

Administração de BAY 41-2272 previne disfunção vesical em ratos deficientes de óxido nítrico

Administration of BAY 41-2272 prevents bladder dysfunction in nitric-oxide deficient rats

Carlos Arturo Levi D'Ancona¹, Fabíola Zakia Taufic Mónica², Ricardo Reges³, David Cohen⁴, Fabio Henrique da Silva⁵, Gilberto De Nucci⁶, Edson Antunes⁷

RESUMO

Objetivo: avaliar os efeitos protetores do BAY 41-2272, um ativador solúvel da guanilato ciclase, sobre alteração dos parâmetros citométricos em ratos deficientes de óxido nítrico (NO). **Métodos:** os ratos foram divididos nos seguintes grupos: (a) controle; (b) DMSO (c) L-NAME; (d) BAY 41-2272 isolado; (e) L-NAME + BAY 41-2272. O bloqueador da NO-sintase L-NAME (20 mg/rato/dia) foi ministrado na água de beber, concomitantemente ou não com o BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia, ministrado por gavagem). **Resultados:** o tratamento crônico com L-NAME aumentou de forma acentuada a pressão arterial média, e o co-tratamento com BAY 41-2272 quase reverteu o aumento na pressão arterial média induzido por L-NAME. Contrações não esvaziadoras da bexiga mostraram-se significativamente aumentadas no grupo L-NAME ($0,90 \pm 0,1$ número/minuto) comparadas com DMSO ou grupo controle ($0,49 \pm 0,1$ número/minuto), que foram evitadas pelo co-tratamento com BAY 41-2272 ($0,56 \pm 0,25$ número/minuto; $p < 0,05$). O limiar e o pico de pressão aumentaram em 70 e 44%, respectivamente, após o tratamento crônico com L-NAME, enquanto o co-tratamento com BAY 41-2272 atenuou muito ambos os efeitos (27 e 22% de aumento, respectivamente). A frequência de ciclos de micção diminuiu em 50% nos ratos tratados com L-NAME em comparação aos animais controle; o cotratamento com BAY 41-2272 normalizou esse parâmetro. **Conclusões:** nossos dados mostram que a administração oral a longo prazo de BAY 41-2272 contrapõe-se à disfunção de bexiga vista em ratos deficientes de NO, o que sugere que a restauração da via da NO-cGMP por esse composto pode ter valor benéfico para tratar sintomas vesicais.

Descritores: Guanilato ciclase; Óxido nítrico; Bexiga urinária hiperativa; Ratos

ABSTRACT

Objective: to evaluate the protective effects of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase activator, on changes in cystometric parameters in rats deficient in nitric oxide (NO). **Methods:** Rats were divided into the following groups: (a) control; (b) DMSO; (c) L-NAME; (d) BAY 41-2272 alone; (e) L-NAME + BAY 41-2272. The NO synthase blocker L-NAME (20 mg/rat/day) was given in drinking water concomitantly or not with BAY 41-2272 (10 mg/kg/day, given by gavage). **Results:** Chronic L-NAME treatment markedly increased the mean arterial blood pressure, and co-treatment with BAY 41-2272 nearly reversed L-NAME-induced rise on mean arterial blood pressure. Non-void contractions were significantly increased in L-NAME group (0.90 ± 0.1 number/minute) compared with either DMSO or control group (0.49 ± 0.1 number/minute), which were prevented by co-treatment with BAY 41-2272 (0.56 ± 0.25 number/minute; $p < 0.05$). The threshold and peak pressure increased by 70 and 44%, respectively, after chronic L-NAME treatment, while co-treatment with BAY 41-2272 largely attenuated both effects (27 and 22% increase, respectively). The frequency of micturition cycles decreased by about of 50% in L-NAME-treated rats compared with control animals, and co-treatment with BAY 41-2272 normalized this parameter. **Conclusions:** Our data show that long-term oral administration of BAY 41-2272 counteracts the bladder dysfunction seen in NO-deficient rats, indicating that restoration of the NO-cGMP pathway by this compound may be of beneficial value to treat bladder symptoms.

Keywords: Guanylate cyclase; Nitric oxide; Urinary bladder, overactive; Rats

Trabalho realizado no Departamento de Farmacologia e na Disciplina de Urologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

¹ Professor Titular da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil

² Doutora pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

³ Doutor pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

⁴ Médico urologista, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

⁵ Mestre pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

⁶ Professor Titular da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

⁷ Livre-docente; Professor da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (SP), Brasil.

Autor correspondente: Carlos Arturo Levi D'Ancona – Rua Dr. Miguel Penteadó, 1.073 – Jardim Chapadão – CEP: 13070118 – Campinas (SP), Brasil – Tel.: 19 3242-2488 – E-mail: cdancona@uol.com.br

Data de submissão: 26/03/2010 - Data de aceite: 11/10/2010

INTRODUÇÃO

As vias neurais que controlam a função do trato urinário inferior são organizadas como simples circuitos ligadas-desliga, que mantêm uma relação recíproca entre a bexiga urinária e o meato uretral. As medidas da pressão intravesical durante o enchimento vesical em humanos e animais revelaram pressões vesicais baixas e relativamente constantes quando o volume urinário era inferior ao limiar para induzir a micção. Durante o enchimento vesical, a atividade do esfíncter uretral aumenta e, portanto, eleva a resistência à saída que contribui para a manutenção da continência urinária⁽¹⁾.

A via de sinalização óxido nítrico (NO)-cGMP desempenha um papel crucial na regulação de vários processos fisiopatológicos em mamíferos. No trato urinário inferior, a atividade da NO sintase foi detectada no urotélio, músculo liso, músculo estriado, nervos e vasos sanguíneos^(2,3). A ativação da via de sinalização NO-cGMP em geral resulta em respostas inibidoras ao nível da uretra e esfíncter uretral, assim como do músculo liso detrusor (MLD)⁽⁴⁻⁶⁾. Algumas evidências sugerem que a alteração da via de sinalização NO-cGMP contribui para a hiperatividade vesical⁽¹⁾. Bexigas dilatadas hipertróficas e meatos uretrais disfuncionais foram encontrados em camundongos com deleção dirigida do gene para a NO sintase neuronal⁽⁷⁾. A deleção do gene para a proteína quinase I dependente de cGMP (cGKI) também exibiu um padrão de micção irregular e caracterizado por frequentes contrações esvaziadoras e não esvaziadoras, assim como intervalos mais curtos entre as contrações⁽⁸⁾. Recentemente, demonstramos que o tratamento durante quatro semanas com o bloqueador da NO sintase L-NAME causa hipersensibilidade do MLD *in vitro* aos agonistas muscarínicos por meio de aumentos nos níveis de [³H]-inositol-fosfato, acompanhada por reduções do relaxamento do MLD mediadas por receptor β_3 adrenérgico⁽⁹⁾.

A guanilil ciclase solúvel (sGC) é uma enzima de transdução do sinal amplamente distribuída que, sob a ativação pelo óxido nítrico (NO), converte GTP no segundo mensageiro cGMP, o qual exerce seu efeito ativando as proteínas quinase I e II dependentes de cGMP, canais iônicos controlados por cGMP e/ou fosfodiesterases reguladas por cGMP. Os ativadores da sGC não dependentes do NO surgiram como ferramentas valiosas para elucidar a fisiopatologia da via de sinalização NO-sGC-cGMP. BAY 41-2272, conhecido como potente estimulador da sGC não dependente de NO⁽¹⁰⁾, causa relaxamento de vários músculos lisos vasculares *in vitro*⁽¹¹⁻¹³⁾. Esse composto também previne a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos⁽¹⁰⁾, assim como o infarto do miocárdio e hipertrofia de cardiomiócitos em ratos sob bloqueio crônico do NO⁽¹⁴⁾. Nas preparações

uretrais em porcos e coelhos *in vitro*, o composto YC-1 (relatado como potente estimulador da sGC não dependente de NO) e o composto BAY 41-2272 causam relaxamentos dependentes da concentração^(15,16). Recentemente, BAY 41-2272 demonstrou relaxar o MLD *in vitro* de modo significativo devido ao acúmulo de cGMP, e um mecanismo adicional envolvendo o bloqueio da entrada de Ca²⁺ independentemente da produção de cGMP também foi relatado⁽¹⁷⁾. Entretanto, não há estudos que investiguem os possíveis efeitos benéficos de BAY 41-2272 em condições de disfunção vesical. Portanto, neste estudo, projetamos experimentos para avaliar inicialmente os efeitos do tratamento crônico com o bloqueador da NO sintase, o L-NAME, nos parâmetros cistométricos e, em segundo lugar, os efeitos benéficos do tratamento oral em longo prazo com BAY 41-2272 na disfunção vesical de ratos cronicamente deficientes de NO.

MÉTODOS

Animais

Os protocolos experimentais foram aprovados pelos Princípios Éticos em Pesquisa Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram usados ratos machos Wistar (220 - 310 g). O peso corporal e a pressão arterial sistólica foram avaliados semanalmente durante quatro semanas com o uso de método modificado do manguito na cauda, em animais conscientes.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 5 cada), como se segue:

- (1) Controle: ratos que receberam apenas água da torneira durante quatro semanas;
- (2) 80% DMSO: ratos que receberam gavagem oral diária com sulfóxido de dimetila a 80% (DMSO) durante quatro semanas;
- (3) L-NAME: ratos que receberam L-NAME (20 mg/rato/dia, administrado na água de beber mais gavagem oral diária de DMSO 80% durante quatro semanas);
- (4) L-NAME + BAY 41-2272: ratos que receberam concomitantemente L-NAME (20 mg/rato/dia, administrado na água de beber) e BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia, dissolvido em DMSO 80% e administrado por gavagem oral diária) durante 4 semanas;
- (5) BAY 41-2272: ratos que receberam BAY 41-2272 isoladamente (10 mg/kg/dia dissolvido em DMSO 80%, administrado por gavagem oral diária) durante 4 semanas.

O volume de água bebido por cada rato foi de, aproximadamente, 50 ml/rato/dia. As doses de L-NAME e BAY 41-2272 foram escolhidas de acordo com nossos estudos prévios^(14,18).

Cistometria em ratos anestesiados

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretano (1,2 g/kg) e a artéria carótida foi canalizada para monitoramento da pressão arterial média. Foi realizada uma incisão de 1 cm ao longo da linha média do abdome. A bexiga foi exposta e uma agulha tipo *butterfly* (19 G) foi inserida na cúpula vesical e conectada a um transdutor de pressão e a uma bomba de infusão. Antes de iniciar a cistometria, a bexiga foi esvaziada. A cistometria contínua (CMGs) foi realizada com a infusão de solução salina na bexiga dos ratos a uma velocidade de 4 ml/hr. Foram avaliados os seguintes parâmetros: limiar de pressão (TP) em que a micção iniciava; pressão de pico (PP) durante a micção; limiar de volume (VT), que foi calculado pelo tempo necessário para a primeira micção x 4 (ml)/60 minutos; frequência de micção calculada como ciclos por minuto (FM); pressão vesical basal (BP); complacência (Δ Volume/ Δ Pressão) e número de contrações não esvaziadoras (NVCs). As NVCs foram consideradas como contrações vesicais espontâneas maiores que 4 mmHg acima da pressão basal e que não resultaram em micção.

Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de *n* experimentos. O programa InStat (GraphPad Software, Inc.) foi usado para a análise estatística. A significância estatística das diferenças foi estudada pela análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, o método de Bonferroni foi empregado. $P < 0.05$ foi aceito como significativo.

Drogas

L-NAME (N-Nitro-L-arginina metil éster), uretano e dimetilsulfóxido foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA). O composto BAY 41-2272 (5-ciclopropil-2-[1-(2-fluoro-benzila)-1H-pirazolo[3,4-b] piridina-3-yl]-pirimidina-4-ilamina) foi fornecido pelo Pharma Research Center, Bayer AG (Wuppertal, Alemanha).

RESULTADOS

Pressão arterial média e peso corporal

A Figura 1 mostra que o tratamento durante quatro semanas com L-NAME aumentou em 75% a pressão arterial média (PAM) em comparação com o grupo

controle. O cotratamento com BAY 41-2272 evitou a hipertensão induzida por L-NAME ($p < 0,001$). Os animais que receberam apenas BAY 41-2272 não mostraram qualquer diferença na PAM em comparação com o grupo controle. Não houve diferenças no peso corporal entre os grupos experimentais (318 \pm 10; 313 \pm 5; 312 \pm 6; 314 \pm 18 e 310 \pm 5 g para os grupos controle, DMSO, L-NAME, BAY 41-2272 e LN+ BAY 41-2272, respectivamente).

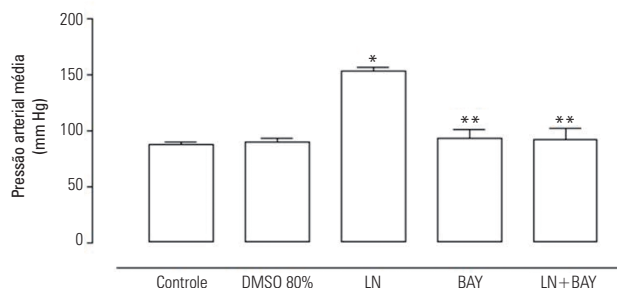


Figura 1. Efeito de BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia) na hipertensão arterial média induzida por administração crônica de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 20 mg/rato/dia) em ratos. A pressão arterial média foi medida ao final da 4ª semana nos grupos Controle, DMSO80%, L-NAME (LN), BAY e LN+BAY. Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n = 5$). * $P < 0,001$ comparado ao grupo controle, ** $p < 0,001$ comparado ao grupo L-NAME (LN).

Cistometria vesical

O tratamento a longo prazo com L-NAME causou aumento significativo no número de NVCs em comparação aos grupos controle ou DMSO ($p < 0,001$). O cotratamento com BAY 41-2272 quase normalizou essas contrações vesicais espontâneas durante a fase de enchimento em comparação com o grupo L-NAME ($p < 0,05$; Figura 2A). O VT também estava significativamente elevado nos ratos tratados com L-NAME ($p < 0,001$), e o cotratamento com BAY 41-2272 não alterou significativamente esse parâmetro (Figura 2B).

A BP não mudou significativamente entre os grupos (Figura 3A). Entretanto, a TP e a PP aumentaram 69 e 44%, respectivamente, após o tratamento crônico com L-NAME ($p < 0,001$) em comparação com os grupos controle ou DMSO (Figuras 3B e 3C). O cotratamento com BAY 41-2272 quase normalizou ($p < 0,001$) a TP e PP elevadas observadas no grupo L-NAME. A Figura 4 mostra traços típicos de contrações espontâneas durante a fase de enchimento dos ciclos miccionais, indicando a PP durante a micção em todos os grupos experimentais.

A frequência miccional diminuiu significativamente nos ratos tratados com L-NAME em comparação com os grupos controle ou DMSO ($p < 0,001$; Figura 5A). A coadministração com BAY 41-2272 preveniu a redução na frequência de micção encontrada no grupo L-NAME (LN). A complacência não foi alterada nos grupos experimentais (Figura 5B).

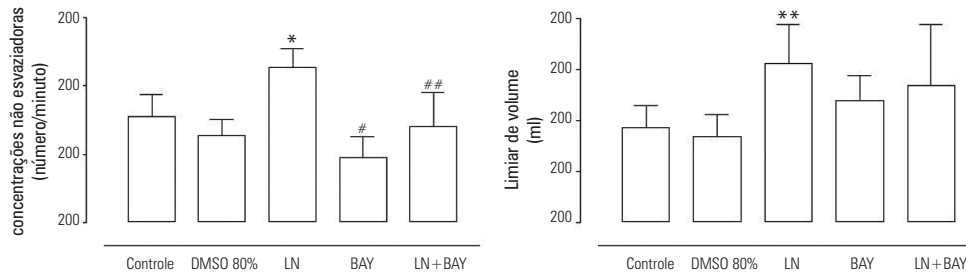


Figura 2. Alterações nas contrações não esvaziadoras (A) e limiar de volume (B) após tratamento a longo prazo com BAY 41-2242 (10 mg/kg/dia) em ratos cronicamente tratados com N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 20 mg/rato/dia). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n = 5). *P < 0,01, **p < 0,001 comparado ao grupo controle, #p < 0,001, ##p < 0,05 comparado ao grupo L-NAME (LN).

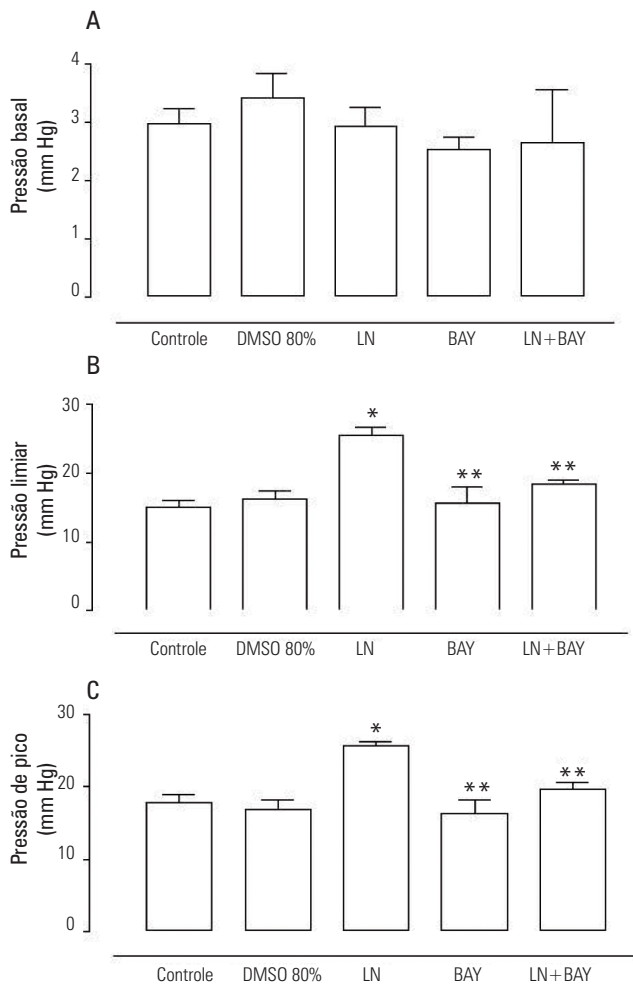


Figura 3. Alterações na pressão basal (A), limiar (B) e de pico (C) após tratamento a longo prazo com BAY 41-2242 (10 mg/kg/dia) em ratos cronicamente tratados com L-NAME (LN; 20 mg/rato/dia). Os resultados são expressos como média \pm EPM (n = 5). *P < 0,001 comparado ao grupo controle, **p < 0,001 comparado ao grupo L-NAME (LN).

DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a mostrar que o bloqueio crônico do NO causa aumentos significativos nas NVCs, TP e PP, juntamente com reduções na frequência das micções. O cotratamento com BAY 41-2272 restaurou

todos esses parâmetros cistométricos para os valores iniciais.

As alterações patológicas causadas pela deficiência crônica do NO são bem documentadas nas doenças cardiovasculares. Entretanto, não há estudos avaliando o efeito da deficiência crônica de NO no trato urinário inferior. Na verdade, a maioria dos estudos funcionais relata o uso de inibidores da NO sintase administrada de forma aguda nos animais⁽⁵⁾, ou adicionada *in vitro* a preparações de banho de órgãos (MLD estimulado eletricamente)⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Neste estudo, em ratos submetidos à cistometria contínua, demonstramos que o tratamento crônico com L-NAME aumentou significativamente NVCs, VT, TP e PP. O tratamento crônico com L-NAME também diminuiu a frequência de micções em comparação com os animais controles. Nossos achados são consistentes com um estudo prévio demonstrando que a inibição aguda do NO elimina completamente o reflexo de relaxamento uretral durante a micção em ratos, e esse efeito foi revertido pela administração do substrato para a síntese de NO, a L-arginina⁽⁵⁾. A inibição aguda da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em ratas ooforectomizadas também reduziu significativamente a frequência de micções, o que ocorreu juntamente com aumento do volume residual⁽²¹⁾. Um estudo mais recente mostrou que camundongos machos mutantes *Imp2l* (animais com baixa biodisponibilidade de NO em razão da produção de espécies de oxigênio altamente reativo) exibem menor volume miccional e maior volume pós-miccional do que camundongos do tipo selvagem⁽²²⁾. Estudos morfométricos mostraram que o tratamento com L-NAME durante quatro semanas causou aumento da espessura da musculatura lisa do trígono vesical sem alterar a espessura do MLD⁽⁹⁾. A densidade de nervos imunorreativos à sintase do NO também é maior na musculatura lisa do trígono vesical e uretra do que no MLD⁽²³⁾. Portanto, é provável que a falta de NO, principalmente no nível da uretra, resulte em estado de intensa contração, dessa maneira reduzindo a liberação da urina.

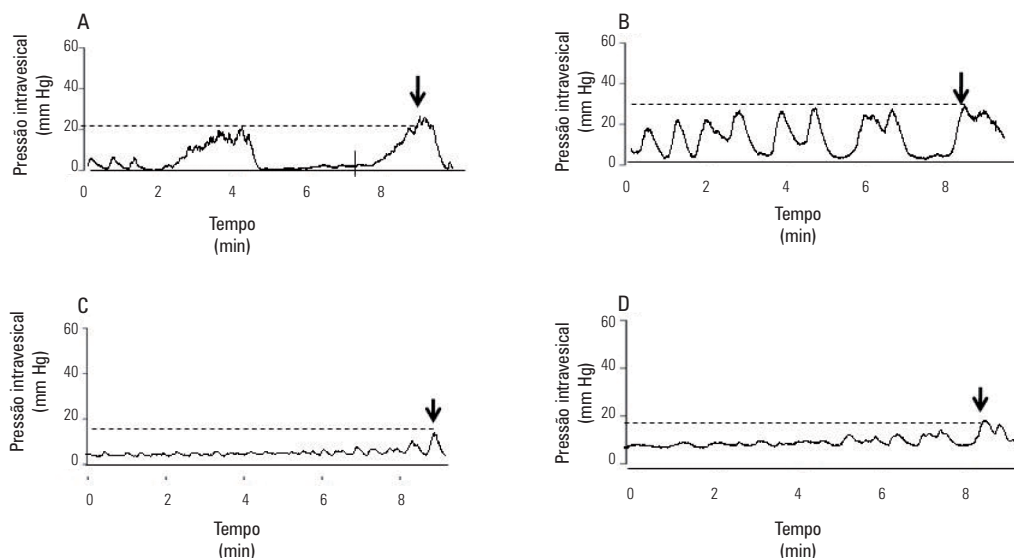


Figura 4. Traços representativos mostram contrações espontâneas e pressão de pico (seta) durante a fase de enchimento para os grupos (A) DMSO, (B) L-NAME (LN; 20 mg/rato/dia), (C) BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia) e (D) LN + BAY 41-2272.

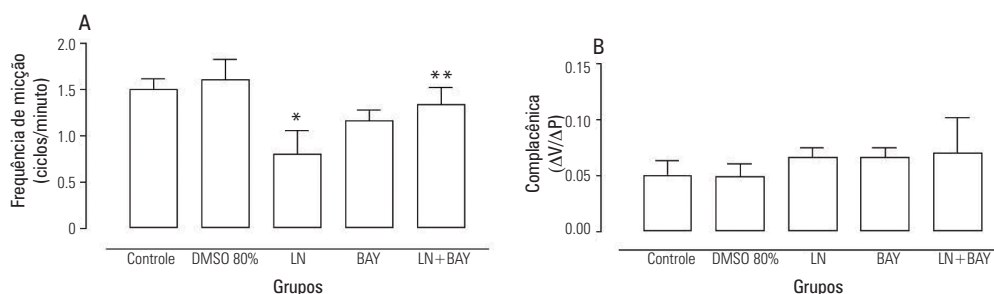


Figura 5. Alterações na frequência de micção (A) e complacência (B) após tratamento a longo prazo com BAY 41-2272 (10 mg/kg/dia) em ratos cronicamente tratados com L-NAME (LN; 20 mg/rato/dia). Os resultados são expressos como média \pm EPM ($n = 5$). * $P < 0,001$ comparado ao grupo controle, ** $p < 0,01$ comparado ao grupo L-NAME (LN).

Os benefícios do tratamento de longo prazo com BAY 41-2272 foram relatados anteriormente no sistema cardiovascular, no qual o agente evitou aumento da pressão arterial, infarto do miocárdio e hipertrofia cardiovascular em um modelo de hipertensão com baixo NO em ratos⁽¹⁴⁾. Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório também mostraram que o BAY 41-2272 relaxa a uretra isolada de maneira dependente da concentração, sinergicamente como inibidor da fosfodiesterase-5, a sildenafil⁽¹⁶⁾. Neste estudo, o co-tratamento com BAY 41-2272 atenuou significativamente os aumentos de NVCs, TP e PP, assim como a frequência reduzida de micções observada em ratos tratados com L-NAME, o que indica que a estimulação direta de sGC de maneira independente de NO por BAY 41-2272 contrapõe-se à disfunção vesical em ratos deficientes de NO. Em estudos realizados anteriormente, a ativação da via de sinalização de NO-cGMP com o doador de

NO, DEA-NO, e o análogo de cGMP permeável, 8-Br-cGMP, atenuou a atividade elétrica espontânea em células intersticiais de Cajal recém dispersas, principalmente pela redução das ondas de Ca^{+2} ⁽²⁴⁾. Mais recentemente, demonstrou-se que o doador de NO, SNAP, diminui a amplitude e a frequência de contrações espontâneas em tiras de bexiga hiperativa de ratos no período neonatal de maneira dependente de cGMP⁽²⁵⁾. Portanto, é provável que o acúmulo de cGMP por BAY 41-2272 leve ao relaxamento na porção uretral, facilitando a liberação da urina. A administração de doadores de NO em pacientes com dissinergia do esfíncter do detrusor ou em homens saudáveis causou reduções na resistência ao fluxo de saída vesical em estudos sobre fluxo de pressão^(26,27). Em ratos, a aplicação intravesical de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (composto doador de NO) diminuiu a hiperatividade vesical induzida pelo irritante químico ciclofosfamida⁽²⁸⁾.

CONCLUSÕES

O tratamento a longo prazo com o ativador de sGC independente de NO, BAY 41-2272, restaura os aumentos das NVCs e das pressões intravesicais observados em ratos cronicamente deficientes de NO. Portanto, os ativadores diretos de sGC, tais como BAY 41-2272, poderiam trazer efeitos benéficos para o tratamento dos sintomas de disfunção vesical.

AGRADECIMENTOS

Fabiola Z. T. Mônica é grata à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

- Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2004;84(3):935-86.
- Ho MH, Bhatia NN, Khorram O. Physiologic role of nitric oxide and nitric oxide synthase in female lower urinary tract. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004;16(5):423-9.
- Fathian-Sabet B, Bloch W, Klotz T, Niggemann S, Jacobs G, Addicks K, et al. Localization of constitutive nitric oxide synthase isoforms and the nitric oxide target enzyme soluble guanylyl cyclase in the human bladder. *J Urol.* 2001;165(5):1724-9.
- Bennett BC, Kruse MN, Roppolo JR, Flood HD, Fraser M, de Groat WC. Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J Urol.* 1995;153(6):2004-9.
- Persson K, Igawa Y, Mattiasson A, Andersson KE. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* 1992;107(1):178-84.
- Masuda H, Okuno T, Suzuki M, Kihara K, Goto M, Azuma H. Different distribution of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase activities in the detrusor and proximal urethra of the rabbit. *J Urol.* 2002;168(5):2286-90.
- Burnett AL, Calvin DC, Chamness SL, Liu JX, Nelson RJ, Klein SL et al. Urinary bladder-urethral sphincter dysfunction in mice with targeted disruption of neuronal nitric oxide synthase models idiopathic voiding disorders in humans. *Nat Med.* 1997;3(5):571-4.
- Persson K, Pandita RK, Aszòdi A, Ahmad M, Pfeifer A, Fässler R, et al. Functional characteristics of urinary tract smooth muscles in mice lacking cGMP protein kinase type I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(3):R1112-20.
- Mônica FZ, Bricola AA, Báú FR, Freitas LL, Teixeira SA, Muscará MN, et al. Long-term nitric oxide deficiency causes muscarinic supersensitivity and reduces beta(3)-adrenoceptor-mediated relaxation, causing rat detrusor overactivity. *Br J Pharmacol.* 2008;153(8):1659-68.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Feurer A, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001;410(6825):212-5.
- Baracat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol.* 2003;477(2):163-9.
- Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(9):728-34.
- Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. *Hypertension.* 2006;47(3):596-602.
- Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(3):391-5.
- Schroder A, Hedlund P, Andersson KE. Carbon monoxide relaxes the female pig urethra as effectively as nitric oxide in the presence of YC-1. *J Urol.* 2002;167(4):1892-6.
- Toque HA, Antunes E, Teixeira CE, De Nucci G. Increased cyclic guanosine monophosphate synthesis and calcium entry blockade account for the relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in the rabbit penile urethra. *Urology.* 2008;72(3):711-5.
- Báú FR, Mônica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, De Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2010;637(1-3):171-7.
- Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20(3):298-303.
- Persson K, Alm P, Johansson K, Larsson B, Andersson KE. Nitric oxide synthase in pig lower urinary tract: immunohistochemistry, NADPH diaphorase histochemistry and functional effects. *Br J Pharmacol.* 1993;110(2):521-30.
- Andersson KE, Persson K. Nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated effects in lower urinary tract smooth muscles. *World J Urol.* 1994;12(5):274-80.
- Gamé X, Allard J, Escourrou G, Gourdy P, Tack I, Rischmann P, et al. Estradiol increases urethral tone through the local inhibition of neuronal nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(3):R851-7.
- Soler R, Füllhase C, Lu B, Bishop CE, Andersson KE. Bladder dysfunction in a new mutant mouse model with increased superoxide – lack of nitric oxide? *J Urol.* 2010;183(2):780-5.
- Mamas AM, Reynard JM, Brading AF. Nitric oxide and the lower urinary tract: current concepts, future prospects. *Urology.* 2003;61(6):1079-85.
- Sergeant GP, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD. Ca²⁺ signalling in urethral interstitial cells of Cajal. *J Physiol.* 2006;576(Pt 3):715-20.
- Artim DE, Kullmann FA, Daugherty SL, Wu HY, de Groat WC. Activation of the nitric oxide-cGMP pathway reduces phasic contractions in neonatal rat bladder strips via protein kinase G. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(2):F333-40.
- Reitz A, Knapp PA, Müntener M, Schurch B. Oral nitric oxide donors: a new pharmacological approach to detrusor-sphincter dyssynergia in spinal cord injured patients? *Eur Urol.* 2004;45(4):516-20.
- Müntener M, Schurch B, Wefer B, Reitz A. Systemic nitric oxide augmentation leads to a rapid decrease of the bladder outlet resistance in healthy men. *Eur Urol.* 2006;50(1):112-7.
- Osawa H, Chancellor MB, Jung SY, Yokoyama T, Fraser MO, Yu Y, et al. Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol.* 1999;162(6):2211-6.