmas tiras de músculo liso trabecular humano. Os dados são expressos como a média \pm SEM da percentagem de contracção máxima obtida na ausência de SQ29548. n indica o número de doentes a quem se retirou o tecido para as experiências. *** indica $p < 0.005$ versus resposta controle por um teste de dois factores ANOVA.

Análise das respostas relaxantes induzidas pelas prostaglandinas no músculo liso trabecular humano

Fomos analisar as respostas farmacológicas induzidas, em concentrações crescentes, pelas prostaglandinas PGD₂, PGI₂, PGE₁, PGE₂ e o agonista selectivo dos receptores EP₂, butaprost, nas amostras de tecido cavernoso de pênis humano contraído pela fenilefrina. Verificamos que a administração dos agonistas endógenos dos receptores DP e IP, a PGD₂ e a PGI₂, respectivamente, não induziram um efeito relaxante e, pelo contrário, em concentrações elevadas produziram contracções ligeiras. Os agonistas dos receptores EP, a PGE₁ e a PGE₂, e o agonista selectivo do subtipo EP₂, butaprost, foram avaliados em tiras de tecido cavernoso humano, previamente, contraído pela fenilefrina. Os três foram capazes de produzir um efeito relaxante consistente, embora a PGE₂ tenha apresentado uma potência superior à PGE₁ e ao butaprost (EC₅₀ 16.3±3.8; 93.8±31.5 e 1820±1284 nM para a PGE₂, a PGE₁ e ao butaprost, respectivamente) (Fig 16).

Fig. 16 – Apresenta as respostas induzidas pela prostaglandina D₂ (PGD₂ - 1 nM a 10 µM); pela prostaciclina (PGI₂ - 1 nM a 10 µM); pela prostaglandina E₁ (PGE₁ - 1 nM a 3 µM); pela prostaglandina E₂ (PGE₂ - 1 nM a 3 µM) e pelo agonista selectivo dos receptores EP₂, butaprost, (1 nM a 100 µM) em tiras diferentes de músculo liso trabecular humano contraído com fenilefrina. Os dados são expressos como a média ± SEM da percentagem do relaxamento total induzido por 0.1 mM de HCl papaverina. n indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências.

Quantificação dos nucleótidos cíclicos

Fomos quantificar os nucleótidos cíclicos, AMPc e o GMPc, do tecido muscular liso trabecular após exposição à PGE₁ (em concentrações crescentes). A adição de PGE₁ (nas doses de 0.1, 1 e 10 μM) provocou aumento significativo de AMPc, dependente da concentração e com significado estatístico a partir da concentração de 1 μM. No entanto, os níveis de GMPc permaneceram inalterados para as mesmas concentrações de PGE₁ (Fig. 17).

Fig. 17 – Quantificamos o AMPc (A) e GMPc (B) tecidual do músculo liso trabecular humano após exposição à prostaglandina E₁ (PGE₁ : 0.1, 1 e 10 μM). Os dados são expressos como a média ± SEM de pmol AMPc ou GMPc por mg de proteína tecidual. *n* indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as determinações. ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.005 versus controle (pelo teste ANOVA dum factor seguido do teste Student-Newman-Keuls).

Avaliação do efeito da activação dos receptores TP sobre os relaxamentos Induzidos pela PGE₁

Avaliamos as respostas à PGE₁ nas tiras de tecido trabecular humano na ausência e na presença de U46619 (3 nM). Verificamos que a activação dos R-TP com U46619 era capaz de inibir os relaxamentos induzidos pela PGE₁ provocando um desvio da curva para a direita, sem alterar a resposta máxima, o que prova que as prostaglandinas contrácteis inibem, num antagonismo-funcional, os relaxamentos da PGE₁ (Fig. 18).

Fig. 18 – Mostra os efeitos do tratamento com U46619 (3 nM) nos relaxamentos induzidos pela prostaglandina E₁ (PGE₁: 1 nM a 10 µM) nas mesmas tiras de músculo liso trabecular humano contraído com fenilefrina. Os dados são expressos como a média ± SEM da percentagem do relaxamento total induzido por 0.1mM de HCl de papaverina. *n* indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências. *** indica $p < 0.005$ versus resposta controle por um teste de dois factores ANOVA.

Estudo dos relaxamentos à PGE₁ e a sua correlação com a resposta clínica

Foram estudados, individualmente, os relaxamentos induzidos pela PGE₁ em tiras de corpo cavernoso de 39 doentes com disfunção erétil. Realizamos curvas de dose - resposta por adição de PGE₁ (1 nM a 10 µM) a tiras de corpo cavernoso destes doentes, previamente, contraídas com fenilefrina (1µM). Encontramos uma grande variabilidade nas respostas relaxantes induzidas pela PGE₁ que variaram entre os 60% e os 100% de relaxamento máximo, assim como uma grande variabilidade na sensibilidade dos tecidos à PGE₁ (Fig. 19 A).

Fig. 19 A – Apresenta as respostas individuais a PGE₁ (1 nM a 10 µM) nas amostras de músculo liso trabecular humano, previamente, contraído com fenilefrina (1µM). Os dados são expressos como a percentagem de relaxamento total induzido por 0.1 mM de HCl de papaverina. n indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências.

Calculamos a EC_{50} individual, ou seja, a concentração necessária para obter metade da resposta máxima induzida pelo composto (média 0.226 μ M; desvio-padrão 0.418; e a variação de 0.01 a 10 μ M). Avaliamos também o relaxamento máximo obtido para a PGE_1 em cada grupo de doentes (média 83.5%; desvio-padrão 12.0; e uma variabilidade entre 60 até 100 %) (Fig. 19 B).

Fig. 19 B – Foram estudados, individualmente, os relaxamentos induzidos pela PGE_1 em tiras de corpo cavernoso de 39 doentes com disfunção erétil. Verificou-se uma grande variabilidade das respostas relaxantes induzidas pela PGE_1 no músculo liso trabecular dos diferentes doentes, do que resultou uma grande amplitude de diversas ordens de grandeza nos valores de EC_{50} (média 0.226 μ M; desvio padrão 0.418; variação desde 0.01 a 10 μ M) e uma grande variabilidade no relaxamento máximo (média 83.5 % ; desvio-padrão 12.0 ; variação de 60 até 100 %). A EC_{50} define-se como a concentração de PGE_1 (em μ M) necessária para obter metade da resposta máxima a esta droga.

Correlação da resposta clínica pela injeção intracavernosa de PGE₁

Para o estudo das respostas individuais à PGE₁, foram incluídos 39 doentes com respostas individuais à PGE₁, tendo sido calculada a EC₅₀ individual (ou seja, a concentração necessária para obter metade da resposta máxima induzida pelo composto) bem como os relaxamentos máximos para a PGE₁. Os doentes foram divididos em dois grupos de acordo com a resposta erétil clínica à PGE₁ (má / parcial ou completa), tendo o grau de tumescência do pénis sido avaliado pelo Médico Assistente, no exame visual e físico após a injeção intracavernosa de Alprostadil (PGE₁).

Os doentes com história clínica completa foram divididos em dois grupos de acordo com a resposta erétil induzida pela injeção intracavernosa de PGE₁ (má / parcial ou completa) e confirmada pelo seu Médico Assistente. A análise destes dados mostrou uma correlação entre a eficácia clínica da PGE₁ e a amplitude dos relaxamentos obtidos in vitro com o mesmo fármaco. Nas amostras de tecido cavernoso dos doentes com melhor resposta clínica à PGE₁, encontramos valores menores da EC₅₀ para a PGE₁ assim como um relaxamento máximo, significativamente, maior. (Fig. 20)

Fig. 20 – Apresenta os valores de EC₅₀ para a PGE₁ (em cima) e as respostas de máximo relaxamento para a PGE₁ (em baixo) obtidas nas tiras de tecido muscular liso trabecular humano contraídas com fenilefrina (1 µM). Os tecidos foram divididos em dois grupos dependendo da resposta erétil do doente (má, n=24 / parcial ou completa, n=15) à injeção intracavernosa de alprostadil (PGE₁). Os dados de relaxamento máximo são expressos como a percentagem do relaxamento total induzido por 0.1 mM de HCl de papaverina. * p<0.05 e ** p<0.01 entre os grupos pelo teste t de Student não parelhado.

Avaliação da combinação de PGE₁ + SNO-Glu sobre o relaxamento do músculo liso trabecular humano

Realizamos curvas de concentração - resposta do relaxamento à PGE₁ (0,1 nM a 10 μM) e ao SNO-Glu (10 nM a 1 mM) de maneira individual, e na combinação, sobre tiras diferentes de corpo cavernoso provenientes do mesmo doente. A administração de SNO-Glu induziu sempre um relaxamento, quase total e dependente da concentração, mesmo nos tecidos provenientes de doentes que tinham respondido mal à PGE₁ (Fig. 21).

Fig. 21 – Traçados representativos das curvas de concentração - resposta à PGE₁ (0.1 nM a 10 μM) e ao SNO-Glu (10 nM a 1 mM) nas tiras de tecido muscular liso trabecular humano contraídas com 1 μM de fenilefrina (PE). Nota-se uma resposta deficiente à PGE₁ e um relaxamento completo ao SNO-Glu. As concentrações são expressas como o log de molaridade. As curvas de concentração - resposta para a PGE₁ e SNO-Glu foram realizadas em tecidos paralelos provenientes do mesmo doente.

Quando analisamos a curva da PGE₁ isolada, com a da combinação PGE₁ + SNO-Glu (na proporção 1:100), representada somente com as concentrações de PGE₁, verificamos um desvio significativo para a esquerda. As respostas máximas para a PGE₁ foram 71.0 ± 5.1% versus 95.2 ± 2.1% com a combinação PGE₁ + SNO-Glu; p <0.01. No músculo liso trabecular a EC₅₀ para PGE₁ isolada foi 0.083 ± 0.05 µM versus 0.006 ± 0.001 µM para PGE₁ + SNO-Glu; p < 0.01 (Fig. 22).

Fig. 22 – Curvas da concentração - resposta para PGE₁ (1 nM a 10 µM) e para a combinação de PGE₁ (0.1 nM a 10 µM) e SNO-Glu (PGE₁ + SNO-Glu, na proporção de 1:100) em tiras de músculo liso trabecular humano contraídas com fenilefrina (1µM). A curva da resposta - concentração obtida com a combinação de PGE₁ + SNO-Glu é representada somente como concentrações de PGE₁. Os dados são expressos como a média ± SEM da porcentagem de relaxamento total induzido por 0.1 de HCl de papaverina. n indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências. As curvas de concentração - resposta para a PGE₁ e para a combinação PGE₁ + SNO-Glu foram realizadas em tecidos paralelos provenientes dos mesmos doentes. * p <0.01 indica diferenças significativas pelo teste ANOVA de dois-factores.

As respostas relaxantes da combinação PGE₁ + SNO-Glu, também foram comparadas com a curva de concentração-resposta induzida pelo SNO-Glu isolado. Verificamos, igualmente, um desvio significativo para a esquerda da curva de concentração - resposta da combinação PGE₁ + SNO-Glu representada, somente, como concentrações de SNO-Glu. As respostas máximas foram 94.4 ± 4.2% para SNO-Glu versus 95.2±2.1% para PGE₁ + SNO-Glu, o que mostra não serem significativamente diferentes um do outro. O valor de EC₅₀ para o SNO-Glu isolado foi 2.56 ± 1.3 µM versus 0.58 ± 0.16 µM para o PGE₁ + SNO-Glu; p < 0.05 (Fig. 23).

Fig. 23 – Curvas de concentração - resposta para SNO-Glu (10 nM a 1 mM) e a combinação de PGE₁ com SNO-Glu (10 nM para 1 mM; PGE₁ + SNO-Glu, na proporção de 1:100) em tiras de músculo liso trabecular humano contraídas com fenilefrina (1 µM). A curva de concentração - resposta obtida com a combinação de PGE₁ e SNO-Glu é representada somente como concentrações de SNO-Glu. Os dados são expressos como a média ± SEM da porcentagem de relaxamento total induzido por 0.1 mM de HCl de papaverina. n indica o número de doentes a quem se retirou tecido para as experiências. As curvas de concentração - resposta para o SNO-Glu e para a combinação de PGE₁ + SNO-Glu foram realizadas em tecidos paralelos provenientes dos mesmos doentes. * p < 0.01 indica diferenças significativas pelo teste ANOVA de dois-factores.

Realizamos a análise das respostas obtidas com a combinação PGE₁ + SNO-Glu para determinar se este maior poder relaxante se devia a simples efeitos aditivos de ambos os fármacos, ou existia um sinergismo nas suas ações. Para tal, calculamos as concentrações teóricas de cada um dos fármacos necessárias para obter percentagens definidas de relaxamento (10, 20, 40, 60 e 70%), assumindo a existência de simples efeito aditivo, e representando-os numa curva teórica para efeitos aditivos. Esta curva, obtida de forma teórica, foi comparada com as concentrações de PGE₁ e SNO-Glu utilizadas nas experiências e necessárias para obter as mesmas percentagens de relaxamento quando se administrou esta combinação (curva experimental). Verificamos uma diferença significativa entre ambas as curvas (a teórica e a experimental) porque as diferentes percentagens de relaxamento foram alcançadas com concentrações inferiores da combinação PGE₁ + SNO-Glu, em relação às esperadas se existissem apenas efeitos aditivos. Demonstrase, portanto, a existência dum efeito sinérgico na combinação de PGE₁ + SNO-Glu para o relaxamento do músculo liso trabecular humano (Fig. 24).

Fig. 24 – Análise de sinergismo nos relaxamentos induzidos pela combinação de PGE₁ + SNO-Glu nas tiras de tecido muscular liso trabecular humano. Construímos uma curva teórica a partir das concentrações teóricas de cada um dos fármacos necessárias para obter percentagens definidas de relaxamento, assumindo a existência apenas de efeitos aditivos. Comparamos esta curva com uma outra obtida utilizando as concentrações da combinação PGE₁ + SNO-Glu necessárias para obter os mesmos níveis de relaxamento (curva experimental). Os dados são expressos como a média ± SEM das concentrações de PGE₁ (nM) presentes na combinação (a concentração de SNO-Glu é 100 vezes mais elevada). n indica o número de doentes a quem se retirou o tecido para as experiências. Foram observados efeitos sinérgicos no músculo liso trabecular humano. * p <0.05 versus os efeitos teóricos aditivos pelo teste ANOVA de dois factores.

Efeito da combinação PGE₁ + SNO-Glu na acumulação de nucleótidos cíclicos no tecido cavernoso humano.

No sentido de confirmar se houve activação das duas vias de relaxamento, determinamos a quantidade de AMPc e de GMPc no tecido cavernoso humano após exposição à PGE₁ e ao SNO-Glu, isolados e na combinação. Em relação ao grupo controle, verificamos que os níveis tecidulares de GMPc não eram alterados pela incubação com a PGE₁ (1 µM) mas, pelo contrário, observamos um notável aumento nos tecidos tratados com o SNO-Glu (100 µM). A incubação dos tecidos trabeculares dos mesmos doentes com a combinação de PGE₁ + SNO-Glu, permitiu-nos verificar um aumento significativo da quantidade de GMPc, comparado com o grupo controle e da PGE₁ (Fig. 25 - A).

Por outro lado, a incubação com SNO-Glu (100 µM) não alterou os níveis de AMPc no tecido cavernoso, enquanto a PGE₁ (1µM) produziu um aumento significativo da quantidade de AMPc. A combinação de PGE₁+SNO-Glu também aumentou, significativamente, os níveis de AMPc no tecido cavernoso destes doentes (Fig. 25 - B) Assim, podemos comprovar que se verificou a activação de duas vias fundamentais de relaxamento do tecido cavernoso humano, após exposição à combinação PGE₁ + SON-Glu.

Fig. 25 – Determinação da quantidade de GMPc (A) e de AMPc (B) no tecido muscular liso trabecular humano após a exposição a PGE₁ (1 µM), ao SNO-Glu (100 µM) e a ambos. Os dados são expressos como a média ± SEM de picomoles de GMPc ou AMPc por miligrama de proteína contida no tecido. n indica o número de doentes a quem se recolheu tecido para as experiências. * p < 0.05 ; ** p < 0.01 versus controle pelo teste ANOVA dum factor seguido dum teste Student-Newman-Keuls)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os prostanóides encontram-se envolvidos na regulação fisiológica do tónus do músculo liso trabecular humano (Azadzi e col., 1992), o que veio relançar um enorme interesse a caracterização dos diferentes tipos de receptores prostanóides presentes no corpo cavernoso do pénis humano. A sua acção é mediada, directamente, através do seu receptor e como os receptores prostanóides se encontram distribuídos de forma irregular nas células dos tecidos, alguns prostanóides podem promover efeitos diferentes, ou mesmo opostos, quando actuam nos diferentes tecidos. No caso do pénis humano, a regulação do tónus muscular liso é muito complexa para assegurar, de forma coordenada e eficaz, as funções de relaxamento e contracção. O nosso propósito foi estudar os diferentes receptores prostanóides presentes no corpo cavernoso humano e que medeiam estas funções.

O tecido cavernoso humano sintetiza prostanóides relaxantes a partir do ácido araquidónico pois, após a adição deste ao banho de órgãos, verificou-se o relaxamento moderado das tiras de músculo liso trabecular, o qual foi abolido após a adição do inibidor da ciclooxigenase, a indometacina. Verificamos, igualmente, a síntese de prostanóides contrácteis no tecido trabecular humano, pois nas tiras de corpo cavernoso tratadas com um antagonista dos receptores do tromboxano SQ29548 (Hedberg e col., 1988), produziu-se um aumento significativo no relaxamento induzido pelo ácido araquidónico. Estas modificações no tónus do tecido muscular liso do corpo cavernoso salientam a sua capacidade para sintetizar produtos derivados da ciclooxigenase que afectam a sua contractilidade. Estes resultados sugerem que os prostanóides, formados a partir do ácido araquidónico, induzem efeitos opostos na contractilidade (efeitos contrácteis e efeitos relaxantes) do músculo liso trabecular.

Os resultados do presente estudo evidenciam que os receptores TP são responsáveis pela contracção do músculo liso trabecular humano. Podemos observar contracções, de potência elevada, induzidas nas tiras de corpo cavernoso humano pelo agonista-selectivo dos receptores TP (U46619), e também as induzidas pelos agonistas dos receptores FP, a $PGF_{2\alpha}$ e o seu agonista-selectivo, fluprostenol, as quais necessitaram de concentrações muito mais elevadas para produzirem a contracção deste tecido. Em estudos realizados, anteriormente, os receptores TP (Baxter e col., 1995), os FP (Senior e col., 1992) e os subtipos EP_1 e EP_3 (Quian e col., 1994; Senior e col., 1991) revelaram a capacidade contráctil em preparações de outros

músculos lisos humanos. Os valores EC_{50} obtidos para o U46619, no músculo liso do pênis humano, são da mesma ordem de grandeza dos obtidos por outros autores em preparações com receptores TP funcionais noutros órgãos, como na aorta de rato (6.8 nM) (Kromer & Tippins, 1998), na veia safena de coelho (9.8 nM) (Lydford e col., 1996), no músculo liso brônquico (12 nM) (Coleman & Sheldrick, 1989), na artéria intrapulmonar humana (3.1 nM) (Jino e col., 1996) e em artérias uterinas humanas (3.5 nM) (Baxter e col., 1995). Pensamos que o corpo cavernoso humano não apresenta receptores FP funcionais e, fundamentamos a sua falta, pelo facto de nas preparações com este tipo de receptores, como em células de cultura (Griffin e col., 1998) e no útero de coelho (Chen e col., 1998), o valor de EC_{50} para a $PGF_{2\alpha}$ (30.9 e 4 nM, respectivamente) são diversas ordens de grandeza inferiores em relação às obtidas no nosso estudo. Além disso, naqueles estudos (Griffin e col., 1998; Chen e col., 1998) o agonista-selectivo dos receptores FP, fluprostenol, apresenta uma potência igual ou superior à $PGF_{2\alpha}$ (4.4 e 6 nM, respectivamente), mas no tecido trabecular humano a sua potência é quatro vezes menor. Por outro lado, nas preparações que contêm receptores TP, mas não os FP, a $PGF_{2\alpha}$ era 300 vezes menos potente que o U46619, como acontece no músculo liso brônquico (Coleman & Sheldrick, 1989) e 743 vezes menos potente na artéria uterina humana (Baxter e col., 1995). Os achados do nosso estudo estão em concordância com estes, pois a $PGF_{2\alpha}$ é 778 vezes menos potente que o U46619 no músculo liso trabecular humano.

Em relação ao sulprostone, um agonista dos receptores EP_1 e EP_3 (Bunce e col., 1990), verificou-se que não apresenta qualquer efeito contráctil no músculo liso trabecular, mesmo em concentrações elevadas, pelo que podemos afastar a presença de receptores EP_1 e EP_3 funcionais no tecido trabecular humano (Fig. 13).

As contracções induzidas pelos agonistas dos receptores FP, em concentrações elevadas, parecem ser produzidas por interacção com os receptores TP, visto o tratamento com o antagonista destes receptores, SQ29548, ter diminuído de forma significativa, as respostas ao U46619, à $PGF_{2\alpha}$ e ao fluprostenol (Fig. 13-15).

Neste contexto, em face dos resultados expostos, podemos concluir que os receptores prostanóides que medeiam as respostas contrácteis no tecido trabecular humano são os receptores TP.

Em relação aos receptores responsáveis pelas acções relaxantes dos prostanóides no tecido trabecular humano, deve ser afastada a existência de receptores DP e IP no músculo liso trabecular, os quais têm revelado propriedades relaxantes noutros tecidos (Baxter e col., 1995; Senior e col., 1992), pois a PGD₂ e a PGI₂ mostraram incapacidade para produzir um relaxamento significativo no músculo liso trabecular humano (Fig. 16). De facto, apreciaram-se contrações de PGD₂ e PGI₂, a concentrações elevadas, mas que eram produzidas pela interacção destes prostanóides com os receptores TP, já que o tratamento com SQ29548 impediu o aparecimento destas respostas contrácteis (dados não apresentados).

Em amostras, previamente contraídas pela fenilefrina, verificamos relaxamentos consistentes induzidos pelas prostaglandinas da série E, a PGE₂ e a PGE₁, assim como pelo agonista do subtipo EP₂ / EP₄, o butaprost (Gardiner e col., 1986). A potência do butaprost é débil, e muito inferior à PGE₂ e à PGE₁, aliás uma característica que tem sido observada com frequência também noutros estudos (Coleman e col., 1994; Regan e col., 1994). Na verdade, estudos em células que expressam diferentes tipos de receptores prostanóides de várias espécies animais, o butaprost une-se apenas ao subtipo EP₂ e não apresenta nenhuma actividade no subtipo EP₄ (Kiryama e col., 1997; Castleberry e col., 2001; Jensen e col., 2001), sendo certo que o butaprost metil-ester não mostrou selectividade entre os receptores recombinantes humanos EP₂ e EP₄ (Abramovitz e col., 2000).

A exposição do tecido trabecular humano à PGE₁ originou aumento dos níveis de AMPc, e relacionado com a concentração deste prostanóide, mas não modificou o nível de GMPc no tecido trabecular humano. Este facto, está em concordância com a mencionada interacção da PGE₁ com o receptor EP₂, o qual está associado a proteínas Gs que activam a via da adenililciclase (Coleman e col., 1994) (Fig. 17), mas não afasta a existência de receptores EP₄, os quais também se encontram acoplados a proteínas Gs. Assim, e embora não possamos excluir a existência de receptores EP₄ no tecido cavernoso humano, propomos que as respostas relaxantes dos prostanóides da série E, são mediadas principalmente pelo receptor do subtipo EP₂. Fundamentamo-nos, em primeiro lugar, porque as preparações de músculo liso com o subtipo EP₄ funcional, habitualmente, requerem valores de EC₅₀ para a PGE₂ abaixo de 1 nM (Lydford e col., 1996; Coleman e col., 1994), enquanto os valores obtidos no tecido muscular liso trabecular humano são muito mais elevados e, também, por serem valores muito mais aproximados dos descritos nas preparações que expressam os receptores EP₂.

Em conclusão, podemos afirmar que o tecido trabecular humano sintetiza prostanóides derivados da ciclooxygenase que modulam o tónus do músculo liso trabecular. Esta modulação produz-se através dos receptores TP, que provocam a contracção do músculo liso trabecular, e dos receptores EP₂ / EP₄, que induzem o relaxamento embora com uma provável maior relevância funcional para os EP₂.

Uma prova da relevância do antagonismo funcional, entre os diferentes prostanóides na regulação do tónus do músculo liso trabecular, é o facto da presença do agonista dos receptores TP (U46619) produzir a inibição das respostas relaxantes mediadas pela PGE₁. (Fig. 18)

A injeção intracavernosa da prostaglandina E₁ (PGE₁) tem sido utilizada amplamente como agente terapêutico na disfunção eréctil (Buvat, 1996; Linet & Ogring 1996; Buvat, 1998). Apesar dos bons resultados clínicos, um número considerável de doentes (entre 30 a 40%) não responderam ao tratamento com PGE₁ (Porst, 1996). A razão da falta de resposta à PGE₁, neste grupo de doentes, ainda não é conhecida e pode depender de muitos factores (número diminuído dos receptores na membrana celular, mecanismos de transdução alterados, metabolismo inadequado, estrutura tecidual lesada, etc.). Ainda não foi demonstrado que a eficácia clínica da PGE₁ esteja relacionada com a qualidade do relaxamento do músculo liso do pénis humano a este fármaco, visto a dose para alcançar uma erecção satisfatória ser muito variável, já que se alguns doentes responderam com apenas 0,5 µg, outros necessitaram de doses 80 vezes superiores (40 µg) (Linet & Ogring, 1996; Porst, 1996).

A análise das respostas in vitro à PGE₁ no tecido muscular liso trabecular humano, retirado a doentes com disfunção eréctil, permitiu-nos constatar uma enorme variabilidade no relaxamento para este prostanóide, com grandes diferenças de sensibilidade (valores de EC₅₀ de várias ordens de grandeza de diferença), bem como uma ampla variação no relaxamento máximo (Fig. 19 A). É interessante verificar que as respostas in vitro à PGE₁ estão de acordo com a resposta clínica dos doentes que cederam o tecido para as experiências. A análise destes resultados salienta que os doentes com uma má resposta clínica ao alprostadil (PGE₁), evidenciam in vitro um relaxamento máximo menor apesar de valores EC₅₀ muito elevados (Fig. 19 B). Estes resultados fazem-nos pensar que a ausência duma resposta clínica eficaz à PGE₁, pode ter origem na incapacidade para relaxar eficazmente o tecido muscular liso trabecular humano, muito embora o mecanismo subjacente deste facto ainda não esteja esclarecido.

Temos conhecimento na prática clínica que alguns doentes, e independente da etiologia da sua disfunção eréctil, não responderam de forma satisfatória à PGE₁. Com o objectivo de melhorar a resposta positiva, ao tratamento intracavernoso de PGE₁ num maior número de doentes, tem-se utilizado na prática clínica a combinação de PGE₁ com outros compostos. Nestas combinações, além de se procurar melhorar a eficácia clínica, também se procura reduzir a dose de PGE₁ eficaz, e assim minimizar os efeitos adversos, como a dor no local da injeção. A combinação mais difusamente utilizada, e que tem demonstrado melhores respostas clínicas (Padma-Nathan, 1990; McMahon, 1991; von Heyden e col., 1993), inclui a PGE₁, o antagonista dos receptores α -adrenérgicos (fentolamina) e o inibidor inespecífico de fosfodiesterases (papaverina). Num grupo reduzido de doentes também foi estudada a associação de quatro fármacos - PGE₁ + papaverina + fentolamina + acetilcolina (Montorsi e col. 1994), a qual não mostrou vantagens clínicas em relação à combinação tripla (tri-mix).

Sabemos que o relaxamento do músculo liso trabecular humano é mediado pela via do AMPc e também, numa forma inter-activa, com a via do óxido nítrico (NO) e do GMPc (Kim e col., 1991; Burnett e col., 1992; Trigo-Rocha e col., 1993). A activação fisiológica desta via do óxido nítrico / GMPc é induzida pela libertação de óxido nítrico, proveniente do endotélio dos espaços lacunares e das artérias helicinas do pénis assim como da estimulação dos nervos nitrérgicos (Rajfer e col., 1992).

Existe um grupo de substâncias denominadas por dadores de óxido nítrico, as quais constituem uma aproximação farmacológica do óxido nítrico, ou seja, são compostos estáveis que depois da administração intracavernosa libertam o óxido nítrico da sua estrutura para produzirem acções farmacológicas análogas. Estes dadores de óxido nítrico provocam, igualmente, o relaxamento acentuado do músculo liso do pénis (Saenz de Tejada e col., 1989; Bush e col., 1992). Alguns deles, como o linsidomine (SIN-1) (Truss e col., 1994) e o nitroprussiato de sódio (SNP) (Martinez-Piñeiro e col., 1998), também administrados por via intracavernosa, já foram avaliados como terapêutica alternativa à PGE₁, embora em ambos os casos os resultados tivessem sido discretos.

Numa perspectiva clínica, pensamos utilizar a associação da PGE₁ com um fármaco dador de óxido nítrico, com o objectivo em aumentar a capacidade relaxante do músculo liso trabecular e, ao mesmo tempo, permitir o recurso a doses inferiores de PGE₁ para reduzir os seus efeitos colaterais. Decidimos utilizar o S-nitrosoglutatião (SNO-Glu), um composto do grupo dos S-nitrosotiois, em que se produziu a

nitrosilação no grupo tiol do glutatião, um péptido presente no plasma humano em situações fisiológicas e que participa em várias reacções celulares. Este S-nitrosoglutatião tem mostrado capacidade para induzir o relaxamento do músculo liso vascular (MacAllister e col.,1995) e trabecular (Gupta e col.,1995). Neste estudo ficou demonstrado que o SNO-Glu provoca o relaxamento consistente do músculo liso trabecular humano, quer ele relaxe bem ou não à PGE₁. Na verdade, os tecidos que relaxaram de forma escassa em resposta à PGE₁, sofreram relaxamento eficiente por acção do SNO-Glu (Fig. 21).

Este facto, sugere que nalguns doentes a resposta clínica à PGE₁, pode estar limitada por falta de resposta relaxante do músculo liso trabecular humano, especificamente, a este prostanóide, mas apesar disso mantém a capacidade de relaxamento para os fármacos capazes de activarem as outras vias relaxantes.

A combinação da PGE₁ com o SNO-Glu melhorou o relaxamento exercido pela PGE₁ isolada no músculo liso trabecular humano, bem como aumentou o relaxamento máximo, e produziu o deslocamento para a esquerda da curva de concentração-resposta para a PGE₁ (Fig. 22). Verificamos, igualmente, que esta combinação induziu o relaxamento do músculo liso trabecular humano de forma mais eficiente que a PGE₁ ou o SNO-Glu, quando utilizados em separado (Fig. 23).

Comprovamos, também, a existência duma interacção sinérgica entre os dois compostos para induzir o relaxamento do tecido trabecular, como demonstra o resultado positivo da análise de sinergismo realizado mediante o “método isobol” (Berenbaum,1989). Se assumirmos a existência, apenas, de efeitos aditivos da combinação de PGE₁ + SNO-Glu, verificamos que a curva teórica para os diferentes níveis de relaxamento (em resposta a concentrações crescentes dos dois compostos) fazia prever a necessidade de concentrações mais elevadas para ambos os fármacos, em relação às encontradas nas nossas experiências, o que confirma a existência de sinergismo (Fig. 24).

A verificação destes resultados permite propôr a combinação PGE₁ + SNO-Glu para induzir o relaxamento do músculo liso do pénis, pois ela é mais eficaz se comparada com a administração isolada de cada fármaco.

A maior eficácia relaxante da combinação PGE₁ + SNO-Glu pode ter origem na activação das duas vias fundamentais para o relaxamento do músculo liso trabecular do pénis (AMPc e GMPc), aliás como foi confirmado pela observação do aumento significativo do conteúdo dos nucleótidos cíclicos, tanto de AMPc como de GMPc, nos tecidos tratados com esta combinação. (Fig. 25)

A existência de sinergismo, entre as vias do AMPc e do GMPc, ainda não tinha sido estabelecida no músculo liso do pénis humano. Na verdade, Hempelmann e col. em 1995, tinham avaliado a combinação SIN-1 + VIP, no corpo cavernoso e na artéria helicina cavernosa humanos, tendo verificado que não existia um comportamento sinérgico entre estas duas moléculas no relaxamento do músculo liso peniano. A diferença entre estes resultados e os obtidos no nosso estudo dependem, provavelmente, do facto de se ter induzido a activação de receptores diferentes. Por outro lado, um estudo clínico realizado em 50 doentes com disfunção erétil revelou que a administração conjunta de PGE₁ e SIN-1 produziu respostas eréteis de melhor qualidade, comparadas com as obtidas por cada um dos compostos usados individualmente, mas sem a existência de sinergismo (Tordjman, 1993). Recentemente, foram apresentados os resultados da combinação SIN-1 + VIP, administrados por via intracavernosa, no modelo in vivo de coelho (O. Sazova e col., 2002). Esta combinação induziu aumento da pressão intracavernosa máxima (52,8±13,2 cm de H₂O) para valores idênticos aos observados com a administração de papaverina + fentolamina, o que estimula a realização de estudos posteriores para avaliar a sua eficácia no tratamento da disfunção erétil.

Em relação aos processos moleculares responsáveis pela acção sinérgica da PGE₁ e SNO-Glu apenas podemos especular. Tem-se observado que a PGE₁ possui capacidade para produzir outras acções, como a de inibir directamente a libertação da NA nas terminações nervosas pré-sinápticas adrenérgicas (Molderings e col., 1992), o que leva a pensar que a PGE₁ também pode potenciar a libertação de NO pelas terminações nervosas NANC, visto a libertação de NO nestas terminações ser inibida por activação dos receptores pré-sinápticos α -adrenérgicos (Simonsen e col., 1997).

Em estudos recentes realizados no rato (Escrig e col., 1999; Mas e col., 1999) ficou demonstrado que após a administração intracavernosa de PGE₁ produz-se aumento de NO no corpo cavernoso e a injeção, única ou repetida, leva a aumento da expressão das formas constitutivas de NOS (eNOS e a nNOS) e da concentração de NO, e assim potenciar o relaxamento do músculo liso trabecular. Podemos ainda especular que o aumento acentuado da concentração de GMPc, induzido pelo óxido nítrico, pode potenciar a actividade da via do AMPc, assim como activar outros locais de activação da guanilciclase solúvel ou activar outro mecanismo de relaxamento ainda não esclarecido.

CONCLUSÕES

- 1 - Os prostanóides endógenos, com origem a partir do ácido araquidónico, regulam a contractilidade do músculo liso do pénis através de receptores na membrana celular com efeitos funcionais opostos.
- 2 - Os receptores EP₂/EP₄ no músculo liso do pénis humano medeiam relaxamento e os receptores TP a contracção, induzidos pelos prostanóides.
- 3 - Existe uma grande variabilidade nas respostas, do tecido trabecular exposto à PGE₁, dos diferentes doentes.
- 4 - A análise destes resultados também evidencia que uma resposta clinica deficiente ao alprostadiil (PGE₁) correlaciona-se com o relaxamento diminuído do tecido trabecular *in vitro* em resposta à adição de PGE₁.
- 5 - A combinação PGE₁ + SNO-Glu que activa, em simultâneo, as vias do AMPc e GMPc no músculo liso trabecular humano, apresenta um efeito sinérgico no relaxamento deste tecido. Se tivermos presente que este relaxamento se relaciona com o efeito clínico, podemos obter melhor eficácia terapêutica com a combinação PGE₁ + SNO-Glu.

A terapêutica da disfunção erétil tem evoluído com grande rapidez desde a introdução das prótese penianas, o desenvolvimento de fármacos vaso-activos para injeção intracavernosa até ao aparecimento, revolucionário, de fármacos para administração oral.

A auto-injeção intracavernosa da PGE₁ representa a farmacoterapia mais eficaz da disfunção erétil, mas tem o inconveniente da injeção intracavernosa, o que não é bem aceite por um número considerável de doentes e leva-os a abandonar este tipo de tratamento. Mas, a permanente investigação nesta área e os estudos recentes dos mecanismos fisiológicos e farmacoterapêuticos perspectivam novas áreas de desenvolvimento bem como o aparecimento de terapêuticas inovadoras, inclusivé na terapêutica intracavernosa.

A relevância clínica das nossas observações assenta na possibilidade de formular novos agentes terapêuticos que possam aumentar a acção relaxante e / ou bloquear a activação dos receptores TP, nomeadamente, em patologias com excessiva actividade destes receptores como a diabetes mellitus (Davi e col., 1997; Hattori e col., 1999).

Uma nova área pode envolver a associação de principios terapêuticos actualmente disponiveis como, por exemplo, a associação de dadores de óxido nítrico com uma outra substância relaxante de acção local (ex. PGE₁ e / ou antagonista-receptores α_1 e α_2). A avaliação dos resultados deste trabalho, realizado com amostras de tecido trabecular do corpo cavernoso humano, comprovou *in vitro* que a combinação do S-nitrosoglutatião (SNO-Glu) com a PGE₁ é mais eficaz que a PGE₁ isolada. A união à molécula transportadora-glutatião (nitrosilação) proporciona ao óxido nítrico um perfil hemodinâmico mais estável, pelo que esta possibilidade tecnológica representa um avanço importante para o desenvolvimento de novas terapêuticas intracavernosas para a disfunção erétil.

Assim, e fundamentados na análise dos nossos resultados, parece-nos sensato sugerir que a combinação de PGE₁ + SNO-Glu, a qual apresenta um efeito sinérgico no relaxamento do músculo liso trabecular humano, pode vir a possibilitar no futuro beneficios na terapêutica local da disfunção erétil.

7 - PERSPECTIVAS

Outras direcções a desenvolver no tratamento da disfunção eréctil vão incidir nas áreas da terapêutica periférica (como sejam os antagonistas da Rho-Kinase ou a estimulação da guanililciclase solúvel mediada por um mecanismo não-dependente do óxido nítrico), no estudo dos receptores da dopamina e de novos agonistas, na terapêutica génica e na profilaxia dos factores de risco da disfunção eréctil.

Esta última, ao prevenir a degenerescência e / ou restaurar a função do tecido cavernoso é uma área muito motivante para investigar no futuro.

a) Novos inibidores selectivos das PDEs - as fosfodiesterases, que catalizam a hidrólise dos segundos mensageiros (AMPc e GMPc) envolvidos nas vias de sinais do músculo liso cavernoso, têm sido alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos. Os inibidores selectivos da PDE5, da segunda geração como o vardenafil e o tadalafil, vão estar disponíveis na clínica dentro em breve e outros fármacos com um mecanismo de acção idêntico encontram-se em fase avançada de desenvolvimento. Estes fármacos, administrados por via oral, permitem aos doentes melhor eficácia com menos efeitos adversos, além de maior versatilidade para iniciar e manter o efeito terapêutico.

b) A combinação de fármacos disponíveis - a associação de fármacos tem por objectivo fundamental aumentar a eficácia e diminuir os efeitos secundários. A disponibilidade actual de fármacos eficazes, administrados por via oral e com mecanismos de acção diferentes, torna legítimo tentar a sua combinação nos doentes que não responderam à terapêutica de fármaco-único. A associação dum fármaco de acção central a outro com acção periférica é atractiva e interessante. No entanto, torna-se importante certificarmo-nos das vantagens e encontrar a dose-ótima de cada fármaco, o que apenas se pode assegurar com a realização de estudos clinicos muito bem controlados. Por este motivo, antes de obter essa informação, combinar fármacos actualmente disponíveis, não deve ser recomendada (como por ex., sildenafil + apomorfina; apomorfina + antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos; antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos + sildenafil; sildenafil ou apomorfina com antagonistas dos receptores TP).

c) Novas áreas no sistema nervoso central – a oxytocina injectada no núcleo paraventricular do hipotálamo desencadeia a erecção do pénis, a qual pode ser bloqueada pela administração de antagonistas da oxytocina (ex. os opióides) ou pela castração. É interessante verificar que a testosterona de substituição pode restaurar a função erétil nesses doentes. Os receptores da oxytocina, os peptídeos que libertam a hormona de crescimento e os receptores da 5-HT_{2C}, constituem alvos de estudo com muita expectativa para induzirem a erecção do pénis.

d) Novas áreas periféricas - a enzima guanililciclase solúvel é, provavelmente, o receptor intracelular mais importante para o NO e capaz de induzir a produção de GMPc. Têm sido identificadas, e alvo de investigação, moléculas capazes de activar a GC por um mecanismo independente do NO.

O papel da proteína Rho-kinase na regulação do tónus cavernoso ainda não é conhecido. No entanto, é conhecida a sua capacidade para inibir a fosfatase da cadeia leve de miosina e para fosforilar, directamente, a cadeia leve de miosina do que resulta aumento da quantidade de miosina activada e indução da contracção celular. Assim, o antagonismo desta Rho-kinase pode facilitar o relaxamento do tecido muscular liso e, no caso do pénis, facilitar a erecção por um mecanismo independente do NO.

e) A terapêutica génica tem revelado resultados pré-clínicos encorajadores no campo da disfunção erétil. O pénis tem sido um órgão de estudo preferencial para este tipo de terapêutica devido à sua localização externa, fácil acessibilidade e baixo índice de renovação das células musculares lisas. Se esta terapêutica pode vir a representar uma opção eficaz na DE ainda é muito discutível, porque a erecção desencadeia-se durante um período de tempo esporádico e limitado, além da terapia génica requerer reforço periódico da dose. Este último ponto pode representar um inconveniente, em relação aos fármacos actualmente disponíveis, para a auto-administração oral. Existe necessidade de definir o alvo a tratar com a terapia génica - se o tecido muscular liso lesado (doença cardiovascular sistémica, diabetes mellitus, hipercolesterolemia) ou se activar alvos para induzir a erecção (NOS, canais de potássio, factor de crescimento do endotélio vascular) - para se definir no futuro os estudos a realizar nesta área e que representem benefícios clínicos eficazes.

f) A prevenção dos factores de risco cardiovascular comuns à disfunção eréctil, como por exemplo, o tabagismo, a hipertensão arterial, a hipercolesterolemia, a obesidade, o sedentarismo e o alcoolismo crónico. Muitos estudos anteriores evidenciaram a associação entre a disfunção eréctil, a doença cardíaca, doença vascular periférica e diabetes mellitus podendo constituir a manifestação precoce dum processo aterosclerótico sistémico. No entanto, e independente de todos eles, a idade é um factor de risco importante da disfunção eréctil e a sua prevenção é muito difícil !...

Em resumo, podemos afirmar a existência duma enorme expectativa no aperfeiçoamento das terapêuticas disponíveis para aumentar a eficácia do tratamento da disfunção eréctil. Os fármacos administrados por via intracavernosa, embora eficazes, têm a desvantagem comum de retirar alguma espontaneidade ao acto, pela necessidade da sua administração sempre que se deseja uma relação sexual.

A tentação em combinar fármacos por administração oral deve ser atenuada e aguardar os resultados de estudos controlados para nos assegurar das potenciais vantagens.

O estudo e desenvolvimento de novas áreas de tratamento, periféricas ou centrais, têm-se revelado promissoras, no entanto, a informação e implementação de hábitos de vida saudáveis constitui a primeira medida eficaz na prevenção dos factores de risco.

REGULATION OF HUMAN PENILE SMOOTH MUSCLE TONE BY PROSTANOID RECEPTORS

Javier Angulo*, Pedro Cuevas**, *José M. La Fuente**, Jose M. Pommerol*, Eduardo Ruiz-Castañé**, Ana Puigvert*, Sonia Gabancho*, Argentina Fernández**, Peter Ney*** & Iñigo Sáenz de Tejada*.

Fundación para la Investigación y el Desarrollo en Andrología*, Madrid, Spain; Departamento de Investigación, Hospital Ramon y Cajal**, Madrid, Spain and Corporate Development, Schwartz Pharma***, Manheim, Germany.

1- We have characterized the prostanoid receptors involved in the regulation of human penile arterial and trabecular smooth muscle tone.

2 – Arachidonic acid induced relaxation of human corpus cavernosum strips (HCCS) that was blocked by the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, and augmented by the thromboxane receptor (TP) antagonist, SQ29548, suggesting that endogenous production of prostanoid regulates penile smooth muscle tone.

3 – TP-receptors mediate contraction of HCCS and penile resistance arteries (HPRA), since the agonist of these receptors, U46619, potently contracted HCCS (EC₅₀ 8.3±2.8 nM) and HPRA (EC₅₀ 6.2±2.2 nM), and the contractions produced by prostaglandin F_{2α} at the high concentrations (EC₅₀ 6400±3220 nM in HCCS and 8900±6700 nM in HPRA) were inhibited by selective TP-receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μM).

4 – EP-receptors are responsible for prostanoid-induced relaxant effects in HCCS because only prostaglandin E₁ (PGE₁), prostaglandin E₂ and the EP₂ / EP₄ – receptor agonist, butaprost, produced consistent relaxation of this tissue (EC₅₀ 93.8±31.5, 16.3±3.8 and 1820±1284 nM, respectively). In HPRA, both prostacyclin and PGE₁ (EC₅₀ 60.1±18.4 and 109.0±30.9 nM respectively) as well as the selective IP-receptor agonist, cicaprost, and butaprost (EC₅₀ 25.2±15.2 and 7050±6020 nM, respectively) caused relaxation, suggesting co-existence of IP- and EP-receptors (EP₂ and / or EP₄).

5 – In summary, endogenous production of prostanoids may regulate penile smooth muscle contractility by way of specific receptors. TP-receptors mediate contraction in HCCS and HPRA, while the relaxant effects of prostanoids are mediated by EP₂- and / or EP₄-receptors in HCCS and by EP- and IP-receptors in HPRA.

British Journal of Pharmacology (2002), **136**, 23-30.

Keywords: Prostanoid receptors; human corpus cavernosum; human penile resistance arteries; impotence.

Abbreviations : DP, D-prostanoid; EP, E-prostanoid; FP, F-prostanoid; HCCS, human corpus cavernosum strips; HPRA, human penile resistance arteries; IP, I-prostanoid; PGD₂, prostaglandin D₂; PGE₁, prostaglandin E₁; PGE₂, prostaglandin E₂; PGF_{2α}, prostaglandin F_{2α}; PGI₂, prostacyclin; TP, T-prostanoid; TXA₂, thromboxane A₂.

Introduction

Derivates of arachidonic acid generated through the cyclooxygenase pathway are local mediators involved in many regulatory processes such as inflammation, platelet aggregation, control of vascular tone, etc. The large number and the importance of the actions exerted by prostanoid confer pharmacological relevance to the modulation of the effects induced by these compounds. Prostanoid receptors are grouped into five families: DP receptors, EP receptors (including four subtypes with different actions), FP receptors, IP receptors and TP receptors. The distribution of prostanoid receptors differs substantially between tissues and the coexistence of receptors mediating antagonistic actions is frequently observed (Baxter et al., 1995; Lydford et al., 1996; Quan et al., 1994).

Production of thromboxane A_2 (TXA_2), prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostacyclin (PGI_2) and prostaglandin E_2 (PGE_2) has been reported in rabbit (Daley et al., 1996) and human corpus cavernosum tissue (Jeremy et al., 1986; Moreland et al., 2001), and prostanoids have been shown to induce both contractile and relaxant effects in human trabecular and arterial smooth muscle (Hedlund & Andersson, 1985).

As relaxation of penile smooth muscle is needed to achieve and maintain penile erection (Saenz de Tejada et al., 1991), the interest in prostanoids for the treatment of erectile dysfunction has focused on the use of those with relaxant properties. PGE_1 has been shown to produce penile trabecular smooth muscle relaxation and penile erection, and has been extensively used as intracavernosal therapy for impotence (Porst, 1996). It is possible, however, that pharmacological antagonism of the action of constrictor prostanoids may also facilitate penile smooth muscle relaxation and therefore erection. It has been recognized that the balance in the actions of prostanoids can be altered by disease. Excessive production of contractile prostanoids (Davis et al., 1997; Koltai et al., 1990) or enhanced contractile pathways (Hattori et al., 1999) have been described in other vascular tissues and the kidney (McCarty, 1998).

The aims of this study were to characterize the prostanoid-receptors which mediate contraction and relaxation of human corpus cavernosum and resistance penile arteries.

Methods

Human corpus cavernosum tissues

Human corpus cavernosum specimens were obtained from impotent men at the time of penile prosthesis insertion. Tissues were maintained at 4-6 °C in M-400 solution (composition per 100 ml in g) manitol 4.19; KH₂PO₄ 0.205; K₂HPO₄·3H₂O 0.97; KCl 0.112; NaHCO₃ 0.084; until used which was between 2 and 16 hours from extraction (Simonsen et al., 1997).

Vascular reactivity of resistance penile arteries

Penile small arteries, helicine arteries (lumen diameter 150-400 μm), which are terminal branches of deep penile arteries, were dissected by carefully removing the adhering trabecular tissue and arterial ring segments (2 mm long) were subsequently mounted on two 40μm wires on microvascular double Halpern-Mulvany myographs (J.P.Trading, Aarhus, Denmark) for isometric tension recordings. The vessels were allowed to equilibrate for 30 min in physiological salt solution (PSS) to the following composition (mM) : Na Cl 119; KCl 4.6; CaCl₂ 1.5; MgCl₂ 1.2; NaHCO₃ 24.9; glucose 11; KH₂PO₄ 1.2; EDTA 0.027 at 37°C continuously bubbled with 95% O₂ / 5% CO₂ mixture to maintain a pH of 7.4. Passive tension and internal

circumference of vascular segments when relaxed *in situ* under a transmural pressure of 100 mmHg (L₁₀₀), were determined. The arteries were then set to an internal circumference equivalent to 90% of L₁₀₀ at which the force development was close to maximal (Mulvany & Halpern, 1977). The preparations were then exposed to 125 mM K⁺ (KPSS, equimolar substitution of NaCl for KCl in PSS) and the contractile response was measured. Contractile responses were evaluated by adding increasing cumulative concentrations of compounds on unstimulated arterial rings. For the relaxation studies, the arteries were contracted with 1 μM norepinephrine (80% of KPSS induced contraction approximately) and relaxation responses were evaluated by cumulative additions of compounds to the chambers.

Organ chamber studies

Strips of corpus cavernosum tissue (3x3x7 mm) were immersed in 8 ml organ chambers containing PSS, maintained at 37 °C and aerated with 5% CO₂ / 95% O₂, pH 7.4. Each tissue strip was incrementally stretched to optimal isometric tension, as determined by maximal contractile response to 1 μM phenylephrine (Azadzi et al., 1992; Kim et al., 1991).

Contractile responses were evaluated by adding increasing cumulative concentrations of compounds on unstimulated strips. For the relaxation studies, tissues were contracted with 0.5 – 3 μ M phenylephrine (80% of KPSS induced contraction) and relaxation responses were evaluated by cumulative additions of compounds to the chambers.

Measurement of cyclic nucleotides in human corpus cavernosum tissue

Corpus cavernosum strips were immersed in 8 ml organ chambers containing PSS, maintained at 37 °C and aerated with 5% CO₂ / 95% O₂, pH 7.4. Each tissue strip was incrementally stretched to maximal contractile response to 1 μ M phenylephrine. Then each tissue was given 0.5 μ M phenylephrine, 30 μ M zaprinast and 100 μ M IBMX and allowed to incubate for 15 min; after which time tissues were treated with drug or vehicle. Tissues were allowed to incubate for another 5 minutes then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C until extraction for cyclic nucleotide assay. Tissues were extracted by homogenization in 6% trichloroacetic acid followed by ether (H₂O-saturated) extraction and lyophilization. Cyclic nucleotides were determined by ELISA using a kit from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA.).

Protein determinations

Proteins were determined using the Bio-Rad protein Assay Kit microtiter plate assay procedure (Bio-Rad, Hercules, CA. USA.) with bovine serum albumin as standard.

Drugs and Materials

Arachidonic acid, phenylephrine, nor-epinephrine (arterenol), prostaglandin F₂ α (PGF₂ α), 9,11-dideoxy-9 α , 11 α -epoxymethano PGF₂ α (U46619) and indomethacin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA.). Sulprostone, fluprostenol, prostaglandin E₂ (PGE₂), prostacyclin (PGI₂) and prostaglandin D₂ (PGD₂) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA.). [1S-[1 α , 2 α (Z),3 α , α]]7[3[[2[(Phnylamino)carbonyl]hydrazine]methyl]-7-oxabicyclo[2,2,1]-hept-2-yl]-5-heptenoic acid (SQ29548) and 4-imidazolidine-heptenoic acid (BW245C) were obtained from Research Biochemical International (Natick, MA, USA.). Prostaglandin E₁ (PGE₁)- α -cyclodextrin was provided by Schwarz-- Pharma. Butaprost methyl ester was a gift from Bayer PLC and cicaprost was a gift from Schering AG.

Prostanoid derivatives were dissolved at 10 mM concentration in ethanol. Dilutions were made in distilled water at the time of the experiments. Ethanol diluted as for prostanoid curves, was used for the vehicle curves. PGE1- α CD and non-prostanoid drugs were dissolved in distilled water. Indomethacin was dissolved in 1.5 mM NaCO₃.

Data analysis

Contractile effects produced by drugs are expressed as percentage of contraction elicited by KPSS. Relaxation responses are expressed as percentage of total relaxation (loss in tone) induced by addition of 0.1 mM papaverine HCl to the chambers at the end of the experiments. All data are expressed as mean \pm s.e. Complete concentration-response curves were obtained and compared by a two-factor analysis of variance (ANOVA) statistical test using Stat-View software for Apple computers. Statistical analysis of tissue cyclic nucleotide levels was performed by one-factor ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post hoc test using GraphPad InStat software. Individual EC50 values were graphically calculated with the Cricket Graph software by plotting the individual concentration-response curve and interpolating the concentration value corresponding to the 50% of the maximum effect induced by the

compound. The values obtained were grouped and expressed as mean \pm s.c.

The pA₂ values for SQ29548 to antagonize U46619 - induced contractions were estimated by applying the following equation (Lydford et al., 1996):

$$PA_2 = \log(r - 1) - \log[SQ29548]$$

Where r is the ratio EC50 for U46619 in the presence of SQ29548 / Ec50 for U46619 in the control curve in the same preparation (paired curve data). The concentration of SQ29548 was 2×10^{-8} M

Results

Effect of endogenous production of prostanoids induced by arachidonic acid on trabecular smooth muscle tone.

One-hundred μ M arachidonic acid (AA) added to phenylephrine-contracted strips of human trabecular tissue caused modest relaxations, which were inhibited in tissues previously treated with the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (10 μ M) and markedly enhanced in tissues treated with the TP receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μ M) (Figure 1).

Fig. 1 – Effects of the treatment with indomethacine (10 μ M) or SQ29548 (0.02 μ M) on loss in tone induced by the addition of arachidonic acid (AA: 100 μ M) in human trabecular smooth muscle strips contracted with phenylephrine. Data are expressed as mean \pm s.e. mean of the percentage of total relaxation induced by 0,1 mM papaverine. *n* indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments. *** indicates $P < 0,005$ vs control responses by a two-factors ANOVA test.

Prostanoid - induced contractions of human penile smooth muscle

Contractions in response to agonists for TP, FP, EP₁ and EP₃ receptors were evaluated in human corpus cavernosum strips and penile resistance arteries.

The thromboxane analogue, U46619 (0.01 nM – 3 μ M), produced potent contractile responses of human trabecular smooth muscle (EC_{50} 8.3 \pm 2.8 nM). PGF₂ α (1 nM – 100 μ M), the endogenous agonist of FP receptors, induced contractions of human trabecular tissue with a maximal

response (108.4 \pm 37.7 % of KPSS) not significantly different from that elicited by U46619 (128.2 \pm 12.5 %), but the concentrations required were markedly higher (EC_{50} 6460 \pm 3220 nM). The specific synthetic agonist for FP receptors, fluprostenol (1nM – 100 μ M) was even less potent than PGF₂ α in causing contractions of human trabecular smooth muscle (EC_{50} 29540 \pm 14040 nM). Moreover, the EP₁ and EP₃ receptor agonist, sulprostone (1 nM - 100 μ M), failed to contract trabecular smooth muscle (Figure 2)

Fig. 2 – Contractile responses induced by the thromboxane analogue, U46619, by prostaglandin F₂ α (PGF₂ α), by FP receptor agonist, fluprostenol, and by agonist EP₁ and EP₃ receptors, sulprostone, in human trabecular smooth muscle strips. Data are expressed as mean \pm s.e. mean of the percentage of contraction induced by 125 mM K⁺ (KPSS). *N* indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments.

The TP-receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μ M), did not modify basal tone, but shifted to the right the concentration - response curves to U46619 in human corpus cavernosum (EC_{50} 115.2 \pm 39.9 nM), without change of the maximal response (Figure 3A). The pA2 value estimated for SQ29548 in human corpus cavernosum was 9,0 \pm 0,1. In addition, TP receptor blockade with SQ29548 (0.02 μ M) significantly inhibited the contractile responses to PGF2 α and fluprostenol (Figure 3B, 3C).

Fig. 3 – Effects of the treatment with the TP receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μ M), on the contractile responses elicited by the thromboxane analogue, U46619 (A), by the prostaglandin F2 α (PGF2 α) (B) and by the FP receptor agonist, fluprostenol (C), in human trabecular smooth muscle strips. Data are expressed as mean \pm s.e. mean of the percentage of maximum contraction obtained in absence of SQ29548. *n* indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments. ***Indicates $P < 0,005$ vs control responses by a two-factors ANOVA test.

Prostanoid-induced contractions in human penile resistance arteries were very similar to those observed in trabecular tissue. U46619 (0.01 nM-10 μ M) evoked potent contractile responses of penile arteries (EC_{50} 6.2 \pm 2.2 nM) while, among the other tested agonists, only PGF2 α (0.1 nM to 100 μ M) produced appreciable contractions, but requiring high concentrations (EC_{50} 8900 \pm 6700 nM) (Figure 4).

Fig 4 – Contractile responses induced by the thromboxane analogue, U46619, by prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), by FP receptor agonist, fluprostenol, and by the agonist for EP1 and EP3 receptors, sulprostone, in human penile resistance arteries. Data are expressed as mean±s.e. mean of the percentage of contraction induced by 125 mM K⁺ (KPSS). n indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments.

The TP receptor antagonist, SQ29548 (0.02 μM) did not alter basal tone, but as observed in cavernosal tissue inhibited, in a competitive manner, the contractile responses to U46619 (245.9±85.9 nM) in human penile arteries (Figure 5 A). The contractions elicited by PGF_{2α} were significantly reduced by the treatment of penile arteries with SQ29548 (0.02 μM) (Figure 5 B).

Fig. 5 – Effects of the treatment with the TP receptor antagonist, SQ29548 (0,02 μM), on the contractile responses elicited by the thromboxane analogue, U46619 (A) and by prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (B) in human penile resistance arteries. Data are expressed as mean±s.e. mean of the percentage of maximum contraction obtained in absence of SQ29548. N indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments. *** indicates P<0,005 vs control responses by a two-factors ANOVA test.

Relaxant response elicited by prostaglandins in human penile smooth muscle

On phenylephrine – contracted human corpus cavernosum strips, administration of the endogenous agonists of DP and IP-receptors, PGD₂ (1 nM – 10 μM), respectively, did not induce significant relaxant responses and provoked weak contractions at high concentrations. In contrast, the EP-receptor agonist, PGE₂ (1 nM – 3 μM) and PGE₁ (1 nM – 3 μM) and the EP₂ / EP₄ subtype receptor agonist, butaprost (1 nM – 100 μM) induced consistent relaxations of trabecular smooth muscle with the potency order of PGE₂ > PGE₁ >> butaprost (EC₅₀ 16.3±3.8, 93.8±31.5 and 1820±1284 nM, respectively) (Figure 6).

Fig. 6 – Responses elicited by vehicle, prostaglandin D₂, prostaglandin E₁ (PGE₁), prostaglandin E₂ (PGE₂) and the selective EP₂ receptor agonist, butaprost, on human trabecular smooth muscle strips contracted with phenylephrine. Data are expressed as mean±s.e. mean of the percentage of total relaxation induced by 0,1 mM papaverine. n indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments.

In human penile resistance arteries, in contrast to corpus cavernosum strips, PGI₂ (1nM – 10 μM) as well as PGE₁ (1 nM to 10 μM) produced consistent relaxant responses, being the potency order PGI₂ > PGE₁ (EC₅₀ 60.1±18.4 and 109.0±30.9 nM, respectively). PGD₂ (1nM to 1μM) exerted a dual effect on contracted human penile arteries, inducing relaxations comparable to those obtained with PGE₁ at concentrations lower than 0.3 μM and producing an increase in contractile tone at higher concentrations (Figure 7A). When relaxations to more selective agonists of IP, EP₂ / EP₄ and DP receptors, cicaprost (1 nM – 10μM), butaprost (1 nM – 100 μM) and BW245C (1nM – 10 μM), respectively, were tested, cicaprost and butaprost induced consistent relaxations, although cicaprost was several orders of magnitude more potent than butaprost (EC₅₀ 25.2 ± 15.2 and 7050 ± 6020 nM, respectively). However, the selective agonist of DP receptors, BW245C, did not induce significant relaxations of human penile arteries (Figure 7 B).

Effect of PGE₁ on cyclic nucleotide levels in human corpus cavernosum tissue

Addition of PGE₁ (0.1 – 10 μM) produced a significant increase of cyclic AMP content in human corpus cavernosum tissue, which was concentration-dependent, and was statistically significant at the 1 μM and higher concentrations (Figure 8A). Nevertheless, the levels of cyclic GMP in cavernosal tissue were not affected by the treatment with PGE₁ (Figure 8B).

Figure 7 (A) – Shows the responses elicited by prostaglandin D₂ (PGD₂), prostacyclin (PGI₂) and prostaglandin E₁ (PGE₁) on human penile resistance arteries contracted with norepinephrine.

(B) shows the relaxations induced by the vehicle, by the selective DP receptor agonist, BW245C, by the selective IP receptor agonist, cicaprost and the selective EP₂ receptor agonist, butaprost, on human penile resistance arteries contracted with norepinephrine. Data are expressed as mean ± s.e. mean of the percentage of total relaxation induced by 0.1 mM papaverine. N indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the experiments.

DISCUSSION

The changes in tone following of arachidonic acid, which are prevented by indomethacin, show the capacity of corpus cavernosum tissue to synthesise cyclooxygenase products that affect contractility of penile smooth muscle. Arachidonic acid promotes the synthesis of relaxant prostanoids, since its addition produces a moderate relaxation of trabecular smooth muscle which is blocked by the treatment with indomethacin. However, the metabolism of arachidonic acid in this tissue also involves the generation of contractile prostanoids, as demonstrated by the significant increase of relaxations following arachidonic acid administration when the strips were treated with the TP-receptor antagonist, SQ29548. Thus, these results suggest that contractile and relaxant prostanoids are generated from arachidonic acid, producing counteracting effects on contractility.

The TP, FP, EP₁ and EP₃ are the subtypes of prostanoid receptors which have been shown to produce contraction in human smooth muscle preparations (Baxter et al., 1995; Qian et al., 1994; Senior et al., 1991; 1992). The results of the present study show that TP receptors are the prostanoid receptors which mediate contraction of human trabecular smooth muscle and penile arteries. This observation is

Fig. 8 – Cyclic AMP (A) and cyclic GMP (B) tissue content of human corpus cavernosum after exposure to prostaglandin E₁ (PGE₁). Data are expressed as mean±s.e. mean of *pmol* cyclic AMP or cyclic GMP per mg of tissue. *n* indicates the number of patients from whom the tissues were collected for the determinations. ***P* < 0.01, ****P* < 0.005 vs control (Student-Newmann-Keuls *post hoc* test).

supported by the high potency of the selective agonist of TP receptors, U46619, to induce contractions of human corpus cavernosum strips and penile arteries, in contrast to the low potency of FP agonist, PGF₂ α and fluprostenol (Coleman, 1987) and the lack of response to sulprostone, an agonist of EP₁ and EP₃ receptors (Bunce et al., 1990). The EC₅₀ values obtained for U46619 in human penile smooth muscle are in the same range as those obtained by other authors in preparations with functional TP receptors, including rat aorta (6.8 nM) (Kromer & Tippins, 1998), rabbit saphenous vein (9.8 nM) (Lydford et al., 1996), human bronchial smooth muscle (12 nM) (Coleman & Sheldrick, 1989) and human intrapulmonary (3.1 nM) (Jino et al., 1996) and uterine arteries (3.5 nM) (Baxter et al., 1995). In addition, although our pA₂ calculations for the antagonist of TP receptors, SQ29548, are only estimative, these are included in the range of pA₂ previously reported for this compound (Ogletree et al., 1985). The lack of functionally relevant FP receptors in our tissues is supported by the fact that in preparations having this type of receptors, including cultured cells (Griffin et al., 1998) and rabbit uterus (Chen et al., 1998), the EC₅₀ values for PGF₂ α (30.9 and 4 nM, respectively) are several orders of magnitude lower than those obtained in our study.

In addition, in those studies (Griffin et al., 1998; Chen et al., 1998) the more selective FP receptor agonist, fluprostenol, was found to be equally or more potent than PGF₂ α (4.4 and 6 nM, respectively), while it was 4 fold less potent in trabecular tissue and inactive in penile arteries. Furthermore, in preparations which bear TP but not FP receptors, PGF₂ α was 300 folds less potent than U46619 in human bronchial smooth muscle (Coleman & Sheldrick, 1989) and 743 fold less potent in human uterine artery (Baxter et al., 1995). In agreement with these findings, PGF₂ α was 778 and 1435 fold less potent than U46619 in human trabecular tissue and penile arteries, respectively. The contractions elicited by FP receptor agonists seem to be produced by their interaction with TP receptors at high concentrations, since treatment with the TP-receptor blocker, SQ29548 (Hedberg et al., 1988), significantly reduced the responses to PGF₂ α and fluprostenol.

With respect to the prostanoid receptors involved in relaxation of human penile smooth muscle it is necessary to distinguish between trabecular and arterial tissues. The type of prostanoid receptor that induces relaxation of human trabecular smooth muscle is the EP receptor, as supported by the consistent relaxations elicited by the prostaglandins of the E

series, PGE₂ and PGE₁ as well as by weak but selective EP₂ / EP₄ receptor subtype agonist, butaprost (Gardiner, 1986). The potency of this agonist is more than one order of magnitude lower than PGE₂ but this low potency of butaprost at EP₂ receptors is commonly observed (Coleman et al., 1994; Regan et al., 1994). In studies with cells expressing different prostanoid receptors from various animal species, butaprost only binds to EP₂ subtype presenting no activity on the closely related subtype EP₄ (Kiryama et al., 1997; Castleberry et al., 2001; Jensen et al., 2001). However, butaprost methyl ester did not show activity between EP₂ and EP₄ human recombinant receptors (Abramovitz et al., 2000). Furthermore, the treatment of human cavernosal tissue with PGE₁ caused a concentration-dependent increase of cyclic AMP tissue levels, whereas the cyclic GMP levels remained unchanged. This fact agrees with the interaction of PGE₁ with an EP₂ receptor, which is known to be associated to a Gs-adenylate cyclase pathway (Coleman et al., 1994). Nevertheless, this fact also does not preclude the existence of EP₄ receptors which are also coupled to Gs proteins. Thus, we cannot firmly conclude that EP₂ is the only prostanoid receptor mediating relaxation of trabecular tissue, as EP₄ may be also present.

However, in support of a predominant functional role of EP₂ receptors is the observation that smooth muscle preparations with functional EP₄ subtypes usually yield EC₅₀ values to PGE₂ below 1 nM (Lydford et al., 1996; Coleman et al., 1994), while the values obtained in human trabecular tissue are notably higher and closer to those described in preparations expressing EP₂ receptors. The existence of DP and IP receptors, which have shown relaxant properties in other tissues (Baxter et al., 1995; Senior et al., 1992), can be excluded since PGD₂ and PGI₂ failed to produce significant relaxation of human trabecular smooth muscle. The activation of TP receptors was responsible for contractile effects at high concentrations of PGD₂ and PGI₂ while the blockade of these receptors (TP receptors) did not influence the relaxation of human trabecular smooth muscle produced by PGE₁, as confirmed by experiments with SQ29548 (data not shown).

In human penile arteries, PGI₂ was the relaxant agent with the highest potency, although PGE₁ produced consistent relaxations too, with an EC₅₀ similar to that obtained in trabecular smooth muscle. The presence of IP receptors is confirmed by the potent relaxant effect elicited in penile arteries by cicaprost, a selective agonist of these receptors (Sturzbecher et al.,

1986). The relaxation effects of PGI₂ suggesting the presence of IP receptors, has already been described in large penile arteries (Hedlund & Andersson, 1985). Our findings show that IP receptors are also present in small resistance penile arteries. The EC₅₀ values for PGI₂ obtained in our preparations are slightly higher than those observed in other human arterial preparations (15nM; 12.7 nM) (Hadhazy et al., 1986; Baxter et al., 1995), but within the same order of magnitude. PGE₁ can interact with IP receptors (Dutta-Roy & Sinha, 1987) which could explain the relaxation of human penile resistance arteries induced by this molecule. However, the relaxation exerted by butaprost suggest the coexistence of IP and EP receptors (EP₂ and / or EP₄) in arterial penile smooth muscle. Although PGD₂ produced modest relaxation of penile arteries, the lack of response to BW245C, a selective agonist of DP receptors (Whittle et al., 1983) indicates the absence of this type of receptors in arterial smooth muscle. Thus, the relaxant effect of PGD₂ could be attributed to this interaction with other receptors. While PGD₂ does not seem to interact with IP receptors (Siegl et al., 1979; Dutta-Roy & Sinha, 1987), it has been proposed to induce relaxation of rabbit jugular vein induced by way of EP₂ receptors (Giles et al., 1989).

The lack of relaxation effect of BW245C, that can interact with EP receptors (Giles et al., 1989), could be explained by the relatively higher affinity of this compound for EP₄ receptors (Wright et al., 1998; Davis & Sharif, 2000). This would suggest that penile arteries have predominantly functional EP₂ rather than EP₄ receptors.

In conclusion, endogenous and exogenous prostanoids regulate penile smooth muscle contractility via specific receptors. EP-receptors (EP₂ and / or EP₄) in penile arteries mediate relaxation of human penile smooth muscle, being the TP receptors responsible for prostanoid-induced contraction of penile smooth muscle (arterial and trabecular). The possible clinical relevance of these findings relies on the generation of new therapeutic targets which could enhance the action of relaxant prostanoids and / or block TP receptor activation, mainly in diseases where an excessive activity of these receptors could exist.

We thank Victoria Martinez and Maite Guerrcabeitia for their technical assistance. We also thank Dr. Gardiner for kindly providing butaprost. This work was partially supported by a grant from Schwarz-Pharma

References

Abramovitz M., Adam M., Boie Y., Carriere., DENIS D., Denis D., Godbout C., Lamontagne S., Rochette C., Sawyer N., Trembley N. M., Belley M., Gallant M., Dufresne C., Gareau Y., Ruel R., Juteau H., Labelle M., Ouimet N., & Metters K. M. – The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins are related analogs. *Biochem. Biophys. Acta*, **1483**, 285-293, 2000.

Azadzi K. M., Kim N., Brown M. L., Goldstein I., Cohen R. A. & Saenz de Tejada I. – Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.*, **147**, 220-225, 1992.

Baxter G. S., Clayton J. K., Coleman R. A., Marshall K., Sangha R. & Senoir J. – Characterization of the prostanoid receptors mediating constriction and relaxation of human isolated uterine artery. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 1692-1696, 1995.

Bunce K. T., Clayton N. M., Coleman R. A., Collington E. W., Finch H., Humphrey P. P. A., Reeves J. J., Sheldrick R. L. & Stables R. – GR63799: a novel prostanoid with selectivity for EP3 receptors. *Adv. Prostaglandin Leukotriene Res.*, **21**, 379-382, 1990.

Castleberry T. A., Lu B., Smock S. L., & Owen T. A. – Molecular cloning and functional characterization of the canine prostaglandin E2 receptor EP4 subtype. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **65**, 167-187, 2001.

Chen J., Woodward D. F., Yuan Y. D., Marshall K. & Senior J. – Prostanoid-induced contraction of the rabbit isolated uterus is mediated by FP receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **55**:387-394, 1998.

Coleman R. A. – Methods in prostaglandin receptor classification. In *Prostaglandins and Related Substances: A practical approach*. Ed. Benedetto C, McDonald-Gibson RG. Nigam S. & Slater TF., 267-303, 1987, Oxford UK.: IRL Press.

Coleman R. A. – Methods in prostaglandin receptor classification. In *Prostaglandins and Related Substances*: 267-303, 1987.

Coleman R. A., Grix S. P., Head S. A., Louttit J. B., Mallett A. & Sheldrick R. L. – A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, **47**:151-168, 1994.

Coleman R. A. & Sheldrick R. L. – Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **96**:688-692, 1989.

Coleman R. A., Smith W. L. & Narumiya S. – VIII International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol., Rev.*, **46**: 205-229, 1994.

Daley J. T., Brown M. L., Watkins M. T., Traish A. M., Huang Y-H., Moreland R. B. & Saenz de Tejada I. – Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I. Regulation by oxygen tension. *J. Urol.*, **155**:1482-1487, 1996.

Davi G., Gresele P., Violi F., Basili S., Catalano M., Giammarresi C., Volpato R., Nenci G. G., Ciabattini G. & Patrono C. – Diabetes mellitus, hypercholesterolemia and hypertension

but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation*, **96**: 69-75, 1997.

Davis T. L. & Sharif N. A. – Pharmacological characterization of [3H]-prostaglandin E2 binding to the cloned human EP4 prostanoid receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **130**:1919-1926, 2000.

Dutta-Roy A. K. & Sinha A. K. – Purification and properties of prostaglandin E1 / prostacyclin receptor of human blood platelets. *J. Biol., Chem.*, **262**:12685-12691, 1987.

Gardiner P. J. – Characterization of prostanoid relaxant / inhibitory (IP) receptors using a highly selective agonist TR4979. *Br. J. Pharmacol.*, **87**:45-56, 1986.

Giles H., Leff P., Bolofo M. L., Kelly M. G. & Robertson A. D. – The classification of prostaglandin DP-receptors in platelets and vasculature using BWA868C, a novel selective and potent competitive antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 291-300, 1989.

Griffin B. W., Magnino P. E., Pang I-H & Sharif N. A. – Pharmacological characterization of a FP prostaglandin receptor on rat vascular smooth muscle cells (A7r5) coupled to phosphoinositide turnover and intracellular calcium mobilization. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, **286**:411-418, 1998.

Hadhazy P., Nagy L., Domotor L. & Magyar K. – effects of indomethacin, prostaglandins E2 and I2 on the tone of human isolated femoral arteries. *Eur. J. Clin. Invest.*, **16**:248-251, 1986.

Hattori Y., Kawasaki H. & Kanno M. – Increased contractile responses to endothelin-1 and U46619 via a protein kinase C-mediated nifedipine-sensitive pathway in diabetic rat aorta. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **104**:73-80, 1999.

Hedberg A., Hall S. E., Ogletree M. L., Harris D. N. & Liu E. C-K – Characterization of [5,6-3H] SQ29548 as a high affinity radioligand binding to thromboxane A2 / Prostaglandin H2-receptors in human platelets. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, **245**:786-792, 1988.

Hedlund H & Andersson K-E – Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J. Urol.*, **134**:1245-1250, 1985.

Jensen B. L., Stubbe J., Hansen P. B., Andreasen D. & Skott O. – Localization of prostaglandin E2 – EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **280**:F1001-F1009, 2001.

Jeremy J. Y., Morgan R. J., Mikhailidis D. P. & Dandona P. – Prostacyclin synthesis by the corpora cavernosa of the human penis: evidence for muscarinic control and pathological implications. *Prostaglandins Leukot. Med.*, **23**: 211-216, 1986.

Jino H., Kurahashi K., Usui H., Nakata Y., Shimizu Y. & Temma S. – Pharmacological nature of TP receptor mediated contraction in human intrapulmonary artery. *Life Sci.*, **59**: 2059-2065, 1996.

Kim N., Azadzi K. M., Goldstein I. & Saenz de Tejada I. – A nitric oxide-like factor mediates nosadrenergic non cholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, **88**:112-118, 1991.

Kiriyama M., Ushikubi F., Kobayashi T., Hirata M., Sugimoto Y. & Narumiya S. – Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br. J. Pharmacol.*, **122**:217-224, 1997.

Koltai M. Z., Rosen P., Ballagi-Pordany G., Hadhazy P. & Pogatsa G. – Increased vasoconstrictor response to noradrenaline in femoral vascular bed of diabetic dogs. Is thromboxane A2 involved? *Cardiovasc. Pharmacol.*, **32**: 471-478, 1990.

Lydford S. J., Mckechnie K. C. W. & Dougall I. G. – Pharmacological studies on prostanoid receptors in the rabbit isolated saphenous vein: a comparison with the rabbit isolated ear artery. *Br. J. Pharmacol.*, **117**:13-20, 1996.

McCarty M. F. – A central role for protein kinase C overactivity in diabetic glomerulosclerosis: implications for prevention with antioxidants, fish oil and ACE inhibitors. *Med. Hypotheses*, **50**:155-165, 1998.

Moreland R. B., albadawi H., Bratton C., Patton G., Goldstein I., traish A. & Watkins M. T. – O₂ dependent prostanoid synthesis activates PGE receptors on corpus cavernosum smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**:H552-H558, 2001.

Mulvany M. J. & Halpern W. – Contractile properties of small resistance arteries in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.*, **41**:19-26, 1977.

Ogletree M. L., Harris D. N., Greenberg R., Haslanger M. F. & Nakane M. – Pharmacological actions of SQ29548, a novel selective thromboxane antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **234**: 435-441, 1985.

Porst H. – The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience. *J. Urol.*, **155**: 802-815, 1996.

Regan J. W., Baley T. J., Pepperi D. J., Pierce K. L., Bogardus A. M., Donello J. E., Fairbairn C. E., Kedzie K. M., Woodward D. F. & Gil D. W. – Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol. Pharmacol.*, **46**: 213-220, 1994.

Qian Y-M., Jones R. L., Chian K-M., Stock A. I. & Ho J. K. S. – Potent contractile actions of prostanoid EP3-receptor agonists on human isolated pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 369-374, 1994.

Saenz de Tejada I., Moroukian P., tessier J., Kim J. J., Goldstein I. & Frohrib D. – Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis: Studies on a rabbit model. *Am. J. Physiol.*, **260**:H1590-H1595, 1991.

Senior J., Marshall K., Sangha R., Baxter G. S. & Clayton J. K. – In vitro characterization of prostanoid receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 747-753, 1991.

Senior J., Sangha R., Baxter G. S., Marshall K., & Clayton J. K. – In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:215-221, 1992.

Siegl A. M., Smith J. B. & Silver M. J. – Specific binding sites for prostaglandin D2 on human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**: 291-296, 1979.

Simonsen U., Prieto D., Delgado J. A., Hernandez M., Resel L., Saenz de Tejada I. & Garcia-Sacristan A. – Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin Sci.*, **92**:269-275, 1997.

Sturzbecher C. S. T., Haberey M., Muller B., Schillinger E., Schorder G., Skuballa W., Stock G., Vorbruggen H. & Witt W. – Pharmacological profile of a novel carbacyclin derivate with high metabolic stability and oral activity in the rat. *Prostaglandins*, **43**:559-566, 1986.

Whittle B. J. R., Moncada S., Mullane K. & Vane J. R. – Platelet and cardiovascular activity of hydantoin BW245C, a potent prostaglandin analogue. *Prostaglandins*, **25**:205-223, 1983.

Wright D. H., Metters K. M., Abramovitz M. & Fordhutchinson A. W. – Characterization of the recombinant human prostanoid DP-receptor and identification of L-644, 698, a novel selective DP agonist. *Br. J. Pharmacol.*, **123**:1317-1324, 1998.

LA DIABETES ALTERA LA REGULACION QUE EJERCEN LOS RECEPTORES DE PROSTANOIDES SOBRE EL TONO DEL MUSCULO LISO DEL PENE HUMANO

Angulo Frutos, J; Cuevas Sanchez, P; **La Fuente Carvalho**, J; Rolo, F; Rodriguez Vela, L; Gabancho Iglesias, S; Fernandez Ayerdi, A; * Ney, P; Saenz de Tejada Gorman, I.

Fundación para la Investigación y el Desarrollo en Andrología, Dept Investigación, Hospital Ramon y Cajal, Madrid. * Corporate Development, Schwarz-Pharma, Monheim, Alemania.

INTRODUCCION: Los objetivos del presente estudio fueron caracterizar los receptores de prostanoïdes implicados en la regulación del tono del musculo liso trabecular y arterial del pene humano; determinar la existencia de un antagonismo funcional entre los receptores que median contracción y relajación del musculo liso trabecular y evaluar la influencia de la diabetes sobre este balance entre acciones contractiles y relajantes.

RESULTADOS: Los receptores TP son responsables de la contracción de las tiras de cuerpo cavernoso humano (TCCH) y de las arterias peneanas de resistencia (APRH), ya que el agonista de estos receptores, U-46619, contaió potentemente las TCCH (EC_{50} $8,3\pm 2,8$ nM) y las ARPH (EC_{50} $6,2\pm 2,2$ nM) y las debiles contracciones producidas por la $PGF_{2\alpha}$ (EC_{50} 6460 ± 3220 nM en TCCH y 8900 ± 6700 nM en APRH) fueron inhibidas por el antagonista selectivo de los receptores TP, SQ29548 (0.02 μ M). Los receptores EP_2 son los responsables de los efectos relajantes producidos por los prostanoïdes sobre TCCH, porque tan sólo PGE_1 (EC_{50} $16,3\pm 3,8$ nM), PGE_2 (EC_{50} $93,8\pm 31,5$ nM) y el agonista selectivo de los receptores EP_2 , butaprost (EC_{50} 1820 ± 1284 nM), produjeron la relajación consistente de este tejido. En APRH, prostaciclina (EC_{50} $60,1\pm 18,4$ nM) y PGE_1 (EC_{50} $109,0\pm 30,9$ nM), asi como el agonista de los receptores IP, cicaprost (EC_{50} $25,2\pm 15,2$ nM) y butaprost (EC_{50} 7050 ± 6020 nM) causaron relajaciones, lo que sugiere la coexistencia de los receptores IP y EP_2 en este lecho arterial. El ácido araquidónico indujo relajación de las TCCH que fue bloqueada por indometacina y potenciada por SQ29548, lo que revela una producción simultánea de prostanoïdes contráctiles y relajantes. De hecho, la preincubación con una baja concentración de U46619 (3 nM) inhibió significativamente la relajación inducida por PGE_1 sobre la TCCH. Comparada con PGE_1 la capacidad relajante de la PGE_0 , el metabolito activo de la PGE_1 , fue menor (máxima relajación $84,4\pm 2,3$ % y $61,6\pm 5,4$ % para PGE_1 y PGE_0 , respectivamente) debido a su interacción con los

receptores TP. Dicha inhibición fue significativamente mayor en los tejidos procedentes de pacientes diabéticos (máxima relajación a PGE₁ 50,9±7,7% y 71,6±5,3% en tejido diabético y no diabético, respectivamente). Esta diferencia existente entre los tejidos de pacientes diabéticos y no diabéticos desapareció tras el tratamiento con SQ29548.

CONCLUSIONES: En resumen, los receptores TP median la contracción en TCCH y APRH mientras que los efectos relajantes de los prostanoides son mediados por los receptores EP₂ en TCCH y por los receptores IP y EP₂ en APRH. La activación de los receptores TP antagoniza las acciones relajantes de los prostanoides, lo que se agudiza en diabetes, donde existe una potenciación de las acciones mediadas por los receptores TP.

Palabras clave: prostanoides, diabetes, pene humano

EL ENVEJECIMIENTO REDUCE LAS RESPUESTAS ERECTILES IN VIVO Y DETERIORA LA RELAJACIÓN DEL CUERPO CAVERNOSO EN UN MODELO DE CONEJO

Angulo Frutos, J.; Cuevas Sanchez, P.; Fernandez Ayerdi, A.; Gonzalez Corrochano, R.; Moncada Iribarre, I.; **La Fuente Carvalho**, J.; Rolo F.; Saenz de Tejada Gorman, I.

Fundación para la Investigación y el Desarrollo en Andrología. Dpto. de Investigación del Hospital Ramon y Cajal, Madrid.

INTRODUCCION: La incidencia de la disfunción eréctil se incrementa significativamente según aumenta la edad del hombre. Se ha demostrado que existe un deterioro de la función vascular asociado al envejecimiento, lo que podría estar relacionado con el desarrollo de la impotencia. Sin embargo, los mecanismos que subyacen en la disfunción eréctil asociada al envejecimiento no se conocen. Por otra parte, el óxido nítrico (NO) es un mediador fundamental de la relajación del músculo liso peniano y la erección.

OBJECTIVOS: El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto del envejecimiento sobre las respuestas eréctiles inducidas por la administración sistémica de un donador de NO y sobre la relajación del cuerpo cavernoso mediada por NO en un modelo de conejo.

MATERIAL Y METODOS: Se compararon las respuestas erectiles in vivo en conejos adultos jóvenes (5 meses) con las obtenidas en conejos viejos (>20 meses), así como las respuestas de relajación del cuerpo cavernoso de los mismos conejos determinadas en un sistema de baño de órganos.

RESULTADOS: La administración intravenosa de nitroprusiato sódico (NPS: 0,2 mg/kg) produjo respuestas eréctiles en conejos conscientes que fueron significativamente mayores en conejos jóvenes. Los estudios de baño de órganos revelaron que la relajación dependiente de endotelio en el cuerpo cavernoso de conejos viejos estaba significativamente reducida (EC_{50} $46,5 \pm 9,4$ nM vs $8,2 \pm 1,5$ nM; $p < 0,005$; E_{max} $68,0 \pm 4,5\%$ vs $82,7 \pm 3,3\%$; $p < 0,05$). Igualmente, se comprobó que existía un deterioro significativo de la relajación mediada por la estimulación de los nervios nitrérgicos en el cuerpo cavernoso de los conejos viejos (E_{max} $43,2 \pm 3,8\%$ vs $68,9 \pm 5,9\%$; $p < 0,01$).

CONCLUSIONS: Los resultados demuestran que el envejecimiento produce una reducción de las respuestas in vivo inducidas por la estimulación farmacológica de la

via del NO / GMPc. Este hecho, junto a la observación de que las relajaciones mediadas por la liberación de NO endógeno en el cuerpo cavernoso se ven deterioradas por el envejecimiento sugiere que existe un déficit funcional de la vía del NO / GMPc que podría ser responsable de la elevada incidencia de disfunción eréctil en pacientes de edad avanzada.

Consultation multidisciplinary of Andrology

Hospital Santo Antonio – Oporto

Newsletter, ESSIR, February 2002

In the last two decades an increasing number of patients have attended our Andrology Unit for erectile dysfunction (ED), defined as inability to obtain and maintain an erection sufficient to undergo vaginal penetration during the sexual act. This may be explained by the increasing awareness and to the availability of new therapeutic options largely divulged by media.

Data from the Massachusetts Male Ageing Study shows a prevalence of ED of 52% in men between 40 and 70 years old, indicating the occurrence of 300.000 new cases each year in the US. In this age group ED patients commonly have significant comorbidity, and on the hand a lot of conditions and life style aspects are risk factors for ED: alcohol abuse, psychiatric diseases (ex. Anxiety, depression, neurosis), neurologic diseases (multiple sclerosis, diabetes, spinal trauma), vascular conditions (arteriosclerosis, hypertension, hypercholesterolemia), endocrinopathys (hypogonadotropic hypogonadism), medications (neuroleptics, antihypertensors, antian-drogens, etc), penile conditions (Peyronie's disease, congenital curvature) etc. This involves a multidisciplinary approach to the andrologic patient with contribution of various specialities. For this matter we created a task group enclosing people from several specialities: Urology, Gynaecology, Radiology, Endocrinology, Vascular surgery and Sexology.

In the first visit the patient is observed by the andrologist. After the initial evaluation by medical and sexual history and physical examination, other diagnostic tests are requested if needed. The couple is given information regarding this problem and its treatment including life style changes. If necessary the patient is referred to other speciality in the Andrology Unit.

Sexologists give an invaluable support when addressing patients with psychologic related sexual dysfunction and also in evaluating some patients previous to surgery (ex: penile prothesis and curvature corrections). Endocrinologists are fundamental when treating patients with diabetes and other endocrinopathies. A close relation to nephrologists is also important in patients with renal failure or kidney allografts. Dialogue with neurologists is important mainly when ED is related to drugs acting in CNS and when initiating dopamine agonists. Vascular Surgeons are responsible for ecodoppler, selective angiography and for surgery in iliaco-pudendal territory. Cavernosometry is performed in radiology department. The recent inclusion of

gynaecology in this group is related to the increasing awareness of female sexual dysfunction.

Every month is carried out an interdisciplinary meeting where all these specialities get together to discuss case problems. These meetings are extremely important because all aspects of the patient can be discussed.

The Andrology Unit has an operating room for ambulatory surgery, one day per week. Most surgeries like circumcisions and Nesbit procedures are performed in this theatre.

Trained nurse staff is also very important, mainly when intracavernous therapy is needed. They give carefully information on handling the product and possible complications. This has diminished treatment drop-outs and complications.

Future prospects in the treatment of ED seem promising and also challenging. Pharmaco therapy is getting an increasing role in treatment, and patients tend to be classified as pharmaco-sensitive or pharmaco-resistant. Only the more complex cases tend to be referred to the andrologist, those with difficult diagnose and pharmaco-resistant possibly requiring surgery.

BIBLIOGRAFIA

Abraham M. G. and Padma-Nathan H. – The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton *J. Urol.*, **144**:1144-1146; 1990.

Aboseif S., Riemer K., Stackl W., Lue T. and Tanagho E. – Quantification of prostaglandin E₁ receptors in the cavernosous tissue of human, primates and dogs. *Urol. Int.*, **50**:148-152; 1993.

Aboseif S., Shinohara K., Buza J., Bernard F., Narayan P. – Role of penile vascular injury in erectile dysfunction after radical prostatectomy. *Br. J. Urol.*, **73**:75-82, 1994.

Abramovitz M., Adam M., Boie Y., Carriere M., Denis D., Godbout C., Lamontagne S., Rochette C., Sawyer N., Tremblay N.M., Belley M., Gallant M., Dufresne C., Gareau Y., Ruel R., Juteau H., Labelle M., Ouimet N. and Metters K.M. – The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1483**:285-293, 2000.

Adaikan P., Kottegoda R. and Ratnam S. – A possible role for prostaglandin E₁ in human penile erection. In: abstract Book Second World Meeting on Impotence. Prague, **6**, 1986.

Ahlquist R. P. – A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, **153**:586-600, 1946.

Alheid U., Frolich J. C. and Forstermann U. – Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb. Res.*, **47**:561-571, 1987.

Ahlenius S. and Larsson K. – Effects of selective dopamine D1 and D2 antagonists on male rat sexual behavior. *Experientia*, **46**:1026-1028, 1990.

- Ahlenius S. and Larsson K. – Specific involvement of central 5-HT_{1A} receptors in the mediation of male rat ejaculatory behavior. *Neurochem. Res.*, **22**:1065-1070, 1997.

Ahlenius S., Larsson K. and Arvidsson L. E. – Effects of atersoselective 5-HT_{1A} agonists on male rat sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **33**:691-695, 1989.

Ahlenius S., Larsson K. and Fernandez-Guasti A. – Evidence for the involvement of central 5-HT_{1A} receptors in the mediation of lordosis behavior in the female rat.

Psychopharmacol., **98**:440-444, 1989.

Allen R. P., Smolev J. K., Engel R. M. and Charles B. B. – Comparison of rigiscan and formal nocturnal penile tumescence testing in the evaluation of erectile rigidity. *J. Urol.*, **149**:1265-1268, 1993.

Althof S. E. - Quality of life and erectile dysfunction. *Urology*, **59**:803-810, 2002.

Andersson K.-E. – The effect of sildenafil on apomorphine-evoked increases in intracavernous pressure in the awake rat. *J. Urol.*, **161**:1707-1712; 1999.

Andersson K.-E. and Holmquist F. - Mechanism for contraction and relaxation of penile smooth muscle human. *Int. J. Imp. Res.*, **2**:209, 1990.

Andersson K.-E. and Wagner G. – Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.*, **75**:191-236; 1995.

Andersson K.-E., Gemalmaz H., Waldeck K., Chapman T. N., Tuttle J. B. and Steers W. D. - The effect of sildenafil on apomorphine-evoked increases in intracavernous pressure in the awake rat. *J. Urol.*, **161**:1707-1712, 1999.

Andersen N. H., Eggerman T. L., Harker L. A., Wilson C. H. and De B. – On the multiplicity of platelet prostaglandin receptors. Evaluation of competitive antagonism by aggregometry. *Prostaglandins*, **19**:711-734, 1980.

Argiolas A. – Neuropeptides and sexual behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **23**:1127-1142, 1999.

Argiolas A. – Nitric oxide is a central mediator of penile erection. *Neuropharmacology*, **33**:1339-1334, 1994.

Argiolas A. – Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site and mechanism of action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **652**:194-203, 1992.

Argiolas A., Melis M. R. – Neuromodulation of penile erection: an overview of the role of neurotransmitters and neuropeptides. *Prog. Neurobiol.*, **47**:235-255, 1995.

Argiolas A., Melis M. R., Murgia S. and Schiöth H. B. – ACTH- and alpha-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain Res. Bull.*, **51**:425-431, 2000.

Argiolas A., Melis M. and Stancampiano R. – Role of oxytocinergic pathways in

the expression of penile erection. *Regul. Pept.*; **45**:139-142; 1993.

Arrondo - Arrondo J. – Tratamiento de la disfunción eréctil con fármacos vasoactivos. Estudio multicéntrico. *Ponencia VII Congreso Nacional de Andrología*, 1997.

Assreuy J., Cunha F. Q., Liew F. Y. and Moncada S. – Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **108**:833-837, 1993.

Astin M. and Stjernschantz J. – Mechanism of prostaglandin E₂, F_{2α} and latanoprost acid-induced relaxation of submental veins. *Eur. J. Pharmacol.*; **340**:195-201, 1997.

Azadzoï K. M., Goldstein I. – Erectile dysfunction due to atherosclerose vascular disease; the development of an animal model. **147**:1675-1681, 1992.

Azadzoï K. M., Kim N., Brown M. L., Goldstein I., Cohen R. A. and Saenz de Tejada I. – Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.*, **147**:220-225, 1992.

Azadzoï K. M., Goldstein I., Siroky M. B., Traish A. M., Krane R. J., Saenz de Tejada I. – Mechanisms of ischemia induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction. *J. Urol.*, **160**:2216-2222, 1998.

Azadzoï K. M., Krane R. J., Saenz de Tejada I., Goldstein I. and Siroky M. B. – Relative roles of cyclooxygenase and nitric oxide synthase pathways in ischemia-induced increased contraction of cavernosal smooth muscle. *J. Urol.*, **161**:1324-1328, 1999.

Azadzoï K. M., Goldstein I., Siroky M. B., Traish A. M., Krane R. J. and Saenz de Tejada I. – Mechanisms of ischemia-induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction. *J. Urol.*, **160**:2216-2222, 1998.

Azadzoï K. M., Park K., Andry C., Goldstein I. and Siroky M. B. – Relationship between cavernosal ischemia and corporal veno-occlusive dysfunction in an animal model. *J. Urol.*, **157**:1011-1017, 1997.

Azadzoï K. M. and Saenz de Tejada I. – Diabetes mellitus impairs neurogenic and endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J.*

Urol., **148**:1587-1591.

Azadzoi K. M. and Saenz de Tejada I. – Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J. Urol.*, **146**:238-240, 1991.

Azadzoi K. M., Siroky M. B. and Goldstein I. – Study of etiologic relationship of arterial atherosclerosis to corporal veno-occlusive dysfunction in the rabbit. *J. Urol.*, **155**:1795-1800, 1996.

Azadzoi K. M., Vlachiotis J., Pontari M. and Siroky M. B. – Hemodynamics of penile erection: Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. *J. Urol.*, **153**:521-524, 1995.

Bahnsen R. R. and Catalona W. J. – Papaverine testing of impotent patients following nerve-sparing radical prostatectomy. *J. Urol.*, **139**:773-774, 1988

Bagdy G., Kalogeras K. and Szemerédi K. - Effect of 5-HT_{1C} and 5-HT_{2C} receptor stimulation on excessive grooming, penile erection and plasma oxytocin concentrations. *Eur. J. Pharmacol.*, **229**: 9-14, 1992.

Ballard S. A., Gingeli C. J., Tang K., Turner L. A., Price M. A. and Naylor A. M. - Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *J. Urol.*, **159**:2164-2171, 1998.

Baxter G., Clayton J., Coleman R., Marshall K., Sangha R., Senior J. - Characterization of the prostanoid receptors mediating constriction and relaxation of human isolated uterine artery. *Br. J. Pharmacol.*, **116**:1692-1696, 1995.

Bauer P. M., Fukuto J. M., Buga G. M., Pegg A. E. and Ignarro L. J. – Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res. Commun.*, **262**:35-358, 1999.

Beavo J. A., Conti M. and Heasley R. - Multiple cycle nucleotide phosphodiesterases. *Mol. Pharm.*; **46**:399-405, 1994.

Beavo J. A. - Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, **75**:725-748, 1995.

Behrman H. R., Luborsky J. L., Aten R. F., Polan M. L., Tarlatzis B., Haseltine F. P., Preston S. L., Soodak L. K., Mattson G. F. and Chi A. S. – Luteolytic hormones are

calcium-mediated guanine nucleotide antagonists of gonadotrophin-sensitive adenylate cyclase. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **15**:601-604, 1985.

Bemelmans B. L. H., Meuleman E. J. H., Anten B. W. M., Dosenburg W. H., Van kerrebrock P. E. V. and Debruyne Frans M. J. – Penile sensory disorders in erectile dysfunction: results of a comprehensive neuro-uropsychological diagnostic evaluation in 123 patients. *J. Urol.*, **146**:777-782, 1991.

Benet A. and Melman A. – The epidemiology of erectil dysfunction. *Urol. Clin. North Amer.*, **28**:209-216, 2001.

Benlloch F. J. R., Verdejo P. N., Ramon F. J. C., Mesenguer J. F. B., Campos M. R. y Orts J. Z. – Impacto de la creación de las Unidades de Andrologia en el tratamiento por inyecciones intracavernosas de la disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.*, **52**:257-261, 1999.

Berenbaum M. C. - What is synergy?. *Pharmacol. Rev.*, **41**:93-141, 1989.

Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B. and Sjövall I. – Prostaglandins and related factors. The structures of prostaglandin E₁, F₁ – alpha and F₁ – beta. *J. Biol. Chem.*, **238**:3555, 1963.

Berkenboom G., Fontaine J. and Degre S. – Alterations of beta-adrenoceptor mediated relaxations of atherosclerotic human coronary arteries. *Eur. Heart J.*, **10**:92-96, 1989.

Berkenboom G., Fontaine J. and Degre S. – Persistence of the response to SIN 1 on isolated coronary arteries rendered tolerant to nitroglycerin in vitro or in vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **12**:345-349, 1988.

Berkenboom G., Unger P. and Fontaine J. – Atherosclerosis and responses of human isolated coronary arteries to endothelium-dependent and –independent vasodilatadors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**:S35-S39, 1989.

Bernard Fallon - Intracavernous injection therapy for male erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.*, **22**:833-845, 1995.

Bertram G. Katzung – Kinins. *Basic & Clinical Pharmacol.*, 298-301, 2001.

Birrell G. J. and McQueen D. S. – The effects of capsaicin, bradykinin, PGE₁ and cicaprost on the discharge of articular sensory receptors in utero. *Brain Res.*, **611**:103-107, 1993.

Bivalacqua T., Champion H., Hellstrom W. and Kadowitz P. – Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**:484-488, 2000.

Bivalacqua T. J., Champion H. C., Mehta Y. S., Abdel-Mageed A. B., Sikka S. C., Ignarro L. J., Kadowitz P. J. and Hellstrom W. J. – Adenoviral gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the penis improves age-related erectile dysfunction in the rat. *Int. J. Impot. Res.*, **12**:S8-S17, 2000.

Blanco R., Saenz de Tejada I., Goldstein I., Krane R. J., Wotiz H. H., Choen R. A. – Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II Acetylcholine synthesis. *Am. J. Physiol.*, **254**:H468-472, 1988.

Boolell M., Allen M. J., Ballard S. A., Gepi-Atee S., Miurhead G. J., Naylor A. M., Osterloh I. H. and Gingell C. - Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **8**:47-52, 1996.

Bosch R.J.H., Benard F., Aboseif S.R., Stief C.G., Lue T.F. and Tanagho E.A. – Penile detumescence: Characterization of three phases. *J. Urol.*, **146**:867-871, 1991.

Bredt D. S., Hwang P. M. and Snyder S. H. – Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, **347**; 768-770, 1990.

Buga G. M., Griscavage J. M., Rogers N. E. and Ignarro L. J. – Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.*, **73**:808-812, 1993.

Buga G. M. and Ignarro L. J. – Electrical field stimulation causes endothelium-dependent and nitric oxide-mediated relaxation of pulmonary artery. *Am. J. Physiol.*, **262**:H973-979, 1992.

Burnett Arthur L. – Nitric oxide in the penis: Physiology and pathology. *J. Urol.*, **157**:320-324, 1997.

Burnett Arthur L., Lowenstein C. J., Bredt D. S., Chang T. S. K. and Snyder S. H. – Nitric oxide: A Physiologic Mediator of Penile Erection. *Science*, **257**:401-402, 1992.

Burnett L., Tilman L., Chang S., Epstein I., Lowenstein J., Bredt S., Snyder H. and Walsh C. – Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J. Urol.*, **150**:73-76, 1993.

Burnstock G. – The past, present and future of purine nucleotides as a signalling

molecules. *Neuropharmacol.*, **6**:1127-1139, 1997.

Bunce K. T., Clayton N., Coleman R. A., Collington E., Finch H., Humphray J., Reeves J., Sheldrick R. and Stables R. – GR63799: a novel prostanoid with selectivity for EP₃ receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.*, **21**:379-382, 1990.

Bunce K. T. and Spraggs C. F. – Stimulation of chloride secretion by U46619 in guinea-pig isolated gastric mucosa is mediated by thromboxane receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **91**:319-320, 1987.

Burnett A. L. - Nitric oxide in the penis: Physiology and pathology. *J Urol.*, **157**:320-324, 1997.

Bush P. A., Aronson W. J., Buga G. M., Rajfer J. and Ignarro L. J. – Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, **147**:1650-1655, 1992.

Bush P. A., Gonzalez N. E. and Ignarro L. J. – Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys. Res. Commun*, **186**:308-314, 1992.

Butcher R. W. and Baird C. E. – Effects of prostaglandins on adenosine 3', 5' – monophosphate levels in fat and others tissues. *J. Biol. Chem.*, **243**:1713-1717, 1968.

Butcher R. W., Scott R. E. and Sutherland E. W. – The effects of prostaglandins on cyclic AMP levels in tissues. *Pharmacol.*, **9**:172-175, 1967.

Buus N. H., Simonsen U., Pilegaard H. K. and Mulvany M. J. – Nitric oxide, prostanoid and non-NO, non.prostanoid involvement in acetylcholine relaxation of isolated human small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **129**:184-192, 2000.

Buvat J. and Dehane L. - Diagnostic value of intracavernous injections of 20 µg of prostaglandin E₁ in impotence. *Int. J. Imp. Res.*, **3**:105, 199.

Buvat J., Lemaire A., Buvat-Herbaut M. and Marcolin G. - Safety of intracavernous injections using na alpha-blocking agent. *J. Urol.*, **141**:1364-1367, 1989.

Cali J., Zwaagstra J. C., Mons N, Cooper D. M., Krupinski J. – Proteins G *J. Biol. Chem.*, **269**:12190-12195, 1994.

Calver A., Collier J., Moncada S. and Vallence P. – Effect of local intra-arterial

NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J. Hypertens.*, **10**:1025-1031, 1992.

Calver A., Collier J. and Vallence P. – Nitric oxide and the control of human vascular tone in health and disease. *Eur. J. Med.*, **2**:48-53, 1993.

Cadwell A. G., Harris C. J., Stepney R. and Whitaker N. – Hydantoin prostaglandin analogues potent and selective inhibitors of platelet aggregation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, **101**:561-562, 1979.

Campos de Carvalho A. C., Roy C., Moreno A. P., Melman A., Hertzberg E. L., Christ G. J. and Spray C. – Gap junctions formed of connexin-43 are found between smooth muscle cells of human corpus cavernosum. *J. Urol.*, **149**:1568-1575, 1993.

Canning R. and Marchese R. - Prostaglandin E₁ as a topical agent for treatment of erectile dysfunction. *Int. J. Imp. Res.*, **6**:82-84, 1994.

Carlson A. and Erickson I. - Femoral-artery infusion of prostaglandin E₁ in severe peripheral vascular disease. *Lancet*, **1**:155, 1973.

Castleberry A., Lue B., Smock S. and Owen A. Molecular cloning and functional characterization of the canine prostaglandin E₂ receptor EP₄ subtype. *Prostaglandins*, **65**:167-187, 2001.

Cawello W., Scheweer H., Muller R., Bonn R. and Seyberth H. - Metabolism and pharmacokinetics of prostaglandin E₁ administered by intravenous infusion in humans subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **46**:275-277, 1994.

Chan J., Levenson S., Krane J. and Goldstein I. - Five to seven years follow - up of patients in a pharmacologic erection program: satisfaction and complications. *J. Urol.*, **147**:309, (abstract), 1992.

Chen G. – Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.*, **95**:1165-1174, 1988.

Chen J., Godschalk M. F., Katz G. and Mulligan T. - Incidence of penile pain after injection of a new formulation of prostaglandin E₁. *J. Urol.*, **154**:77-79, 1995.

Chen J. K. Hwang T. I. and Yang C. R. - Comparison of effects following the intracorporeal injection of papaverine and prostaglandin E₁. *Brit. J. Urol.*, **69**:404-407, 1992.

Chen K. K., Chan J. H. and Chang L. S. - Dopaminergic neurotransmission at the paraventricular nucleus of hypothalamus in central regulation of penile erection in the rat. *J. Urol.*, **162**:237-242, 1999.

Chen K. K., Chan S. H., Chang L. S. and Chan J. H. - Participation of paraventricular nucleus of hypothalamus in central regulation of penile erection in the rat. *J. Urol.*, **158**:238-244; 1997.

Chen J. K., Woodward D., Yuan Y., Marshall K. and Senior J. - Prostanoid-induced contraction of the rabbit isolated uterus is mediated by FP receptors. *Prostaglandins Other Lipid Medit*; **55**:387-394, 1998.

Christ G. J. – The penis as a vascular organ. The importance of corporal smooth muscle tone in the control of erection. *Urol. Clin. North Amer.*, **22**: 727-745, 1995.

Christ G. J. – Gap junctions and ion channels: relevance to erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **12**:S15-25, 2000.

Christ G. J. and Brink P. R. – Characterization of K⁺ currents in cultured human corporal smooth muscle cells. *J. Androl.*, **14**:319-328, 1993.

Christ G. J., Brink P. R., Brook S. and Ney P. – PGE₁-induced alterations in maxi-K⁺ channel activity in cultured human corporal smooth muscle cells. *J. Urol.*, **155**: 678, 1996.

Christ G. J., Lerner S. E., Kim D. C. and Melman A. – Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *J. Urol.*, **153**:1998-2003, 1995.

Christ G. J. and Melman A. - The application of gene therapy to the treatment of penile dysfunction. *Int. J. Imp. Res.*, **10**:111-112; 1998.

Christ G. and Spray C. – Gap junction-mediated intercellular diffusion of Ca²⁺ in cultured human corporal smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.*, **263**: c373, 1992.

Christ G. J., Brink P. R., Melman A. and Spray D. C. – The role of gap junctions and ion channels in the modulation of electrical and chemical signals in human corpus cavernosum smooth muscle. *Int. J. Imp. Res.*, **5**:77-96, 1993.

Colasanti M. and H. Suzuki – The dual personality of NO. *Trends Pharmacol.*, **21**:249-257, 2000.

Coleman R. A. – Studies towards a classification of prostanoid receptors. PhD Thesis. *Council for National Academic Awards*, 1983.

Coleman R. A. – Methods in prostaglandin receptor classification. In *Prostaglandins and related substances – a practical approach*. IRL Press, 267-303, 1987.

Coleman R. A., Grix S., Head S., Louttit J., Mallett A. and Sheldrick R. – A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, **47**:151-168, 1994.

Coleman R. A. and Humphrey P. A. – Prostanoid receptors: their function and classification. *Therapeutic Applications of Prostaglandins*, 15-36, 1993.

Coleman R. A., Humphrey P. A., Kennedy I., Levy G. P. and Lundley P. – Comparisons of the actions of U-46619, a stable prostaglandin H₂ analogue with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **73**:773-778, 1981.

Coleman R. A., Humphrey P. A., Kennedy I., Levy G. P. and Lundley P.: Prostanoid receptors – the development of a working classification. *Trends Pharmacol. Sci.*, **5**:303-306, 1984.

Coleman R. A., Kennedy I. and Sheldrick R. L. – Further evidence for the existence of three subtypes of PGE₂-sensitive (EP-) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **91**:407-408, 1987.

Coleman R. A. and Kennedy I. – Characterization of the prostanoid receptors mediating contraction of guinea-pig isolated trachea. *Prostaglandin*, **29**:363-375, 1985.

Coleman R. A., Kennedy I. and Sheldrick R. L. – Evidence for the existence of three subtypes of PGE₂-sensitive (EP-) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **91**:323-324, 1987.

Coleman R. A. and Sheldrick R. L. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **96**:688-692, 1989.

Coleman R. and Sheldrick R. – Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **96**: 688-692, 1989.

Coleman R., Smith W. and Narumiya S. – VII International Union of

Pharmacology. Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution and Structure of the Receptors and their subtypes. *Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.*, **46**:205-229, 1994.

Collier H. O. – Prostaglandins and opioids. *Biochem. Soc. Trans.*, **6**:722-726, 1978.

Collins J. and Thijssen A. – Experience with intracorporal prostaglandin E₁, papaverine and phentolamine in patients with erectil dysfunction. *J. Urol.*, **149**:345 (abstract), 1993.

Collins P. W. – Development and therapeutic role of synthetic prostaglandins in peptic ulcer disease. *J. Med. Chem.*, **29**:437-443, 1986.

Cookson M. S., Phillips D. L., Hiff M. E. and William P. Fitch – Analysis of microsurgical penile revascularization results by etiology of impotence. *J. Urol.*, **149**:1308-1312, 1993.

Corbin J. D., Francis S. H., Osterloh I. H. – Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *J. Urol.*, **56**:545-546, 2000.

Costa P. and Bali J. – Adrenergic receptors on smooth muscle cells isolated from human corpus cavernosum. *J. Urol.*, **150**:859-863, 1993.

Cowan C. L. and Cohen R. A. – Two mechanisms mediate relaxation by bradikinin of pig coronary artery: NO-dependent and independent responses. *Am. J. Physiol.*, **261**, H830-H835, 1991.

Creager M., Gallagher S., Girerd J. Coleman M., Dzu J. and Cooke P. – L-arginine improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolaemic humans. *J. Clin Invest.*, **90**:1248-1253, 1992.

Creese R. and Denborough A. - The effects of prostaglandin E₂ on contractility and cyclic AMP levels of guinea-pig tracheal smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **8**:616-617, 1981.

Dail W.G. – Autonomic innervation of male reproduction genitalia. In: Maggi CA, Harwood Academic Publishers: London, *The Autonomic Nervous System*, **6**:69-101, 1993.

Daley J. T., Brown M. L., Watkins M. T., Traish A. M., Huang Yue-Hua, Moreland

R. B. and Saenz de Tejada I. – Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum: I - regulation by oxygen tension. *J. Urol.*, **155**:1482-1487, 1996.

Daley T., McMahon G., Stricker P. and Lowy M. – Comparison of prostaglandin E₁ and papaverine self injection program drop out rates. *Int. J. Imp. Res.*, **6**:86-87, 1994.

Daley T. and Saenz de Tejada I. – Prostaglandin production during hipoxia in rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, **149**:285, 1993.

Davi G., Gresele P., Violi F., Basili S., Catalano M., Giammarresi C., Volpato R., Nenci G. G., Ciabattoni G. And Patrono C. – Diabetes mellitus, hypercolesterolemia and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation*, **96**:69-75, 1997.

Davis B., Chapple C. and Chess-Williams R. - The α_{1L} -adrenoceptor mediates contraction in human erectile tissue. *Eur. J. Urol.*, **35**:102, 1999.

Davis T. L. and Sharif N. A. – Pharmacological characterisation of [3H]- prostaglandin E₂ binding to the cloned human EP₄ prostanoid receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **130**:1919-1926, 2000.

Dawson T. M. and Dawson V. L. – Nitric oxide synthase: role as a neurotransmitter - mediator in the brain and endocrine system. *Annu. Rev. Med.*, **47**:219-227, 1996.

Dennefros B., Hamberger L., Hillensjo T., Holmes P., Janson P. O., Magnusson C. and Nilson L. – Aspects concerning the role of prostaglandins for ovarian function. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **113**:31-41, 1983.

Dhabuwala C., Ramakrishna R. and Anderson F. – Beta-adrenergic receptors in human cavernous tissue. *J. Urol.*, **133**:721-723, 1985.

Dinsmore W. W. and Alderdice D.K. – Vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate administered by auto-injector in the treatment of patients with erectile dysfunction resistant to other intracavernosal agents. *Brit. J. Urol.*, **81**:437-440, 1998.

Djamilian M., Stief C. G., Kuczyk M. and Jonas U. – Follow up results of a combination of calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E₁ in the treatment of

erectile dysfunction. *J. Urol.*, **149**:1296-1298; 1993.

Drexler H., Zeither A. M., Meinzer K. and Just H. – Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet*, **338**:1546-1550, 1991.

Dukes M., Russell W. and Walpole A. L. – Potent luteolytic agents related to prostaglandin F_{2α}. *Nature*, **250**:330-331, 1974.

Durrett L. R., Mathew B. P., Nechay B. R., Neldon S. L. and Williams J. F. Jr. – Relationship of cardiac muscle tension to Na⁺, K⁺ - adenosine triphosphate activity after chronic digitoxin administration in cats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**:411-416, 1985.

Eardley I. – New oral therapies for the treatment of erectile dysfunction. *Brit. J. Urol.*, **81**:122-127, 1998.

Eckert R., Zaubitzer T., Derouet H. and Ziegler M. – Intracellular control of cavernous smooth muscle contractility. *J. Urol.*, **151**:431, 1994.

Edwards G. – Role of gap junctions in the response to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **128**:1788-1794, 1999.

Ehmke H., Junemann K., Mayer B. and Kummer W. - Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. *Int. J. Imp. Res.*, **7**:47-156; 1995.

Elizabeth K. and Ho-Leung Fung. – Impacto de la creación de las Unidades de Andrología en el tratamiento por inyecciones intracavernosas de la disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.*, **3**:257-261, 1999.

Elizabeth K. and Ho-Leung Fung. - Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J. Pharm. Exper. Therap.*, **255**:1256-1264, 1990.

Escrig A., Marin R. and Mas M. - Repeated PGE₁ treatment enhances nitric oxide and erection responses to nerve stimulation in the rat penis by upregulating constitutive NOS isoforms. *J. Urol.*, **162**:2205-2210, 1999.

Esen A. A., Gidener S., Guler C., Guven H. and Kirkali Z. - Contractility changes on the deep dorsal penile vein due to serotonin. *J. Urol.*, **158**:234-237, 1997.

Euler V. S. – Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata und Samenblasensekretes. *Klin. Wochenschr.*, **14**:1182, 1935.

Fan S., Brink P. and Melman A. – An analysis of the maxi-K⁺ channel in cultured human corporal smooth muscle cells. *J. Urol.*, **153**:818-825, 1995.

Fawcett L., Baxendale R., Stacey P., McGrouther C., Harrow I., Soderling S., Hetman J., Beavo J. A. and Phillips S. C. – Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE 11A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **28**:3702-3707, 2000.

Feelisch M. – The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**:25-33, 1991.

Feelisch M., Ostrowski J. and Noack E. - On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**:13-22, 1989.

Feldman R., Rose B. and Verbust K. – Hemodynamic and angiographic effects of prostaglandins E₁ in coronary artery disease. *Amer. J. Cardiol.*, **62**:698-701, 1988.

Feldman R., Goldstein I. and McKinlay B. – Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J. Urol.*, **151**:54- , 1994.

Félétou M. and Vanhoutte P. M. – Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Drugs News Perspect.*, **12**:217-222, 1999.

Fernandes B. and Crankshaw D. – Functional characterization of the prostanoid DP receptor in human myometrium. *Eur. J. Pharmacol.*, **283**:73-81, 1995.

Ferreira S. H. – Prostaglandins : peripheral and central analgesia. *Adv. Pain Res. Ther.*, **5**:627-634, 1983.

Fisher D. A., Smith J. F., Pillar J. S., St. Denis S. H. and Cheng J. B. – Isolation and characterization of PDE 9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, **19**:15559-15564, 1998.

Floth A. and Schramek P. – Intracavernous injection of prostaglandin E₁ in combination with papaverine: enhanced effectiveness in comparison with papaverine plus phentolamine and prostaglandin E₁ alone. *J. Urol.*, **145**:56-59, 1991.

Foreman M. and Hall J. – Effects of D₂ dopaminergic receptors stimulation on male rat sexual behavior. *J. Neurol. Transm.*, **327**:153-170; 1987.

Forstermann U. – Significance of endothelial cells for the regulation of the tone of smooth muscle-formation of an endothelial relaxing factor. *Z. Kardiol.*, **75**:577-583, 1986.

Forstermann U. – Properties and mechanisms of production and action of endothelium-derived relaxing factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**:S45-S51, 1986.

Forstermann U., Hertting G. and Neufang B. – The role of endothelial and non endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. *Br. J. Pharmacol.*, **87**:521-532, 1986.

Forstermann U., Mulsch A., Bohme E. and Busse R. – Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ. Res.*, **58**:531-538, 1986.

Forstermann U. and Neufang B. – The endothelium-dependent vasodilator effect of acetylcholine: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, **103**:65-70, 1984.

Freedman A. L., Costa Neto F., Mehringer C. M. and Rajfer J. – Long-term results of penile vein ligation for impotence from venous leakage. *J. Urol.*, **149**:1301-1303, 1993.

Fuchs A. M., Mehringer C. M. and Rajfer J. – Anatomy of penile venous drainage in potent and impotent men during cavernosography. *J. Urol.*, **141**:1353-1356, 1989.

Fukata Y., Kaibuchi K., Amano M. and Kaibuchi K. – Rho-Rho-Kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**:32-39, 2001.

Fujishige K., Kotera J., Michibata H., Yuasa K., Takebayashi S., Okumura K. and Omori K. – Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyses both cAMP and cGMP (PDE 10A). *J. Biol. Chem.*, **25**:18438-18445, 1999.

Furchgott F. and Zawadzki J. – The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373, 1980.

Gardiner P. J. – Characterisation of prostanoid relaxant / inhibitory receptors using a highly selective agonist, TR4979. *Br. J. Pharmacol.*, **87**:45-56, 1986.

Gardiner P. J. and Collier H. J. – Specific receptors for prostaglandins in airways. *Prostaglandins*, **19**:819-841, 1980.

Gardner C., Robas N., Cawkill D. and Fidock M. – Cloning and characterization of the human and mouse PDE 7B, a novel cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **272**:186-192, 2000.

Gerber G. and Levine L. – Pharmacological erection program using prostaglandin E₁. *J. Urol.*, **146**:786-789, 1991.

Gingell C. and Melman A. – The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. *J. Urol.*, **161**:5-11;1999.

Gilles H. and Leff P. – The biology and pharmacology of prostaglandin D₂. *Prostaglandins*, **35**:277-300, 1986.

Gilles H., Leff P., Bolofo M. L., Kelly M. G. and Robertson A. D. – The classification of prostaglandin DP-receptors in platelets and vasculature using BWA868 C, a novel selective and potent competitive antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **96**:291-300, 1989.

Goldblatt M. W. – A depressor substance in seminal fluid. *J. Soc. Chem. Ind.*, **52**:1056-1057, 1993.

Giuliano F., Bernarbe J., Jardin A. and Rousseau J. P. - Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J. Urol.*, **150**:519-524, 1993.

Giuliano F., Montorsi F., Mirone V., Rossi D. and Michael Sweedney for the sildenafil multicenter study group - Switching from intracavernous prostaglandin E₁ injections to oral sildenafil citrate in patients with erectile dysfunction: results of a multicenter european study. *J. Urol.*, **164**:708-711, 2000.

Giuliano F. and Rampin O. - Central noradrenergic control of penile erection. *Int. J. Imp. Res.*, **12**:S13-S19, 2000.

Giuliano F., Rampin O. and Jardin A. - Physiology of erection. *Rev. Med. Interne*, **18**: 3-9, 1997.

Gold M. E., Wood K. S., Byrns R. E., Buga G. M. and Ignarro L. J. – L-arginine-dependent vascular smooth muscle relaxation and cGMP formation. *Am. J. Physiol.*, **259**:H1813-1821, 1990.

Goldstein A. M. B. and Padma-Nathan H. - The microarchitecture of the intracaver-nosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton. *J. Urol.*, **144**:1144-1147, 1990.

Goldstein I., Lue T. F., Padma-Nathan H., Rosen R. C., Steers W. D. and Wicker P. A. – Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *New Engl. J. Med.*, **338**:1397-1404, 1998.

Gonzalez-Cadavid N. F., Ignarro L. J. and Rajfer J. – Nitric oxide and the cyclic GMP system in the penis. *Mol. Urol.*, **3**:51-59, 1999.

Govier F., McClure R., Weissman R., Gibbons R., Pritchett T. and Kramer-Levien – Experience with triple-drug therapy in a pharmacological erection program. *J. Urol.*, **150**:1822-1824; 1993.

de Groat WC. and Booth AM. – Neural control of penile erection. In: Maggi CA *The autonomic Nervous System*, **6**:465-542, 1993.

Grimm H. and Svendensen K. – Sexual problems and antihypertensive drug treatment: results of the Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *J. Urol.*, **155**: 469, 1996.

Gryglewski R. J., Palmer R. M. and Moncada S. – Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **320**:454-456, 1986.

Gupta S., Moreland R. B., Munarriz R., Daley J., Goldstein I. and Saenz de Tejada I. – Possible role of Na⁺-K⁺ATPase in the regulation of human corpus cavernosum smooth muscle contractility by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **116**:2201-2206; 1995.

Gupta S., Daley J., Goldstein I., Traish A. M. – Lack of selectivity of agents for alpha-adrenergic receptors in human corpus cavernosum. *Int. J. Impot. Res.*, **8**:105, 1996.

Gupta S., Moreland R. B. and Yang S. – Corpus cavernosum smooth muscle express functional post synaptic alpha-2-adrenoceptors. *Br. J. Urol.*, 1998

Haggstrom S., Lissbrant I., F., Bergh A. and Jan-Erik Damber – Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rays. *J. Urol.*, **161**:1620-1625, 1999.

Hanbury D. C., Sethia K. K. – Erectile function following transurethral prostatectomy. *Br. J. Urol.*, **75**:12-13, 1995.

Hanson-Divers C., Jackson S. E., Lue T. F., Crawford S. Y. and Rosen R. C. – Health outcomes variables important to patients in the treatment of erectile dysfunction. *J. Urol.*, **159**:1541-1547, 1998.

Harris D. – Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses and mechanisms of K⁺ - relaxation. *Eur. J. Pharmacol.* **402**:119-128, 2000.

Hashimoto H., Negishi M. and Ichikawa A. – Identification of a prostacyclin receptor coupled to the adenylate cyclase system via a stimulatory GTP-binding protein in mouse mastocytoma P-815 cells. *Prostaglandins*, **40**:491-505, 1990.

Hatzichristou D., Hatzimouratidis K., Bekas M., Apostolidis A., Tzortzis V., Yannakoyorgos K. – Diagnostic steps in the evaluation of patients with erectile dysfunction. *J. Urol.*, **168**:615-620, 2002.

Hedberg A., Hall S. E., Ogletree M. L., Harris D. N. and Lin E. C. – Characterisation of SQ29548 as a high affinity radioligand binding to thromboxane A₂ / prostaglandin H₂-receptors in human platelets. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, **245**:786-792, 1988.

Hedlund H. and Andersson K.-E. – Comparison of responses to the drugs acting on adrenoceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Pharmacol.*; **5**:81- , 1985.

Hedlund H., Andersson K.-E. and Larsson B. – Alpha-adrenoceptors and muscarinic receptors in the isolated human prostate. *J. Urol.*, **134**:1291-1298, 1985.

Hedlund H. and Andersson K.-E. - Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J. Urol.*, **134**:1245-1250, 1985.

Hedlund H., Andersson K.-E., Fovaeus M., Holmquist F. and Uski T. - Characterization of contraction - mediating prostanoid receptors in human penile erectile tissues. *J. Urol*, **141**:182-186, 1989.

Hedlund H., Ny L., Alm P. and Andersson K.-E. - Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J. Urol.*, **164**:868-875, 2000.

Hedlund P., Alm P. and Andersson K-E. – NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.*, **127**:349-360, 1999.

Hemberg M., Hedquist P., Strandberg K., Svensson J. and Samuelsson B. – Prostaglandin endoperoxides IV. Effects on smooth muscle. *Life Sci.*, **16**:642-645, 1975.

Hernandez M., Elmedal B., Mulvany M. J. and Simonsen U. – Mechanisms of relaxations of bovine isolated bronchioles by the nitric oxide donor, GEA 3175. *Br. J. Pharmacol.*, **123**:895-905, 1998.

Herschorn S. and Abara E. – Follow up of self administered intracorporal papaverine. *J. Urol.*, **141**:221 (Abstract), 1989.

Herting G., Seregi A. and Forstermann U. – Formation and functions of prostaglandins in the central nervous system in rodents. *Adv. Prostaglandin Thromb. Leukot. Res.*, **15**:573-576, 1985.

von Heyden B., Donatucci C. F., Kaula N. and Lue T. F. - Intracavernous pharma-cotherapy for impotence: selection of appropriate agent and dose. *J. Urol.*, **149**:1288-1290, 1993.

Hillegaart V., Alster P., Uvnas-Moberg K. and Ahlenius S. – Sexual motivation promotes oxytocin secretion in male rats. *Peptides*, **19**:39-45, 1998.

Hink U., Li H., Mollnau H., Oelze M., Matheis E., Hartmann M., Skatchkov M., Thaiss F., Stahl R. A., Warnholtz A., Meinertz T., Griendling K., Harrison D. G., Forstermann U. and Munzel T. – Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.*, **88**:14-22, 2001.

Hobbs A. J. and Ignarro L. J. – Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol.*, **269**:134-148, 1996.

Hobbs A. J., Fukuto J. M. and Ignarro L. J. – Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl. Acad. Sci*, **91**:10992-10996, 1994.

Hogg N., Darley-Usmar V. M., Wilson M. T. and Moncada S. – Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.*, **15**:419-424, 1992.

Holmquist F., Andersson K-E, Hedlund H. – Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand.*, **139**:113-122, 1990.

Holmquist F., Kirkeby H. J. and Larsson B. – Functional effects, binding sites and immunolocalization of endothelin-1 in isolated penile tissues from man and rabbit. *J. Pharamcol. Exp. Ther.*, **261**:795-802, 1992.

Holmquist F., Stief G., Jonas U. and Andersson K.-E. – Effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous stimulation in the rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, **143**:299,1991.

Honda A., Sugimoto Y., namba T., watabe A., Irie A., Negishi M., Narumiya S. and Ichikawa A. – Cloning and expression of a cADN for mouse prostaglandin E-receptor and EP₂-subtype. *J. Br. Chem.*, **268**.,:7759-7762, 1993.

Horiguchi S., Veno R., Hyodo M. and Hayaishi O. – Alterations in nociception after intracisternal administration of prostaglandin D₂, E₂ and F₂ α to conscious mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **122**:173-179, 1986.

Hung A. – Expression of the inducible nitric oxide synthase in smoth muscle cells from rat penile corpora cavernosa. *J. Androl.*, **16**:469- , 1995.

Iacono F., Barra S. and Lotti T. – Evaluation of penile deep arteries in psychogenic impotence by means of duplex ultrasonography. *J. Urol.*, **149**:1262-1264, 1993.

Ignarro L. J. – Nitric oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*, **16**:477-483, 1990.

Ignarro L. J. – Endothelium-derived nitric oxide: Pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm. Res.*, **6**:651-659, 1989.

Ignarro L. J., Bush P. A. and Buga G. M. – Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **170**:843-850, 1990.

Ignarro L. J. – Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. Suppl.*, **55**:S2-S5, 1996.

Ignarro L. J. – Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels*, **28**:67-73, 1991.

Ignarro L. J., Cirino G., Casini A. and Napoli C. – Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **34**:879-886, 1999.

Ignarro, L., Byrns R., Buga G. and Wood K. – Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.*, **61**:866-879, 1987.

Ignarro L. J., Lipton H., Edwards J. C., Baricos W. H., Hyman A. L., Kadowitz P. J. and Gruetter C. A. – Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**:739-749, 1981.

Ishii N., Watanabe H., Irisawa C., Kikuchi Y., Kubota Y., Kawamura S., Suzuki K., Chiba R., Tokiwa M. and Shirai M. – Intracavernous injection of prostaglandin E₁ for the treatment of erectil impotence. *J. Urol.*, **141**:323- 325, 1989.

Ismail M., Abbott L. and Hirsch I. H. – Experience with intracavernous PGE₁ in the treatment of erectile dysfunction: dose considerations and efficacy. *Int. J. Impot. Res.*, **9**:39-42, 1997.

Javier Angulo, Cuevas P., Moncada I., Martin-Morales A., Allona A., Fernandez A., Gabancho S., Ney P. and Saenz de Tejada I. – Rationale for the combination of PGE₁ and S-Nitrosoglutathione to induce relaxation of human penile smooth muscle. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, **295**:586-593, 2000.

Juenemann K-P., Lue T., Luo A., Jadallah A., Nunes L. and Tanagho A. - The role of vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter in canine penile erection: a combined in vivo and immunohistochemical study. *J Urol.*, **138**:871-877, 1987.

Kamm K. and Stull J. – Regulation of smooth muscle contractile elements by second messenger. *Ann. Rev. Physiol.*, **51**:299-302, 1989.

Kennedy I, Coleman R. A., Humphry P. P., Levy G. P. and Lunley P. – Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins*, **24**: 667-689, 1982.

Kerfoot W. W., Park H. Y., Schwartz L., Hagen Perotto and Carson C. C. – Characterization of calcium channel blocker induced smooth muscle relaxation using a model of isolated corpus cavernosum. *J. Urol.*, **150**:249-252, 1993.

Kervin N. – Nitric oxide: a new paradigm for second messenger. *J. Med. Chem.*, **38**:4343, 1995.

Kiely E., Bloom S., Williams G. – Penile response to intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide alone and in combination with other vasoactive agents. *Brit. J. Urol.*, **64**:191-194; 1989.

Kim N., Azadzi K., Goldstein I. and Saenz de Tejada I. – A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic noncholinergic neurogenic relaxation of penile smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, **88**:112- 118, 1991.

Kim N., Padma-Nathan H., Daley J., Goldstein I. and Saenz de Tejada I. – Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J. Clin. Invest.*, **91**: 437-442, 1993.

Kimoto Y., Kessler R. and Constantinou E. C. – Endothelium-dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J. Urol.*, **144**:1015-1017, 1990.

Kirkeby J. H., Andersson K E.. and Forman A. – Comparison of the effects of prostanoids on human penile circumflex veins and corpus cavernosum tissue. *Br. J. Urol.*, **72**:220-225, 1993.

Knispel H. H. and Andresen R. – Evaluation of vasculogenic impotence by monitoring of cavernous oxygen tension. *J. Urol.*, **149**:1276-1279, 1993.

Knipsel H. H., Wegner A. E. and Miller K. – The role of linsidomine (SIN-1) in diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Int. J. Imp. Res.*, **6**:156-159, 1994.

Krane R., Goldstein I. and Saenz de Tejada I. – Impotence. *N. Eng. J. Med.*, **321**:1648-1659, 1989.

Kowaluk E. A. and Fung H. L. – Spontaneous liberation of nitric oxide cannot for *in vitro* vascular relaxation by S-nitrosothiois. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**:1256-1264, 1990.

Kowaluk E., Polsczuk R. and Fung L. – Tolerance to relaxation in rat aorta-comparison of na S-nitrosothiol with nitroglycerin. *Eur. J. Pharmacol.*, **144**:379-383, 1987.

Krane A., Wiedenroth A., magert J., Uckert S., Forssman G., stief G. and Jonas U. – Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J. Urol.*, **165**:280-283, 2001.

Krauss A. H., Woodward D. F., Gibson L. L., Protzman C. E., Williams L. S., Burk R. M., Gac T.S., Roof M. B., Abbas F., Marshall K. and Senior J. – Evidence for human thromboxane receptor heterogeneity using a novel series of 9,11-cyclic carbonate derivatives of prostaglandin F_{2α}. *Br. Pharmacol.*, **117**:1171-1180, 1996.

Kuehl F. A., Cirillo V. J., Ham E. A. and Humes J. L. – The regulatory role of the prostaglandins on the cyclic 3', 5'- AMP system. *Adv. Biosci.*, **9**:155-172, 1973.

Kuehl F. A., Humes J. L., Cirillo V. J. and Ham E. A. – Cyclic AMP and prostaglandins in hormone action. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **1**:493-502, 1972.

Kuehl F. A., Cirillo V. J. and Ham E. A. and Humes J. L. – The regulatory role of the prostaglandins on the cyclic 3' - 5' AMP system. *Adv. Biosci.*, **9**:155-172, 1973.

Kuehl F. A. and Humes J. L. – Direct evidence for a prostaglandin receptor and its application to prostaglandin measurements. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**:480-484, 1972.

Kuhn M., Otten A., Frolich J. C. and Forstermann U. – Endothelial cyclic GMP and AMP do not regulate the release of endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide from bovine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, **256**:677-682, 1991.

Kummer W., Fischer A., Mundel P., Mayer B., Philippin B. and Preisler U. – Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport*, **3**:653, 1992.

Kunapuli P., Lawson A., Rokach J and FitzGerald A. – Functional characterization of the ocular prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) receptor. Activation by the isoprostone, (12- iso- PGF_{2α}). *J. Biol. Chem.*, **272**:147-154, 1997.

Kurkrock R. and Lieb C. C. – Biochemical studies of human semen, the action of semen on human uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **28**:268, 1930.

Kuthe A., Wiedenroth A., Magert J., Uckert S., Forssmann G., Stief G. and Jonas U. – Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J. Urol.*, **165**:280-283, 2001.

Jansen A., Drazen J., Osborne A., Brown R., Loscalzo J. and Stamler S. – The relaxant properties in guinea pig airways of S-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**:154-160, 1992.

Jensen B., Stubbe J., Hansen P., Andreasen D. and Skott O. – Localization of prostaglandin E₂ EP₂ and EP₄ receptors in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal*, **280**:1001-1009, 2001.

Jino H., Kurahashi K., Usui H., Nakata Y., Shimizu Y. and Temma S.– Pharmacological nature of TP receptor mediated contraction in human intrapulmonary artery. *Life Sci*, **59**:2059-2065; 1996.

Jones R. L. and Wilson N. H. – Na EP₃-receptor may mediate prostaglandin E-induced potentiation of aggregation in human platelets. *Br. J. Pharmacol.*, **101**:522-523, 1990.

Jonler M., Moon T., Brannan W., Stone N. N., Heisey D. and Bruskevitz R. C. – The effect of age, ethnicity and geographical location on impotence and quality of life. *Brit. J. Urol.*, **75**: 651-655, 1995.

Lakin M. M., Montague K. D., Medendorp S. V., Tesar L. and Schover L. R. - Intracavernous injection therapy: analysis of results and complications. *J. Urol.*, **143**:1138-1141, 1990.

Lands A. M., Arnold A., McAuliff J P., Ludena F. P. and Brown T. G. – Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetics amines. *Nature*, **241**:597-598, 1962.

Law R. A., Jones R. L. and Wilson N. H. – Characterisation of the receptors involved in the direct and indirect actions of prostaglandins E and I on the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **105**:271-278, 1992.

Lawrence R. A. and Jones R. L. – Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.*, **105**:817-824, 1992.

Lepor H., Gregerrman M., Crosby R., Mostofi K. F. and Walsh P. C. – Precise localization of the autonomic nerves from the plexus to the corpora cavernosa: a detailed anatomical study of the adult male pelvis. *J. Urol.*, **133**:207-212, 1985.

Lerner S. E., Melman A. and Christ G. J. – A review of erectile dysfunction: news insights and more questions. *J. Urol.*, **149**:1246-1255, 1993.

Li H. and Forstermann U. – nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.*, **190**:244-254, 2000.

Lindvall O., Bjorklund A. and Skagerberg G. – Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res.*, **306**:19-30, 1984.

Linnet O. I. and Ogrinc F. G. – Efficacy and safety of intracavernosal alprostadil in men with erectile dysfunction. *N. Eng. J. Med.*, **334**:873-877, 1996.

Lomas G. and Jarow P. – Risk factors for papaverine-induced priapism. *J. Urol.*, **147**:1280-1281, 1992.

Lowry O. H., Rosenbrough J., Farr L. and Randall J. – Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275, 1951.

Lue T.F. – Physiology of erection and pathophysiology of impotence. *Campbell's Urology*, 6^a th ed.:709-728, 1992.

Lugg J., Ng C., Rajfer J. and Gonzalez-Cadavid N. – Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. *Am. J. Physiol.*, **271**:E354-361, 1996.

Lydford J. and McKechnie W. – Classification of the prostaglandin EP-receptor located on the rat isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **108**:72, 1993.

Lydford J. and McKechnie W. – characterisation of the prostaglandins receptors located on the rabbit isolated saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, **112**: 1994.

Lydford J., McKechnie W. and Dougall G. – Pharmacological studies on prostanoid receptors in the rabbit isolated saphenous vein: a comparison with the rabbit isolated ear artery. *Brit. J. Pharmacol.*, **117**:13-20, 1996.

MacAllister R. J., Calver A. L., Riezebos J., Collier J. and Vallance P. – Relative potency and arteriovenous selectivity of nitrovasodilators on human blood vessels: na insight into the targeting of nitric oxide delivery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**:154-160, 1995.

MacIntyre D. E. and Armstrong R. A. – Agonists and receptors: prostaglandins and thromboxanes. *Platelet responses and metabolism*, 93-103, 1987.

MacIntyre D. E. and Gordon J. – Discrimination between platelet prostaglandin receptors with a specific antagonist of prostaglandins. *Thromb. Res.*, **11**:705-713, 1977.

Malmsten C. – Some biological effects of prostaglandin analogs. *Life Sci.*, **18**:169-176, 1976.

McMahon G. – A comparison of the response to the intracavernosal injection of a combination of all three agents in the management of impotence. *Int. J. Imp. Res.*, **3**:113-117, 1991.

McKenna K. – The brain is the master organ in sexual function : central nervous system control of male and female sexual function. *Int. J. Imp. Res.*, **11**:S48-S55, 1999

Martin-Morales A. Sanchez-Cruz J. J., Saenz de Tejada I., Rodrigues-Vela L., Jimenez Cruz J. F. and Burgos-Rodriguez R. – Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiologia de la Disfuncion Erectil Masculina Study. *J. Urol.*, **166**:569-574, 2001.

Martínez-Piñero L., Cortes R., Cuervo E., Lopez-Tello J., Cisneros J. and Martínez-Piñero J. M. – Prospective comparative study with intracavernous sodium nitroprusside and prostaglandin E₁ in patients with erectile dysfunction. *Eur. Urol.*, **34**:350-354; 1998.

Masato Tamura, Kagawa S., Kimura K., Kawanishi Y, Tsuruo Y. and Ishimura K.– Coexistence of nitric oxide synthase, tyrosine hydroxylase and vasoactive intestinal polypeptide in human penile tissue - a triple histochemical and immunohistochemical study. *J. Urol.*, **153**:530-534, 1995.

McKenna K. – The brain is the master organ in sexual function: central nervous system control of male and female sexual function. *Int. J. Imp. Res.*, **11**:48-55, 1999.

Meinhardt W., Lycklama A. A. B., Nijeholt A., Kropman R. F. and Zwartendijk J. – The negative pressure device for erectile disorders: when does it fail?. *J. Urol.*, **149**:1285-1287, 1993.

Melis M. R. and Argiolas A. – Nitric oxide synthase inhibitors prevent apomorphine and oxytocin-induced penile erection and yawning in male rats. *Brain Res.*; **32**:71-74, 1993.

Melis M. R. and Argiolas A. – Role of central nitric oxide in the control of penile erection and yawning. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **21**:899-922, 1997.

Melis M. R., Argiolas A. and Gessa G. – Apomorphine-induced penile erection

and yawning site of action in brain. *Brain Res.*, **415**:98-104, 1987.

Melis M. R., Stamcampiano R. and Argiolas A. – Effect of excitatory amino acid receptor antagonist on apomorphine, oxytocin and ACTH-induced penile erection and yawning in male rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **220**:43-48, 1992.

Melis M. R., Succu S. and Argiolas A. – Prevention by morphine of N-methyl-D-aspartic acid-induced penile erection and yawning: involvement of nitric oxide. *Brain Res. Bull.*, **44**:689-694, 1997.

Melis M. R., Succu S. and Argiolas A. – Dopamine agonists increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. *Eur. J. Neurosci.*, **8**:2056-2063, 1996.

Melis M. R., Succu S., Iannucci U. and Argiolas A. – Oxytocin increases nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats: correlation with penile erections and yawning. *Regulatory Peptides*, **69**:105-111, 1997.

Melis M. R., Succu S., Mauri A. and Argiolas A. – Nitric oxide production is increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats during non-contact penile erections and copulation. *Eur. J. Neurosci.*, **10**:1968-1974, 1998.

Melman A. and Christ G. J. – Integrative erectile biology. The effects of age and disease on gap junctions and ion channels and their potential value to the treatment of erectile dysfunction. *Urol. Clin. North Am.*, **28**:217-231, 2001.

Miller M. A., Morgan R. J., Thompson C. S., Mikhaidis D. P. and Jeremy J. Y. – Adenylate and guanylate cyclase activity in the penis and aorta of the diabetic rat: an in vitro study. *Brit. J. Urol.*, **74**:106-111, 1994.

Miller V. and Vanhoute M. – Relaxations to SIN-1, nitric oxide and sodium nitroprusside in canine arteries and veins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**:67-71, 1989.

Milligan G. and White J. H. – Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Sciences*, **10**:513-518, 2001.

Milne S., Armstrong A. and Woodward F. – Comparison of the EP receptor subtypes mediating relaxation of the rabbit jugular and pig saphenous veins. *Prostaglandins*, **49**: 225-237, 1995.

Moncada S. – Biological importance of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.*, **76**:3-31, 1982.

Moncada S. – Prostacyclin, EDRF and atherosclerosis. *Adv. Exp Med Biol.*, **142**: 1-11, 1988.

Moncada S. – The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv. Second messenger Phosphoprotein Res.*, **28**:97-99, 1993.

Moncada S. – Nitric oxide and cell respiration: physiology and pathology. *Verh K Acad Geneeskde Belg.*, **62**:171-179, 2000.

Moncada S., Gryglewski R., Bunting S. and Vane J. – An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**:663-665, 1976.

Moncada S. and Higgs E. A. – Metabolism of arachidonic acid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **522**:454-463, 1988.

Moncada S., Palmer J. and Higgs A. – Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**:109-142, 1991.

Moncada S., Palmer R. M. and Higgs E. A. – Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.*, **38**:1709-1715, 1989.

Moncada S., Palmer R. M. and Higgs E. A. – The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, **12**:365-372, 1988.

Moncada S, Radomski M. W. And Palmer R. M. – Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet. *Biochem Pharmacol.*, **37**:2495-2501, 1988.

Montorsi F., Guazzoni G., Bergamaschi F., Ferini-Strambi L., Barbieri L. and Rigatti P. – Four-drug intracavernous therapy for impotence due to corporeal veno-occlusive dysfunction. *J. Urol.*, **149**:1291-1295, 1993.

Moody J. A., Vernet D., Laidlaw S., Rajfer J. and Gonzalez-Cadavid N. F. – Effects of long-term oral administration of L-arginine on the rat erectile response. *J. Urol.*, **158**:942-947, 1997.

Moreland R., Traish A., Smith B., Goldstein I. and Saenz de Tejada I. – PGE₁ suppresses the induction of new collagen synthesis by transforming growth factor β_1 in human corpus cavernosum smooth muscle: mechanism of penile ischemia associated fibrosis. *J. Urol.*, **151**:431, 1994.

Moriel E. Z., Gonzalez-Cadavid N., Ignarro L. J., Byrns R. and Rajfer J. – Levels of nitric oxide metabolites do not increase during penile erection. *Urology*, **42**:551-553, 1993.

Moriel E. Z. and Rajfer J. – Sodium bicarbonate alleviates penile pain induced by intracavernous injections for erectile dysfunction. *J. Urol.*, **149**:1299-1300, 1993.

M. Shalev, F. Staerman, H. Allain, B. Lobel and B. Saiag – Stimulation of P2y purinoceptors induces, via nitric oxide production, endothelium-dependent relaxation of human isolated corpus cavernosum. *J. Urol.*, **161**:955-959, 1999.

Mulhall J. and I. Goldstein. – Oral agents in the management of erectile dysfunction. Textbook of Erectile Dysfunction; 309-315; 1999.

Nahorski R., Wilcox A., Mackrill J. and Chaliss J. – Phosphoinositide-derived second messengers and the regulation of Ca²⁺ in vascular smooth muscle. *J. Hypertension*, **12**:133, 1994

Naitoh J. and Beldegrun A. – Gene therapy - The future is here: a guide to the practicing urologist. *Urology*, **51**:367-380, 1998.

Nakano T., Hanasaki K. and Anita H. – Different effects of two thromboxane A₂ / prostacyclin receptor ligands, U46619 and S-145, on rabbit platelets. *FEBS Lett.*, **234**:309-312, 1988.

Naylor A. – Endogenous neurotransmitters mediating penile erection. *Brit. J. Urol.*, **81**:424-431, 1998.

Nehra A., Azadzi K. M., Moreland R. B., Pabby A, Siroky M. B., Krane R. J., Goldstein I. and Udelson D. – Cavernosal expansibility is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. *J. Urol.*, **159**:2229-2236, 1998.

Nehra A., Blute M. L., Barrett D. M. and Moreland R. B. – Rationale for combination therapy of intraurethral prostaglandin E₁ and sildenafil in the salvage of erectile dysfunction patients desiring noninvasive therapy. *Int. J. Imp. Res.*, **14**:38-42, 2002.

Nials A. T., Vardey C. J., Deyer L. H., Thomas M., Sparrow S. J., Shepherd G. D. and Coleman R. A. – AH13205, a selective prostanoid EP₂-receptor agonist. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **11**:165-179, 1993.

Oliva D. and Nicosia S. – PGI₂-receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature: State of the Art. *Pharmacol., Res. Commun*, **19** :735-765, 1987.

Ollson R. A. and J. D. Pearson – Cardiovascular purinoceptors. *Physiol. Rev.*, **70** :761, 1990.

O. Sazova, A. Kadioglu, L. Gurkan, Z. Kayaarasi, S. Bross, M. Manning and K.P. Junemann - Intracavernous administration of SIN-1+VIP an *in vivo* rabbit model for erectile function. *Int. J. Imp. Res.*, **14**:44-49; 2002.

Osterloh I., Eardley I., Carson C. and Padma-Nathan H. – Clinical efficacy of sildenafil citrate based on etiology and response to prior treatment. *J. Urol.*, **162**:722-725, 1999.

P. Correia Sá, J. A. Correia – Evidence that the presynaptic A_{2A}-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **350**: 514-522, 1994.

Padma-Nathan H, Goldstein I., Azadzo K., Blanco R., Saenz de Tejada I. and Krane R. J. – In vivo and in vitro studies on the physiology of penile erection. *Semin. Urol.*, **4**:209-216, 1986.

Padma-Nathan H. – The efficacy and synergy of polypharmaceutical intra cavernosal pharmacotherapy. *J. Urol.*, **143**:304, 1990.

Padma-Nathan H., Goldstein I., Payton T., Krane R. J. – Intracavernosal pharmacotherapy: the pharmacologic erection program. *World J. Urol.*, **5**:160-165, 1987.

Padma-Nathan H., Hellstrom W. J. G., Kaiser F. E., Labasky R. F., Lue T. L., Nolten W. E., Norwood P. C., Peterson C. A., Shabsigh R., Tam P. Y., Place V. A. and Gesundheit Neil – Treatment of men with erectile dysfunction with transurethral alprostadil. *N. Engl. J. Med.*, **336**:1-7; 1997.

Padma-Nathan H., Keller T., Poppiti – Hemodynamic effects of intraurethral alprostadil: the Medicated Urethral System for Erection. *J. Urol.*, **151**:469, 1994.

Palmer R. M. and Moncada S. – A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **158**:348-352, 1989.

Palmer R. M., Ashton D. S. and Moncada S. – Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**:664-666, 1988.

Palmer R. M., Ferrige A. G. and Moncada S. – Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**:524-526, 1987

Palmer R. M., Rees D. D., Ashton D. S. and Moncada S. – L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **153**:1251-1256, 1988.

Panza A., Casino R. Kilcoyne M. and Quyyumi A. – Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, **37**:1468-1474, 1993.

Panza A., Quyyumi A., Brush E. and Epstein E. – Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, **323**:22-27, 1990.

Paoletti R. – Biochemistry and pharmacology of prostaglandin E₁: introductory remarks. In: *Prostaglandin E₁ in Atherosclerosis*, 3-7, 1986.

Park K., Ahn K., Lee S., Rvu S., Park Y. and Azadoi K. M. – Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *Int. J. Impot. Res.*, **13**:116-124, 2001.

Pehek E. A., Thompson J. T. and Hull E. M. – The effects of intracranial administration of the dopamine agoniste apomorphine on penile reflexes and seminal emission in the rat. *Brain Res.*, **500**:325-332, 1989.

Peskar B. A., Hesse W. H., Rogatti W., Diehm C., Rudofsky G., Schweer H. and Seyberth H. W. – Formation of 13, 14-dihydro-prostaglandin E₁ during intravenous infusions of prostaglandin E₁ in patients with peripheral arterial occlusives diseases. *Prostaglandins*, **41**:225, 1991.

Peskar B., Cawello W., Rogatti W., Rudofsky G. – On the metabolism of prostaglandin E₁ admnistered intravenously to human volunteers. *J. Physiol. Pharmacol.*, **42**:327-331, 1991.

Pickles V. R. – The myometrial actions of six prostaglandins: consideration of a receptor hypothesis. In Nobel Symposium, *Prostaglandins*, **2** :79-83, 1967.

Poll C., Grix S. P. and Coleman R. A. – Effect of Sc-19220 on neurotransmission in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **97**:421, 1989.

Porst H. – Value of prostaglandin E₁, in the diagnosis of erectile dysfunction in comparison with papaverine and papaverine / phentolamine in 61 patients. *Urologie*, **27**:22-26, 1988.

Porst H. – Prostaglandin E₁ in erectile dysfunction. *Urologie*, **28**:94-98, 1989

Porst H. – Prostaglandin E₁ and the nitric oxide donor linsidomine for erectile failure: a diagnostic comparative study of 40 patients. *J. Urol.*, **149**:1280-1283, 1993.

Porst H. – The rationale for prostaglandin E₁ in erectile failure: a survey of worldwide experience. *J. Urol.*, **155**:802 - 815, 1996.

Porst H. – Transurethral alprostadil with MUSE (medicated urethral system for erection) vs intracavernous alprostadil – a comparative study in 103 patients with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **9**:187-192, 1997.

Porst H., Buvat J. and Meuleman E. – Intracavernous Alprostadil Alfadex - an effective and well tolerated treatment for erectile dysfunction. Results of a long-term European study. *Int. J. Imp. Res.*, **10**:225, 1998.

Porst H. – IC351 (tadalafil): update on clinical experience. *Int. J. Imp. Res.*, **14**:57-64, 2002.

Powell W. S., Hammarstrom S. and Samuelsson B. – Prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.*, **41**:103-107, 1974.

Powell W. S., Hammarstrom S. and Samuelsson B. – Localization of prostaglandin F_{2α} - receptor in bovine corpus luteum plasma membranes. *Eur. J. Biochem.*, **61**:605-611, 1976.

Prieto D., Simonsen U., Hernandez M. and Garcia-Sacristan A. – Contribution of K⁺ channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **123**:1609-1620, 1998.

Prieto D., Simonsen U. and Nyborg N. C. – Regional involvement of an endothelium-derived contractile factor in the vasoactive actions of neuropeptide Y in bovine isolated retinal arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **116**:2729-2737, 1995.

Puppo P. De Rose A. F., Pittaluga P. and Giuliani L. – Diagnosis of male impotence after intracavernous papaverine test. *Eur. Urol.*, **15**:213-218, 1988.

Qiu Y., Kraft P., Lombardi E. and Clancy J. – Rabbit corpus cavernosum smooth

muscle shows a different phosphodiesterase profile than human corpus cavernosum.

J. Urol., **164**:882-886, 2000.

Radermacher J., Forstermann U. and Frolich J. C. – Endothelium-derived relaxing factor influences renal vascular resistance. *Am. J. Physiol.*, **259**:9-17, 1990.

Radomski M. W. and Moncada S. – The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **344**:251-264, 1993.

Radomski M. W., Rees D. D., Dutra A. and Moncada S. – S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:745-749, 1992.

Radomski M. W., Palmer R. M. and Moncada S. – The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **13**:1482-1489, 1987.

Radomski M. W., Palmer R. M. and Moncada S. – Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, **2**:1057-1058, 1987.

Rajfer J., William J., Aronson W. J., Peggy A., Bush P. A., Frederick J., Dorey F. J. and Ignarro L. J. – Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *N. Eng. J. Med.*, **326**:90-94, 1992.

Rajfer J., Canan V., Dorey F. J. and Mehringer C. M. – Correlation between penile angiography and duplex scanning of cavernous arteries in impotent men. *J. Urol.*, **143**:1128-1130, 1990.

Rajfer J., William J., Aronson W. J., Peggy A., Bush P. A., Frederick J., Dorey F. J. and Ignarro L. J. – Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, **326**:90-94, 1992.

Ramasay B., Radomski M., De Belder A., Martin J. F. and Lopez-Jaramillo P. – Systemic effects of S-nitrosoglutathione in the human following intravenous infusion. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**:101-102, 1995.

Rampin O. – Pharmacology of alpha-adrenoceptors in male sexual function. *Eur. Urol.*, **36**:103-106; 1999.

Rampin O. and Giuliano F. – Brain control of penile erection. *World J. Urol.*, **19**:1-

8, 2001.

Rand J. – Nitroergic transmission: nitric oxide as a mediator of non adrenergic, non cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **19**:147-153, 1992.

Raymond J., Alison C., J. Riezebos, J. Collier and Patrick V. – Relative potency and arteriovenous selectivity of nitrovasodilators on human blood vessels: An insight into the targeting of nitric oxide delivery. *J. Urol.*, **273**:154-160, 1995.

Rees D. D., Palmer R. M. and Moncada S. – Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **86**:3375-3378, 1989.

Rees D. D., Palmer R. M., Hodson H. F. and Moncada S. – A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.*, **96**:418-424, 1989.

Rees R. W., Ralph D. J., Royle M., Moncada S. and Celtek S. – Y-27632, an inhibitor of Rho-Kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.*, **133**:455-458, 2001.

Reeves J. J., Bunce K. T., Sheldrick R. L. and Stables R. – Evidence for the PGE-receptor subtype mediating inhibition of acid secretion in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **95**:805, 1988.

Regan W., Bailey J., Pepperl J., Pierce L., Bogardus M., Donnelly E., Fairbairn E., Kedzie M., Woodward F. and Gil W. – Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP₂ subtype. *Mol. Pharmacol.*, **46**:213-220, 1994.

Reilly C. M., Stopper V. S. and Millis TM. – Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. *J. Androl.*, **18**:26-31, 1997.

Ribé N., Vives A., Jurado C., Rajmil O. and Pommerol J. M. – Aceptabilidad del autoinyector con fármacos vasoactivos en el tratamiento de la disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.*, **52**:973-977, 1999.

Ribé N., Rajmil O., Bassas L., Jurado C. y J. M. Pomerol. – Respuesta a la administración de tres fármacos diferentes en el mismo grupo de pacientes con disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.*, **54**:355-359, 2001.

Richter S., Vardi Y., Ringel A., Shalev M. and Nissenkorn I. – Intracavernosous injections: still the goal standard for treatment of erectile dysfunction in elderly men. *Int. J. Impot. Res.*, **13**:172-175, 2001.

Riehmman M., Gasser T. C. and Reginald C. Bruskewitz – The hydroflex penile prothesis: a test case for the introduction of new urological technology. *J. Urol.*, **149**:1304-1307, 1993.

Rivas A. and Salzman K. – Comparison of erectile response to intraurethral, topical and intracorporal pharmacotherapy in the rat model of spinal cord injury. *J. Urol.*, **151**:495, 1994.

Robertson P. R. – Characterization and regulation of prostaglandin and leukotriene receptors: an overview. *Prostaglandins*, **31**:395-411, 1986.

Rodriguez-Vela L., Gonzalvo Ibarra A., Gil Martinez P., Benejan Gual J., Cuesta Presedo J. M. and Rioja Sanz L. A. – Long-term results of the treatment with intracavernous injection of vasoactive drugs. *Arch. Esp. Urol.*, **49**:257-269, 1996.

Rolo F. and Requixa A. – Erectile dysfunction. Its diagnosis and treatment. *Acta Med. Port.*, **12**:35-38, 1999.

Rudi Busse, G. Edwards, M. Félétou, Ingrid Fleming, Paul M. Vanhoutte and Arthur H. Weston. – EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacol. Sciences*, **23**:374-380, 2002.

Rump C. and Schollmeyer P. – Effects of endogenous and synthetic prostanoids, the thromboxan A₂ receptor agonist U46619 and arachidonic acid on noradrenaline release and vascular tone in rat isolated kidney. *Br. J. Pharmacol.*, **97**:819, 1989.

Sachs B. D. and Yan-Cheng Liu – Maintenance of erection of penile glans but not penile body, after transection of rat cavernous nerves. *J. Urol.*, **146**:900-905, 1991.

Saenz de Tejada I., Blanco R., Goldstein I., Azadzoi K., de las Morenas A., Krane R. and Cohen A. – Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am. J. Physiol.*, **254**:H459-467, 1988.

Saenz de Tejada I. – Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility. *Int. J. Impot. Res.*, **14**:6-10, 2002.

Saenz de Tejada I., Carson P., de las Morenas A., Goldstein I. and Traish M. – Endothelin: localization, synthesis, activity and receptor types in the human penile

corpus cavernosum. *Am. J. Physiol.*, **261**:1078-1086, 1991.

Saenz de Tejada I., Carson P., Taylor L., Polgar P. and Goldstein I. – Prostaglandin production by human corpus cavernosum endothelial cells (HCC-EC) in culture. *J. Urol.*, **139**:252, 1988.

Saenz de Tejada I. and Kim N. – Nitric oxide as a modulator of penile erection. *Current Opin. Urol.*, **2**:446-449, 1992

Saenz de Tejada I., Kim N., Lagan I., Krane R. J. and Goldstein I. – Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J. Urol.*, **142**:1117-1121, 1989.

Saenz de Tejada I., Cuevas P., Fernandez A., Gabancho S., Ruiz-Castañé E., Pomerol J. M., Puigvert A., Rajmil O., Rosselló M. and Ney P. – Characterization of prostanoid receptors regulating arterial and trabecular penile smooth muscle contractility. *Int. J. Imp. Res.*, **10**:65, 1998.

Saenz de Tejada I., Goldstein I., Azadzoi M., Krane J. and Cohen R. – Impaired neurogenic and endothelium-dependent relaxation of human penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N. Engl. J. Med.*, **320**:1025-1030, 1989.

Saenz de Tejada I., Kim N. N., Goldstein I. and Traish A. M. – Regulation of pre-synaptic alpha adrenergic activity in the corpus cavernosum. *Int. J. Impot. Res.*, **12**:20-25, 2000.

Saenz de Tejada I., Angulo J., Cuevas P., Fernandez A., Moncada I., Allona A., Lledó E., Korschen H. G., Niewohner U., Haning H., Pages E. and Bischoff E. – The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int. J. Imp. Res.*, **13**:282-290, 2001.

Saenz de Tejada I. and Moreland B. – Physiology of erection, pathophysiology of impotence and implications of PGE₁ in the control of collagen synthesis in the corpus cavernosum. In: *The Role of Alprostadil in the Diagnosis and Treatment of Erectile Dysfunction*. Edited by I. Goldstein and T. Lue. Princeton:Excerpta Medica, 3-16, 1993.

Saenz de Tejada I., Moroukian P., Tessier J., Kim J., Goldstein I. and Frohrib D. – The trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am. J. Physiol.*, **260**:1590-1597, 1991.

Saenz de Tejada I., Ware J. C., Blanco R., Pittard J. T., Naging P. W., Azadzoi K. M., Krane R. I. and Goldstein I. – Pathophysiology of prolonged penile erection

associated with trazodone use. *J. Urol.*, **145**:160 -164, 1991.

Salmi P. and Ahlenius S. – Evidence for functional interactions between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in rat thermoregulatory mechanisms. *Pharmacol. Toxicol.*, **82**:122-127, 1998.

Sandra Filippi, Sandra Amerini, Mario Maggi, Alessandro Natali and Fabrizio Ledda – Studies on the mechanisms involved in the ATP-induced relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, **161**: 326-331, 1999.

Sanner J. H. – Antagonism of prostaglandin E₂ by 1-acetyl-2-(8-chloro-10,11-dihydrobenz-oxazepine-10-carbonyl) hidrazine. *Arch. Int. Pharmacol. Ther.*, **18**:46-56, 1969.

Sato Y. – Effect of the nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behavior in rats. *Ann. J. Physiol.*, **274**:243-247, 1998.

Sato Y., George C., Hiroki H., Hideki A., Noriyoshi S. and Tsukamoto T. – The effects of alterations in nitric oxide levels in the paraventricular nucleus on copulatory behavior and reflexive erections in male rats. *J. Urol.*, **162**:2182-2185, 1999.

Sato Y., Zhao W. and Christ G. J. – Central modulation of the NO / cGMP pathway affects the MPOA-induced intracavernous pressure response. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.*, **281**:R269-278, 2001.

Schenk G., Melman A. and Christ G. – Gene therapy: future therapy for erectile dysfunction. *Cur. Urol. Rep.*, **2**:480-487, 2001.

Senior J., Sancha R., Baxter G., Marshall K. and Clayton J. K. – In vitro characterisation of prostanoid FP, DP, IP and TP receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:215-221, 1992.

Senior J., Marshall K., Sangha R., Baxter G. and Clayton J. K. – In vitro characterisation of prostanoid EP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **102**:747-753, 1991.

Shenfeld O., Hanani J., Shalhav A., Vardi Y. and Goldwasser B. – Papaverine-phentolamine and prostaglandin E₁ versus papaverine-phentolamine alone for intracorporal injection therapy: a clinical double-blind study. *J. Urol.*, **154**:1017-1019, 1995.

Schmidt K., Klatt P. and Mayer B. – Hypercholesterolemia is associated with a

reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. *Arterioscler. Thromb.*, **13**:1159-1163, 1993.

Schoror K., Davis H., Matzky R. and Ohlendorf R. – The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivate (ZK36374) – equipotent to PGI₂ in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **316**:252-255, 1981.

Senior J., Sangha R., Baxter G. S., Marshall K. and Clayton J. K. – In vitro characterization of prostanoid FP, DP, IP and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:215-221, 1992.

Shimokawa H., Tsutsui M., Mizuki T., Hase K., Kuwaoka I., Nogami N., Okamatsu S. and Nakanishi K. – Endothelial Gi protein expression is markedly low in human coronary microvessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **27**:297-302, 1996.

Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M. K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K., Fujishima M. and Takeshita A. – The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**:703-711, 1996.

Shio H. and Ramwell P. W. – Prostaglandin E₁ stimulation of human platelet aggregation. *Physiol.*, **14**:230-232, 1971.

Shio H. and Ramwell P. W. – Prostaglandin E₁ and E₂: qualitative difference in platelet aggregation. In: *Prostaglandins in Cellular Biology*: **77-92**, 1972.

Shirai M., Maki A., Takanami M., Ando K., Nakamura K., Yanaihara N., Yanaihara C., Iguchi K., Fujita T. and Iwanaga T.— Content and distribution of vasoactive intestinal polypeptide in cavernous tissue of human penis. *Urology*, **35**:360-363, 1990.

Sibley D. R. – New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**:313-341, 1999.

Siegl A. M., Smith J. B., Silver M. J., Nicolagu K. C. and Ahern D. – Selective binding site for prostacyclin on platelets. *J. Clin. Invest.*, **63**:215-220, 1979.

Simonsen U. – Interactions between drugs for erectile dysfunction and drugs for cardiovascular disease. *Int. J. Impot. Res.*, **14**:178-188, 2002.

Simonsen U., Contreras J., Garcia-Sacristan A. and Martinez A. C. – Effect of

sildenafil on non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in bovine penile small arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, **412**:155-169, 2001.

Simonsen U., Prieto D., Hernandez M., I. Saenz de Tejada and Garcia-Sacristan A. - Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrenergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. *J. Urol.*, **157**:2356-2360, 1997.

Simonsen U., Prieto D., Hernandez M., I. Saenz de Tejada and Garcia-Sacristan A. – Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin. Sci.*, **92**:269-275, 1997.

Simonsen U., Garcia-Sacristan A. and Prieto D. – Penile arteries and erection. *J. Vasc. Res.* **39**:283-303, 2002.

Simonsen U., Prieto D., I. Saenz de Tejada and Garcia-Sacristan A. – Involvement of nitric oxide in the non adrenergic non cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+)-channels. *Br. J. Pharmacol.*, **116**:2582-2590, 1995.

Simonsen U., Triguero D., Garcia-Sacristan A. and Prieto D. – Cholinergic modulation of non-adrenergic non-cholinergic relaxation in isolated, small coronary arteries from lambs. *Pflugers Arch.*, **438**:177-186, 1999.

Siraj Q. H., Hilson A. J. W., Bomanji J. and Manzor A. - Volume-dependent intracavernous hemodilution during pharmacologically induced penile erections. *J. Urol.*, **148**:1441-1443, 1992.

Skagerberg G., Lindvall O. – Organization of dienecephalic dopamine neurons projecting to the spinal cord of the rat. *Brain Res.*, **342**: 340-341, 1985.

Skuballa W., raduchel B. and Vorbr-ugger H. – Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost. In. *Prostacyclin and its stable analogue iloprost*, 17-24, 1985.

Smith W. C. – The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.*, **259**:315-324, 1989.

Soderling S. H., Bayuga S. J. and Beavo J. A. – Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE 10A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **8**:7071-7076, 1999.

Soderling S. H., Bayuga S. J. and Beavo J. A. – Identification and

characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.*, **19**:15553-15558, 1998.

Soderdhal D. and Hansberry L. – Erectil dysfunction following resection transuretral of the prostate. *J. Urol.*, **156**:1354-1356, 1996.

Somhyo A. P. and Somhyo A. V. – Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.*, **522**:177-185, 2000.

Sonnenburg W. K. and Smith W. L. – Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J. Biol. Chem.*, **263**:6155-6160, 1988.

Sonnenburg W. K., Zhun J. and Smith W. L. – A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J. Biol. Chem.*, **265**:8479-8483, 1990.

Sparwasser C., Drescher P., Will J. A. and Madsen P. O. – Smooth muscle tone regulation in the rabbit cavernosal and spongiosal tissue by cyclic AMP and cyclic GMP-dependent mechanisms. *J. Urol.*, **152**:2159-2163, 1994.

Spektor M., Rodriguez R., Rosenbaum R. S., Wang Hong-Zang, Melman A. and Christ G. J. - Potassium channels and human corporal smooth muscle cell tone: further evidence of the physiological relevance of the maxi-K channel subtype to the rgulation of human corporeal smooth muscle tone in vitro. *J. Urol.*, **167**:2628-2635, 2002.

Stacey P., Rulten S., Dapling A. and Phillips S. C. – Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). - *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **247**:249-254, 1998.

Steers W. D. – Neural control of penile erection. *Semin. Urol.*, **8**:66-79, 1990.

Steers W. D. – Neural pathways and central sites involved in penile erection: neuroanatomy and clinical implications. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **24**:507-516, 2000.

Steers W. D., Guay T., Leriche A., Gingell C., Hargreave B., Wright J., Price E. and Feldman A. – Assessment of the efficacy and safety of Viagra (sildenafil citrate) in men with erectile dysfunction during long-term treatment. *Int. J. Imp. Res.*, **13**:261-267, 2001.

Stephen B., Clive G., Kim T., Leigh T., Mary P. and Naylor A. – Effects of

sildenafil on the relaxation of human corpus cavernous tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *J. Urol.*, **159**:2164-2171; 1998.

Stief C. G. – Phosphodiesterase isoenzyme of the human cavernous tissue and its functional significance. *Act. Urol.*, **26**:22-24, 1995.

Stief C. G., Benard F., Bosch R. J. H., Aboseif S. R., Lue T. F. and Tanagho E. A. – A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis. *J. Urol.*, **143**:392-397, 1990.

Stief C. G., Benard F., Bosch R. J. H., Aboseif S. R., Lora N. Lue T. F. and Tanagho E. A. – Acetylcholine as a possible neurotransmitter in penile erection. *J. Urol.*, **141**:1444-1448, 1989.

Stief C. G., Holmquist F., Djamilian M., Krah H., Andersson R. E. and Jonas U. – Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J. Urol.*, **148**:1437-1440, 1992.

Stief C. G., Holmquist F., Allhof E. P., Andersson K. E. and Jonas U. – Preliminary report on the effect of the nitric oxide donor SIN-1 on human cavernous tissue in vivo. *World J. Urol.*, **9**:237-239; 1991.

Stief C., Uckert S., Becker A., Truss M. and Jonas U. – The effect of the specific phosphodiesterases (PDE) inhibitors on human and rabbit cavernous tissue in vitro and in vivo. *J. Urol.*, **159**:1390-1393; 1998.

Strong P., Coleman R. A. and Humphrey P. A. – Prostanoid induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP₃-receptors. *Prostaglandins*, **43**:559-566, 1992.

Skagerberg G., Bjorklund A., Lindvall O., Schmidt RH. – Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. *Brain Res. Bull.*, **9**:237-244, 1982.

Sturzebecher C., Habery M., Muller B., Schillinger E., Schroder G., Skuballa W. and Stock G. – Pharmacological profile of ZK 96480, a new chemically and metabolically stable prostacyclin analogue with oral availability and high PG₁₂ intrinsic activity. In *Prostaglandins and other eucosanoids in the cardiovascular system*, 485-491, 1985.

Subirá N. R., Vives A., Jurado C., Rajmil O. y J. M. Pommerol - Aceptabilidad del

autoinyector con fármacos vasoactivos en el tratamiento de la disfunción eréctil. *Arch. Esp. Urol.*, **52**, 9:973-977, 1999.

Sugimoto Y., Namba T., Shigemoto R., Negishi M., Ichikawa A. and Narumiya S. – Distinct cellular localization of the mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am. J. Physiol.*, 1994.

Sugimoto Y., Shigemoto R., Namba T., Negishi M., Misumo N., Narumiya S. and Ichikawa A. – Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience*, 1994.

Taher A., Meyer M., Stief C. G., Jonas U. and Forssmann W. G. – Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human cavernous smooth muscle. *World J. Urol.*, **15**:32-35; 1997.

Taher A., Schulz-Knappe P., Meyer M., Truss M., Forssmann W. G., Stief C. G. and Jonas U. – Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in the human ureter and their functional role in vitro. *World J. Urol.*, **12**:286-291, 1994.

Takahashi S., Takeuchi K. and Okabe S. - EP₄ receptor mediation of prostaglandin E₂-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, **58**:1997-2002, 1999.

Tam P. Y., Keller T., Poppiti R., Gesundheit N., Padma-Nathan H. - Hemodynamic effects of transurethral alprostadil measured by color duplex ultrasonography in men with erectile dysfunction. *J. Urol.*, **160**:1321-1324, 1998.

Tang Y., Rampin O., Calas A., Facchinetti P. and Giuliano F. - Oxytocinergic and serotonergic innervation of identified lumbosacral nuclei controlling penile erection in the male rat. *Neuroscience*, **82**:241-254, 1998.

Tarhan F., Kuyumcuoglu U., Kolsuz A., Ozgul A. and Canguven O. – Cavernous oxygen tension in the patients with erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* **9**:149-153, 1997.

Taylor S. G. – Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br. J. Pharmacol.*, **94**:853-863, 1988.

Teiga T. – Papaverine hydrochloride in peripheral blood and the degree of penile erection. *J. Urol.*, **143**:1135-1137, 1990.

Terney S., Matters C. E., Yoshimura N., Yokayama T., Ozawa H., Tzeng E., Birder L. A., Kanai A. J., Huard J., de Groat W. C. and Chancellor M. B. – Nitric oxide synthase (NOS) gene therapy for erectile dysfunction: comparison between plasmid, adenovirus and adenovirus transduced myoblast vectors. *Mol. Urol.*, **5**:37-43, 2001.

T. Lue – Future treatment for erectil dysfunction: Growth factors and gene therapy. *Int. J. Imp. Res.*, **11**:56-57, 1999.

Tong Y-C, Chen J-T. – Subtyping of $\alpha 1$ – Adrenoceptors responsible for the contractile response in the rat corpus cavernosum. *Neurosci Lett*, **228**:159-162, 1997.

Tordjman G. – NO-PGE₁. Une nouvelle association dans le traitement des dysfonctions éréciles. *Contracept. Fertil. Sex.*, **21**:509-510, 1993.

Torpy T. and C. Page – Phosphodiesterases : the journey towards therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**:157-159, 2000.

Traish A. M., Moreland R. B., Gallant C., Huang Y. H. and Goldstein I. - G-protein-coupled receptor agonists augment adenylyl cyclase activity induced by forskolin in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Recept. Signal Transduct.*, **7**:121-132, 1997.

Traish A., Kim N. N., Moreland R. B. and Goldstein I. - Role of alpha adrenergic receptors in erectile function. *Int. J. Imp. Res.*, **12**:48-63, 2000.

Trigo-Rocha F., Martinez-Piñeiro L., Geng L., von Heyden B., Lue T. and Tanagho E. – Cyclic Guanosine monophosphate mediates penile erection in the rat. *Eur. Urol.*, **24**:492-499, 1993.

Truss C., Becker J., Djamilian M., Stief C. and Jonas U. – Role of the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate (SIN-1) in the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Urology*, **44**:553-556, 1994.

Uckert Stefan, Kuthe A., Jonas U. and Stief C. G. – Characterization and functional relevance of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes of the human prostate. *J. Urol.*, **166**:2484-2490, 2001.

Udelson D., Nehra A, Hatzichristou D. G., Azadzoï K., Moreland R. B., Krane R. J., Saenz de Tejada I. and Goldstein I. – Engineering analysis of penile hemodynamic and structural dynamic relationships: Part I – Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int. J. Impot. Res.*, **10**:15-24,1998.

Udelson D., Nehra A, Hatzichristou D. G., Azadzoï K., Moreland R. B., Krane R. J., Saenz de Tejada I. and Goldstein I. – Engineering analysis of penile hemodynamic and structural dynamic relationships: Part II – Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int. J. Impot. Res.*, **10**:25-35,1998.

Udelson D., Nehra A, Hatzichristou D. G., Azadzoï K., Moreland R. B., Krane R. J., Saenz de Tejada I. and Goldstein I. – Engineering analysis of penile hemodynamic and structural dynamic relationships: Part III – Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int. J. Impot. Res.*, **10**:89-99,1998.

Vallence P., Calver A. and Collier J. – The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *J. Hypertens.*, **10**:25-29, 1992.

Vallence P., Collier J. and Moncada S. - Effect of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, **2**: 997-1000, 1989.

Venkateswarlu K., Giraldi A., Zhao W., Wang H. Z., Melman A., Spektor M. and Christ G. J. - Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: diabetes and relaxation of human corpus cavernosum smooth muscle by adenosine triphosphate sensitive potassium channel openers. *J. Urol.*, **168**:355-361, 2002.

Vick R. N., Benevides M., Patel M., Parivar K., Linnet O. and Carson C. C. - The efficacy, safety and tolerability of intracavernous PNU-83757 for the treatment of erectile dysfunction. *J. Urol.*, **167**:2618-2623, 2002.

Vickers Jr. M. A., Benson C. B. and Jerome P. R. - High resolution ultrasonography and pulsed wave doppler for detection of corporovenous incompetence in erectile dysfunction. *J. Urol.*, **143**:1125-1127, 1990.

Vickers Jr. M. A., Seiler M. and Weidner N. - Corpora cavernous ultrastructure in vascular erectile dysfunction. *J. Urol.*, **143**:1131-1134, 1990.

Virag R. – Intracavernous injection of papaverine for erectile failure. *Lancet*, **23**:938, 1982.

Virag R. – Intracavernous injection of papaverine for erectile failure. 1982. *J. Urol.*, **167**:1196, 2002.

Virag R., Shonkry K., Floresco J., Nolleï F. and Greco E. – Intracavernous self-injection of vaso-active drugs in the treatment of impotence: 8-years experience with 615 cases. *J. Urol.*, **145**:287-292, 1991.

Virag R., Frydman D., Legman M. and Virag H. – Intracavernous injection of papaverine as a diagnostic and therapeutic method in erectile failure. *Angiology*, **35**:79-87, 1984.

Virag R. and Virag H. – Trial of intracavernous papaverine in the treatment of impotence. Therapeutic prospects. *J. Mal. Vasc.*, **84**:293-295, 1983.

von Heyden B., Donatucci C. F., Marshall G. A., Brock G. B. and Lue T. F. – A Prostaglandin E₁ dose-response study in man. *J. Urol.*, **150**:1825-1828, 1993.

Waldman S. A. and Murad F. - Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Reviews*, **39**:163-196, 1987.

Wang C. and Chiang P. – A comparative study with intracavernous injection of prostaglandin E₁ versus papaverine for the diagnosis assessment of erectile impotence. *Int. J. Imp. Res.*, **6**:146-149, 1994.

Wang P., Wu P., Egan R. W. and Billah M. M. – Cloning, characterization and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **276**:1271-1277, 2000.

Watabe A., Sugimoto Y., Honda A., Irie A., Namba T., Neggishi M., Ito S., Narumiya S. and Ichikawa A. – Cloning and expression of cDNA for a mouse EP₁ subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.*, **268**: 20175-20178, 1993.

Weiske W. H. – Long term results in self-injection therapy with PGE₁ in 220 patients. *Int. J. Imp. Res.*, **4**: 87-89, 1992.

Weiske W. H. – Prostaglandin E₁ (PGE₁) in diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **2**:234-236, 1990.

Wespes E. and Schulman C. – The erectile angle: objective criterion to evaluate the papaverine test in impotence. *J. Urol.*, **138**:1171-1714, 1987.

Wespes E. and Schulman C. – Venous impotence: pathophysiology, diagnosis and treatment. *J. Urol.*, **149**:1238-1245, 1993.

Weeslls H. and Williams S. K. – Endothelial cell transplantaion into corpus cavernosum. Basis for efficient gene therapy for erectile dysfunction. *J. Urol.*, **162**:2162-2164, 1999.

Whittle B. J., Moncada S. and Vane J. R. – Comparison of the effects of

prostacyclin (PGI₂), prostaglandin E₁ and D₂ on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins*, **16**:373-388, 1978.

Whittle B. J. and Moncada S. – Platelets actions of stable carbocyclic analogues of prostacyclin. *Circulation*, **72**:1219-1225, 1985.

Whalley E. T. and White S. K. – Effect of PGF₂ α , PGE₂ and ICI 81008 in vivo and in vitro uterus of non-pregnant rats and guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **69**:309-310, 1980.

Wikberg J. E. – Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol. Res.*, **375** :295-310, 1999.

Wikberg J.E. – New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol. Res.*, **42**:393-420, 2000.

Williams D. L. – Molecular biology in atherosclerosis research. *Arteriosclerosis*, **5**:213-227, 1985.

Williams M. B. and Jones H. P. – Calmodulin-dependent NAD kinase of human neutrophils. *Arc. Biochem. Biophys.*, **15**:80-87, 1985.

Wingard C.J. – Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Med.*, **7**:119-122, 2001.

Woodward D. F., Burke J. A., Williams L. S., Palmer B., Wheeler L. A., Woldemussie E., Ruiz G. and Chen J. – Prostaglandin F₂ α , effects on intra ocular pressure negatively correlate with FP-receptor stimulation. *Invest. Ophthalm. Sci.*, **30**:1838-1842, 1989.

Yamagishi T., Yanagisawa T. and Taira N. – activation of phospholipase C by the agonist U46619 is inhibited by cromakalin-induced hyperpolarisation in porcine coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **187**:1517-1522, 1992.

Zeiger A. M., Drexler H., Wollschlager H. and Just H. – Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*, **84**:1984-1992, 1991.

Zorgnotti A. and Lefleur R. S. - Auto-injection of the corpus cavernosum with a vasoactive drug combination for vasculogenic impotence. *J. Urol.*, **133**:39-41, 1985.

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFIA