

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

**DALILA ANDRADE PEREIRA**

**O GRUPAMENTO HEME AUMENTA O RELAXAMENTO E  
REDUZ A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE CORPOS  
CAVERNOSOS: IMPLICAÇÃO PARA O PRIAPISMO NA  
ANEMIA FALCIFORME**

Bragança Paulista

2022

**DALILA ANDRADE PEREIRA - R.A.: 001202015071**

**O GRUPAMENTO HEME AUMENTA O RELAXAMENTO E  
REDUZ A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE CORPOS  
CAVERNOSOS: IMPLICAÇÃO PARA O PRIAPISMO NA  
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São  
Francisco, como requisito para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Farmacologia geral e clínica

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva

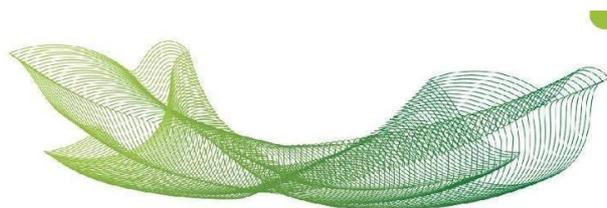
Bragança Paulista

2022

WJ 709 Pereira, Dalila Andrade  
P49 O grupamento heme aumenta o relaxamento e reduz a  
contração do músculo liso de corpos cavernosos: implicação para  
o priapismo na anemia falciforme / Dalila Andrade Pereira. –  
Bragança Paulista, 2022.  
52 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto  
Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.  
Orientação de: Fábio Henrique da Silva.

1. Monóxido de carbono. 2. GMPc. 3. Óxido nítrico.  
4. Disfunção erétil. I. Silva, Fábio Henrique da. II. Título.



## Educando para a paz

**PEREIRA, Dalila Andrade.** “O grupamento heme aumenta o relaxamento e reduz a contração do músculo liso de corpos cavernosos: implicação para o priapismo na anemia falciforme”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de julho de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva - Orientador e  
Presidente Universidade São Francisco

Profa. Dra. Érica Martins Ferreira Gotardo Azevedo  
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Leonardo Henrique Dalcheco Messias  
Universidade São Francisco

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço e dedico essa conquista primeiramente a Deus, por toda força e bênçãos durante essa trajetória, creio que tudo aconteceu conforme Seus planos e não os meus.*

*Aos meus queridos pais, Vanilda e Benedito, que sempre me incentivaram a continuar os estudos e a ir atrás dos meus objetivos, sempre me apoiaram e ajudaram de todas as formas possíveis (ou impossíveis) nessa caminhada. Muito obrigada por serem minha base e exemplo, amo demais vocês.*

*Ao meu irmão Danillo, pelo companheirismo, apoio e toda ajuda quando precisei.*

*Agradeço também o meu namorado, Matheus, pelo amor e cuidado, por me escutar diversas vezes que precisei, me apoiar, não me deixar desanimar, confiar mais em mim do que eu mesma e ajudar como pode por cada etapa que passei.*

*Agradeço de maneira geral, mas não menos importante, a todos os meus familiares e aos amigos, pelo apoio e incentivo nessa jornada.*

*Aos meus colegas de pesquisa e estudos durante esses dois anos, por toda amizade, conhecimento, trocas e auxílio, que foram tão necessários nessa construção e a tornou mais leve.*

*Aos funcionários da USF envolvidos no processo, á equipe da limpeza, á toda equipe dos laboratórios de pesquisa, á equipe do biotério, gratidão pelo trabalho essencial e competente que fizeram e fazem.*

*À USF pela infraestrutura, suporte e pela bolsa BDC concedida no meu primeiro semestre, graças a essa opção pude ingressar no curso, assim como outros alunos.*

*À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado durante o curso e até aqui.*

*Aos professores e examinadores por todo conhecimento e apoio prestado durante os semestres.*

*Ao meu professor e orientador, Dr. Fábio, fica a eterna gratidão por ter confiado a mim esse projeto e me ensinado passo a passo do caminho da pesquisa e da ciência, com maestria e paciência. Agradeço por tornar esse trabalho realidade.*

*Aos camundongos por terem contribuído com a pesquisa mesmo “sem saberem” de nada.*

*A “ideia” tão distante de fazer um mestrado saiu da imaginação, com persistência transformou-se em ação e, enfim, se concretizou. Gratidão!*

## EPÍGRAFE

*Tudo posso Naquele que me fortalece*  
*- Filipenses 4:13*

## RESUMO

O priapismo é considerado uma emergência urológica e um grave problema clínico para os homens com anemia falciforme. Estudos clínicos apontam uma correlação entre o priapismo e os níveis elevados de hemólise intravascular. A hemólise intravascular acarreta a liberação da hemoglobina (Hb) no plasma que pode consumir o óxido nítrico e ser oxidada. Durante essas reações, o grupamento heme é liberado da Hb, podendo ser metabolizado, gerando monóxido de carbono (CO) entre outros metabólitos. O CO pode promover relaxamento do músculo liso via GCs-GMPc. Contudo, ainda nenhuma pesquisa investigou o papel do heme livre na função erétil de camundongos. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do grupamento heme nas alterações das respostas relaxantes e contráteis de corpos cavernosos de camundongos machos C57BL/6. Foram isolados 2 corpos cavernosos de cada animal e montados em miógrafo. Os animais foram fornecidos pelo CEMIB da UNICAMP. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USF (002.03.2021) onde os experimentos foram realizados. A adição cumulativa de concentrações de heme promoveu relaxamento dos corpos cavernosos. O inibidor da heme-oxigenase (1J, 10  $\mu$ M) ou inibidor da GCs (ODQ, 10  $\mu$ M), pré-incubados nos corpos cavernosos, reduziram ( $p < 0,05$ ) a resposta máxima ( $E_{max}$ ) do heme. A pré-incubação dos corpos cavernosos com o heme (100  $\mu$ M) reduziu ( $p < 0,05$ ) a  $E_{max}$  induzida pela fenilefrina e KCl quando comparada com o grupo controle, assim como a contração EFS. A pré-incubação dos corpos cavernosos com o heme (100  $\mu$ M) aumentou ( $p < 0,05$ ) a  $E_{max}$  induzida pela ACh e SNP, assim como pela EFS. A pré-incubação com o inibidor da heme-oxigenase (1J, 10  $\mu$ M) ou inibidor da GCs (ODQ, 10  $\mu$ M) inibiu ( $p < 0,05$ ) os efeitos do heme na resposta contrátil (fenilefrina, KCl e EFS) e relaxante (ACh, SNP e EFS), indicando que o metabolismo do heme e estimulação da GCs são necessários para o seu efeito farmacológico. Os níveis de GMPc foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em corpos cavernosos tratados com heme e a pré-incubação com o composto 1J e ODQ diminuíram os níveis de GMPc. Em suma, o grupamento heme *in vitro* reduziu a contração do músculo liso de corpos cavernosos de camundongos, assim como favoreceu o aumento do relaxamento induzido pela via NO-GMPc no tecido erétil. Portanto, é provável que o heme livre pode contribuir para o priapismo na anemia falciforme.

**Palavras-chave:** monóxido de carbono. GMP cíclico. óxido nítrico. disfunção erétil.

## ABSTRACT

Priapism is considered a urologic emergency and a serious clinical problem for men with sickle cell anemia. Clinical studies point to a correlation between priapism and high levels of intravascular hemolysis. Intravascular hemolysis leads to the release of hemoglobin (Hb) into the plasma that can consume nitric oxide and be oxidized. During these reactions, the heme group is released from Hb, which can be metabolized, generating carbon monoxide (CO) among other metabolites. CO can promote smooth muscle relaxation via GCs-cGMP. However, no research has yet investigated the role of free heme in the erectile function of mice. The aim of the present study was to investigate the effect of the heme group on alterations in the relaxing and contractile responses of corpora cavernosa of male C57BL/6 mice. Two corpora cavernosa were isolated from each animal and mounted in a myograph. The animals were provided by CEMIB of UNICAMP. The experimental protocols were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the USF (002.03.2021) where the experiments were carried out. The cumulative addition of heme concentrations promoted relaxation of the corpora cavernosa. Heme-oxygenase inhibitor (1J, 10  $\mu$ M) or GCs inhibitor (ODQ, 10  $\mu$ M), pre-incubated in the corpora cavernosa, reduced ( $p < 0.05$ ) the maximal response ( $E_{max}$ ) of heme. Pre-incubation of corpora cavernosa with heme (100  $\mu$ M) reduced ( $p < 0.05$ ) the  $E_{max}$  induced by phenylephrine and KCl when compared to the control group, as well as the EFS contraction. Pre-incubation of corpora cavernosa with heme (100  $\mu$ M) increased ( $p < 0.05$ ) the  $E_{max}$  induced by ACh and SNP, as well as by EFS. Pre-incubation with heme-oxygenase inhibitor (1J, 10  $\mu$ M) or GCs inhibitor (ODQ, 10  $\mu$ M) inhibited ( $p < 0.05$ ) the effects of heme on the contractile response (phenylephrine, KCL and EFS) and relaxant (ACh, SNP and EFS), indicating that heme metabolism and GC stimulation are necessary for its pharmacological effect. cGMP levels were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in heme-treated corpora cavernosa and pre-incubation with compound 1J and ODQ decreased cGMP levels. In summary, the heme group in vitro reduced the smooth muscle contraction of the corpora cavernosa of mice, as well as favored the increase of the relaxation induced by the NO-cGMP pathway in the erectile tissue. Therefore, it is likely that free heme may contribute to priapism in sickle cell anemia.

**Keywords:** *carbon monoxide. cyclic GMP. nitric oxide. erectile dysfunction.*

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.**

**$\alpha$ -AR:**  $\alpha$ -adrenoreceptores

**ACh:** Acetilcolina

**Ca<sup>2+</sup>:** Íon cálcio

**CO:** Monóxido de Carbono

**DAG:** Diacilglicerol

**EFS:** Estimulação elétrica de campo

**Emax:** Resposta máxima

**eNOS:** Óxido nítrico sintase endotelial

**E.P.M:** Erro padrão das médias

**EROS:** Espécies reativas de oxigênio

**GCs:** Guanilato ciclase solúvel

**5'GMP:** Guanosina 5'-monofosfato

**GMPc:** Monofosfato cíclico de guanosina

**GTP:** Guanosina trifosfato

**1J:** composto 1-{4-[(4-bromobenzyl)oxy]phenyl}-2-(1H-imidazol-1-yl)ethanol

**Hb:** Hemoglobina

**HbA:** Hemoglobina A

**HbS:** Hemoglobina S

**Hz:** Hertz

**IP<sub>3</sub>:** Inositol trifosfato

**KCl:** Cloreto de potássio

**MLC<sub>20</sub>:** Quinase de cadeia leve de miosina

**MLC-P:** Fosfatase de cadeia leve de miosina

**Ms:** Milissegundo

**mM:** Milimolar

**nM:** Nanomolar

**NO:** Óxido nítrico

**nNOS:** Óxido nítrico sintase neuronal

**NOS:** Óxido nítrico síntase

**ODQ:** composto 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona

**OH:** Heme-oxigenase

**PDE5:** Fosfodiesterase tipo 5

**pEC50:** antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidilinositol

**PKG:** Proteína quinase ativada por GMPc

**SNP:** Nitroprussiato de sódio

**TLR4:** Receptores do tipo toll 4

**μM:** micromolar

**V:** Volts

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Mutação no gene da hemoglobina A e o surgimento da hemoglobina S e da hemácia falcizada.** Fonte: Adaptado de KATO et al. (2017, J Clin Invest).....14
- FIGURA 2. Principal via de contração do músculo liso cavernoso. Na: Noradrenalina.  $\alpha$ 1: Receptor  $\alpha$ 1 adrenérgico.** NA, Noradrenalina; PLC, Fosfolipase C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol; IP<sub>3</sub>, Inositol trisfosfato; Dag, Diacilglicerol; PKC, Proteína quinase C; Rs, Retículo sarcoplasmático; Ca<sup>2+</sup>, Cálcio; Cam, Calmodulina; MLC, Quinase da cadeia leve de miosina; MLC-P, Fosfatase de cadeia leve de miosina.....18
- FIGURA 3. Sinalização NO/GCs/GMPc: Principal via de relaxamento do músculo liso cavernoso.** nNOS, Óxido nítrico sintase neuronal; eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; GCs, Guanilato ciclase solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; 5'GMP, Guanosina 5'-monofosfato; PDE5, fosfodiesterase tipo 5; PKG, Proteína quinase dependente de GMPc; Ca<sup>2+</sup>, Cálcio.....19
- FIGURA 4.** Alterações na via de sinalização do NO e priapismo.....21
- FIGURA 5.** Haptoglobina e hemopexina em condições fisiológicas.....22
- FIGURA 6.** Metabolização do heme, produção de CO e ativação da via GCs-GMPc.....23
- FIGURA 7. Curvas concentração-efeito ao heme em corpos cavernosos de camundongos na presença do ODQ e 1J.** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 5 experimentos. \*P < 0.05 comparado com o grupo controle.....29
- FIGURA 8. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + ODQ (D) e heme + 1J (G).** Painel B, E e H: valores de resposta máxima (E<sub>max</sub>). Painel C, F e I: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 7 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....30
- FIGURA 9. Curvas concentração-efeito ao KCl em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + ODQ (D) e heme + 1J (G).** Painel B, E e H: valores de resposta máxima (E<sub>max</sub>). Painel C, F e I: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). Os dados representam as médias  $\pm$  erro

padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....32

**FIGURA 10. Contração induzida pela EFS em corpos cavernosos na presença do heme (A), heme + ODQ (B) e heme + 1J (C).** Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....33

**FIGURA 11. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + 1J (D).** Painel B e E: valores de resposta máxima (Emax). Painel C e F: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....34

**FIGURA 12. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + 1J (D).** Painel B e E: valores de resposta máxima (Emax). Painel C e F: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....35

**FIGURA 13. Relaxamento induzido pela EFS em corpos cavernosos na presença do heme (A) e heme + 1J (B).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.....36

**FIGURA 14. Níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de camundongos.** Os níveis de GMPc são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 5 animais. \*P < 0.05 comparado com o grupo controle. #P < 0.05 comparado com o respectivo grupo (na ausência do ODQ ou 1J).....37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Anemia falciforme e priapismo.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Mecanismos moleculares de contração e relaxamento do corpo cavernoso.....	17
2.2. Priapismo e hemólise intravascular na anemia falciforme.....	19
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO.....	23
4. OBJETIVO GERAL.....	24
4.1. Objetivos específicos.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1. Modelo animal e preparação do músculo liso do corpo cavernoso.....	25
5.2. Curvas concentração-resposta.....	25
5.3. Estimulação elétrica.....	27
5.4. Determinação dos níveis de GMPc.....	27
5.5. Análise estatística.....	28
6. RESULTADOS.....	29
6.1. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo heme: efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel e heme oxigenase <i>in vitro</i> .....	29
6.2. Papel do heme na contração de corpo cavernoso induzida pela fenilefrina: efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel e heme oxigenase <i>in vitro</i> .....	29
6.3. Papel do heme na contração de corpo cavernoso induzida pelo KCl: efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel e heme oxigenase <i>in vitro</i> .....	31
6.4. Contração de corpo cavernoso induzida pela estimulação elétrica: efeito do heme <i>in vitro</i> .....	32
6.5. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pela acetilcolina: efeito do heme <i>in vitro</i> .....	33
6.6. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo nitroprussiato de sódio: efeito do heme <i>in vitro</i> .....	34
6.7. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pela estimulação elétrica: efeito do heme <i>in vitro</i> .....	35
6.8. Determinação dos níveis de GMPc em corpos cavernosos.....	36
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÃO .....	41

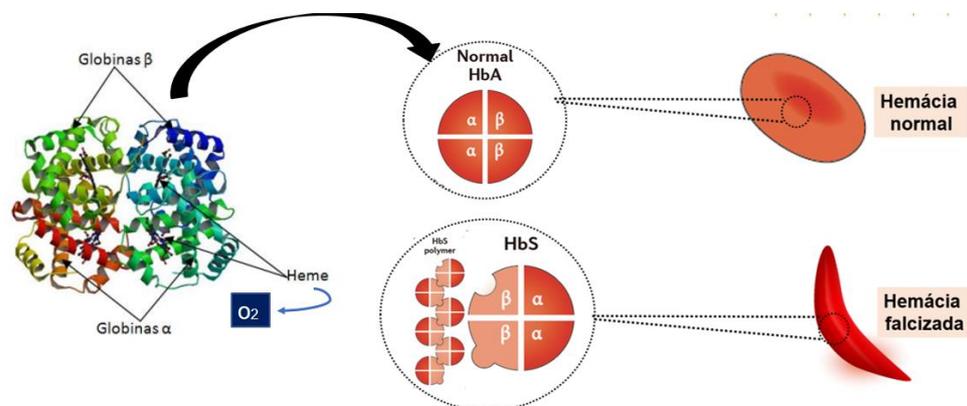
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Anemia falciforme e Priapismo

A anemia falciforme é uma doença hereditária monogênica e acomete homens e mulheres. É originária da África, provavelmente como um fator genético de resistência à malária, e chegou às Américas através da comercialização de escravos. No Brasil, de acordo com a ANVISA (2001), a doença distribui-se heterogeneamente, devido a miscigenação da população. Estima-se o nascimento de aproximadamente 1000 novos casos por ano de doenças falciformes no nosso país. De acordo com os dados do Ministério da Saúde (2020), no ano de 2019, um total de 1.214 (mil duzentos e catorze) recém-nascidos no Brasil apresentaram a doença falciforme e 61.021 possuem traço falciforme, portando a hemoglobina. Portanto, são consideradas um problema de saúde pública no Brasil (KATO et al., 2018).

A doença ocorre devido uma mutação no gene da hemoglobina (Hb). A Hb normal é denominada hemoglobina A (HbA), de acordo com a ANVISA (2001). A Hb é a principal proteína das hemácias, é constituída por duas globinas (cadeias polipeptídicas) do tipo  $\alpha$ , associada a duas globinas do tipo  $\beta$ , conectadas ao heme, conforme está ilustrado na FIGURA 1 (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; KATO et al., 2017). O heme é um grupo prostético, composto de protoporfirina IX e ferro ( $Fe^{2+}$ ), capaz de se ligar reversivelmente ao oxigênio ( $O_2$ ), permitindo assim o transporte e distribuição do oxigênio pelo corpo (AHMED; GHATGE; SAFO, 2020; KATO et al., 2017).



**FIGURA 1. Mutação no gene da hemoglobina A (HbA) e o surgimento da hemoglobina S (HbS) e da hemácia falcizada.** Fonte: Adaptado de KATO et al. (2017, J Clin Invest).

A mutação da molécula de Hb ocorre devido a troca da base nitrogenada adenina por timina (GAG - GTG), que acarreta a troca de um ácido glutâmico por uma valina na cadeia beta

da Hb, causando nessa molécula uma alteração físico-química que origina uma Hb com anormalidades, denominada hemoglobina S (HbS) (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). O evento fundamental na patogênese da anemia falciforme é a polimerização da hemoglobina S (HbS), tornando a hemácia rígida, falcizada (forma de foice) e com uma flexibilidade diminuída (KATO et al., 2018; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). A hemácia, com a conformação mudada, fica com a membrana menos resistente e mais propícia a hemólise, ocasionando uma diminuição da vida média das hemácias (HOUWING et al., 2019). Como consequências da doença podemos listar a anemia hemolítica, episódios de vaso-oclusão, dores, úlcera de perna, síndrome torácica aguda (STA), lesão de órgãos, hipertensão pulmonar, AVE e priapismo (KATO et al., 2018; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

O priapismo é definido como uma ereção peniana duradoura e prolongada, geralmente persiste por mais de quatro horas (SALONIA et al., 2014). Há 3 classificações diferentes de priapismo. Priapismo isquêmico (veno-oclusivo ou baixo fluxo) caracterizado por uma ereção persistente que apresenta rigidez dos corpos cavernosos, pouco ou nenhum fluxo arterial, constantemente dolorosa e pode ser desencadeada ou não por um estímulo sexual. Priapismo não isquêmico (arterial ou de alto fluxo) ocasionado por influxo arterial cavernoso irregular e a ereção não é dolorosa. Priapismo intermitente (recorrente) é uma situação distinta marcada por episódios dolorosos de ereções prolongadas marcado por um padrão de recidiva. No priapismo intermitente a duração das ereções pode prolongar, ocasionando um priapismo isquêmico (SALONIA et al., 2014). Entre estas classificações, o priapismo isquêmico é o mais comum (PRYOR et al., 2004). Alguns casos de priapismo isquêmico foram associados com discrasias hematológicas, infecções, distúrbios metabólicos ou neurogênicos, neoplasias e uso de certos medicamentos. A anemia falciforme é a etiologia mais comum e responsável pelo priapismo isquêmico durante a infância e a vida adulta (SALONIA et al., 2014).

O priapismo é considerado um grave problema clínico para os homens portadores de anemia falciforme. O priapismo isquêmico é uma emergência urológica, porque pode provocar mudanças estruturais nos corpos cavernosos como fibrose peniana irreversível, danos no músculo liso e em células endoteliais. Essas alterações colaboram para os danos vasculares, podendo evoluir para uma disfunção erétil (BIVALACQUA et al., 2006; BURNETT et al., 1995; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Estudos epidemiológicos apontam que 30-45% dos pacientes falciformes podem desenvolver priapismo isquêmico e 30% destes casos evoluem para a disfunção erétil (ADEYOJU et al., 2002; ALVAIA et al., 2020; MANTADAKIS et al., 1999).

Apesar da elevada incidência do priapismo na anemia falciforme, os tratamentos disponíveis atuam de forma aguda e não preventiva e os mecanismos fisiopatológicos não estão totalmente esclarecidos (ANELE et al., 2015; MUSICKI; BURNETT, 2020; SALONIA et al., 2014). Dessa forma, pesquisas que procuram entender o priapismo são de extrema importância, não somente para elucidar a fisiopatologia da doença, como também para melhorar a terapêutica e qualidade de vida dos pacientes. Pesquisas clínicas associam positivamente o priapismo com níveis elevados de hemólise intravascular em homens com anemia falciforme (CITA et al., 2006; KATO et al., 2006; NOLAN et al., 2005). A hemólise intravascular acarreta níveis elevados de heme livre no plasma. O excesso de heme no plasma participa da fisiopatologia da anemia falciforme, desencadeando processo inflamatório, processo vasooclusivo e aumento do estresse oxidativo (BELCHER et al., 2014). Entretanto, até o momento nenhum estudo investigou o efeito do grupo heme em corpos cavernosos. Assim, propusemos a hipótese que o grupo heme pode contribuir para o priapismo na anemia falciforme.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

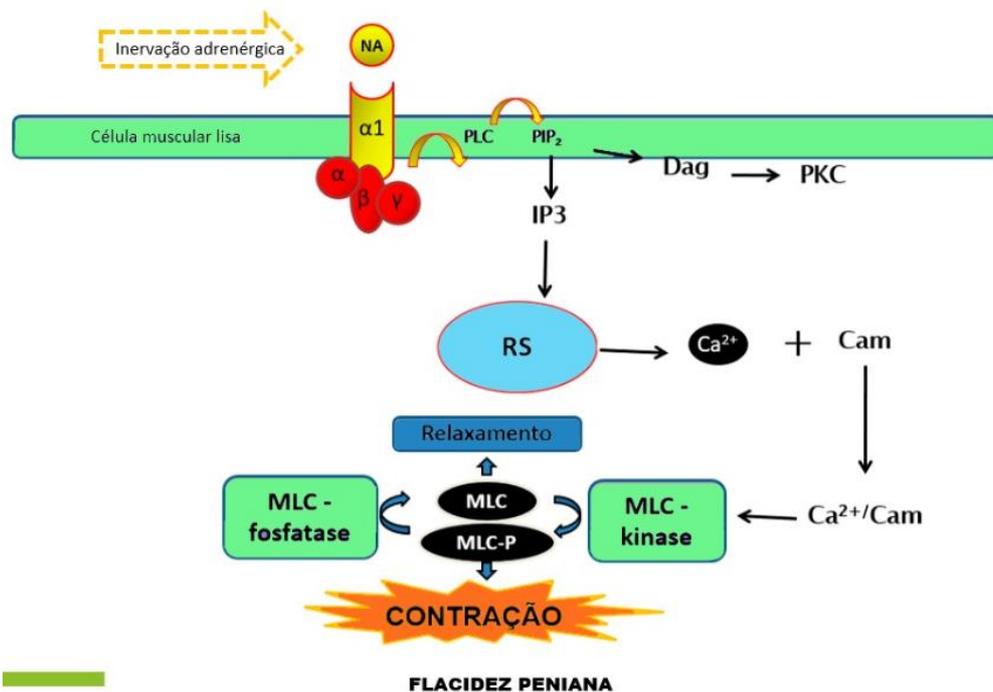
### 2.1. *Mecanismos moleculares de contração e relaxamento do corpo cavernoso*

#### 2.1.1. *Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana*

A magnitude de contração do tecido erétil determina o estado peniano de flacidez e ereção. A resposta contrátil relaxante é controlada por mecanismos periféricos e centrais (BURNETT, 2019). A noradrenalina, as endotelinas e os prostanóides estão entre os vários transmissores e moduladores que contribuem para a contração do tecido erétil peniano (GRATZKE et al., 2010).

A neurotransmissão simpática exerce uma função fundamental na regulação do tônus do músculo erétil. A vascularização peniana e o músculo liso do corpo cavernoso possuem uma extensa inervação adrenérgica, que condiciona a flacidez, principalmente por meio da atividade tônica desta inervação, levando a liberação em massa de noradrenalina, estimulando a resposta contrátil dos vasos do pênis e do músculo liso trabecular cavernoso (DEAN; LUE, 2005; MACDONALD; BURNETT, 2021).

Os mecanismos intracelulares consequentes da contração estimulada através da ativação dos receptores  $\alpha$ -AR, pela noradrenalina, compreendem a ativação da fosfolipase C (PLC), que cataliza a fosfatidilinositol ( $PIP_2$ ) em diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato ( $IP_3$ ), fazendo com que se eleve os níveis de cálcio intracelular. Em seguida, o cálcio liga-se à calmodulina, ativando a kinase da cadeia leve de miosina ( $MLC_{20}$ ), levando ao aumento expressivo de fosforilação da  $MLC_{20}$ . Ao longo desses mecanismos, a  $MLC_{20}$  fosforilada interage com a  $\alpha$ -actina levando a contração da célula muscular lisa peniana (BERRIDGE, 2008; GRATZKE et al., 2010) (Fig. 2). Várias evidências sugerem que no corpo cavernoso as respostas  $\alpha$ -adrenérgicas são parcialmente dependentes da proteína G monomérica RhoA e de seu alvo intracelular Rho-kinase (ANDERSSON, 2011; MITIDIERI et al., 2020; YILDIRIM et al., 2020).

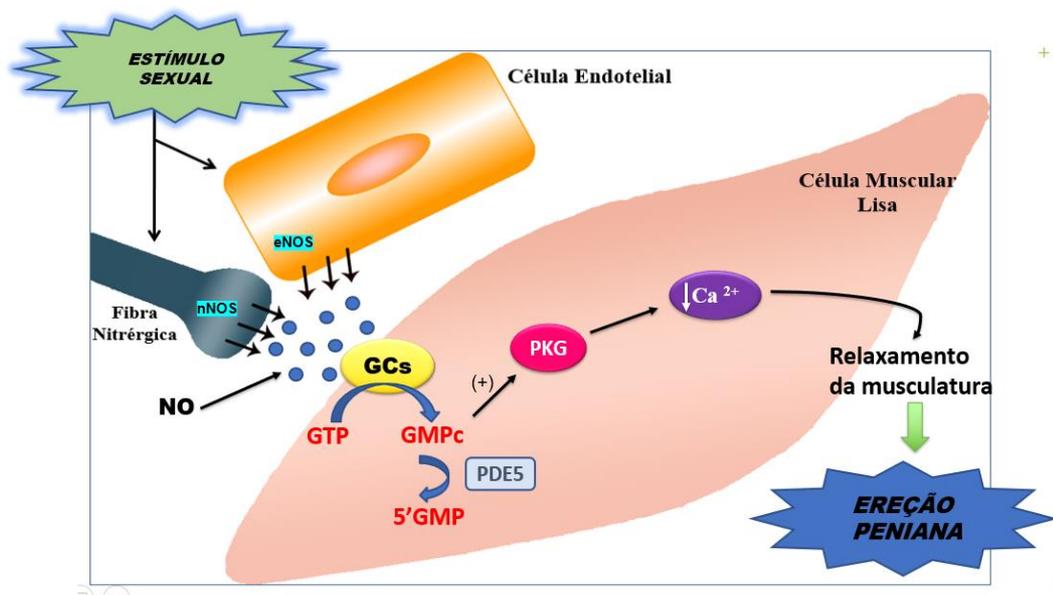


**FIGURA 2. Principal via de contração do músculo liso cavernoso.** NA, Noradrenalina; PLC, Fosfolipase C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol; IP<sub>3</sub>, Inositol trisfosfato; Dag, Diacilglicerol; PKC, Proteína quinase C; Rs, Retículo sarcoplasmático; Ca<sup>2+</sup>, Cálcio; Cam, Calmodulina; MLC, Quinase da cadeia leve de miosina; MLC-P, Fosfatase de cadeia leve de miosina.

### 2.1.2. Relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana

O óxido nítrico (NO) é o neurotransmissor mais importante entre um sistema de sinalização que age mediando à resposta erétil no pênis. Esse neurotransmissor é produzido pelas enzimas óxido nítrico síntases (NOS), que estão localizadas nas fibras NANC nitrérgicas (nNOS) e no endotélio (eNOS), sendo as enzimas responsáveis pela catalização do metabolismo da L-arginina, produzindo NO e L-citrulina (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O NO é liberado do endotélio em resposta à acetilcolina (ACh) no tecido peniano (TEJADA et al., 1988). O relaxamento das artérias helicinais, decorrente da despolarização da inervação cavernosa, faz com que o NO seja liberado das células endoteliais, como resultado da elevação do fluxo sanguíneo (HURT et al., 2012). Deste modo, a regulação da ereção aparenta não ser mediada apenas pelo NO proveniente dos nervos. A força de cisalhamento aumentada e evocada durante a ereção serve de estímulo para a fosfatidil-inositol 3-kinase (PI3K), que fosforila a proteína quinase B, a qual fosforila a enzima eNOS produzindo NO endotelial (HURT et al., 2002; 2012; MITIDIERI et al., 2020; YILDIRIM et al., 2020).

No momento em que é liberado do endotélio ou de fibras nitrérgicas, o NO é difundido para o interior da célula do músculo liso adjacente ligando-se em seu receptor, a guanilato ciclase solúvel (GCs) (BURNETT, 2019). Esta ligação acontece na porção heme gerando um complexo heme-ferrosnitrosil. Quando o NO se liga, provoca a quebra da ligação entre o ferro e a His<sub>105</sub> axial, originando um anel com o NO localizado na posição cinco, que leva a uma mudança conformacional ativando a GCs (BOON; HUANG; MARLETTA, 2005; EVGENOV et al., 2012). A ativação da GCs pelo NO causa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) - o segundo mensageiro. A elevação nos níveis de GMPc leva à ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), conduzindo a redução dos níveis intracelulares de cálcio, resultando no relaxamento do músculo liso e ereção peniana. A resposta erétil é cessada quando o GMPc é degradado a 5'GMP pela fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) (ANDERSSON, 2011; MITIDIERI et al., 2020; YILDIRIM et al., 2020) (Fig. 3).

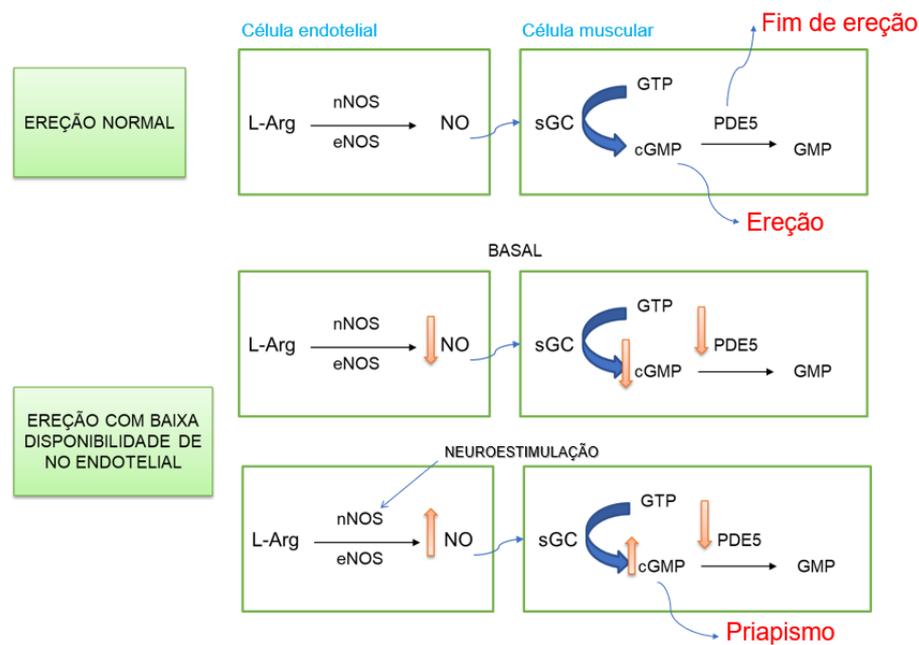


**FIGURA 3. Sinalização NO/GCs/GMPc: Principal via de relaxamento do músculo liso cavernoso.** nNOS, Óxido nítrico sintase neuronal; eNOS, Óxido nítrico sintase endotelial; GCs, Guanilato ciclase solúvel; GTP, Guanosina trifosfato; GMPc, Monofosfato cíclico de guanosina; 5'GMP, Guanosina 5'-monofosfato; PDE5, fosfodiesterase tipo 5; PKG, Proteína quinase dependente de GMPc; Ca<sup>2+</sup>, Cálcio.

## 2.2. Priapismo e hemólise intravascular na anemia falciforme

Na anemia falciforme, a baixa biodisponibilidade de NO está associada com a hemólise intravascular, aumento do estresse oxidativo e aumento da atividade enzimática da arginase (GLADWIN; SACHDEV, 2012). A diminuição da biodisponibilidade de NO no pênis vem sendo indicada como uma das principais causas que desencadeia o priapismo em homens e

modelos murinos transgênicos para anemia falciforme, além do mecanismo de vaso-oclusão (CHAMPION et al., 2005; KATO, 2012; LAGODA et al., 2013; MUSICKI et al., 2021; SILVA et al., 2016). Resultados experimentais apontam que a diminuição da biodisponibilidade de NO/GMPc ocasiona a redução compensatória da atividade e expressão de PDE5 no corpo cavernoso, prejudicando, desta forma, o mecanismo de controle erétil ( BIVALACQUA et al., 2006; CHAMPION et al., 2005; MUSICKI et al., 2018; SILVA et al., 2016; SOPKO et al., 2015) (Fig. 4). De fato, estudos funcionais *in vitro* apontaram aumento do relaxamento nitrérgico e do relaxamento dependente e independente de endotélio em corpos cavernosos de camundongos falciformes transgênicos, “Berkeley” e “Townes”, assim como redução na expressão da PDE5 (CHAMPION et al., 2005; SILVA et al., 2016a,b; SOPKO et al., 2015). O aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio também foi observado em pênis de camundongos e homens com anemia falciforme (BIVALACQUA et al., 2006; LAGODA et al., 2012; MUSICKI et al., 2021; SILVA et al., 2016). Camundongos *knockout* para a enzima eNOS ou *knockout* para as enzimas eNOS e nNOS apresentam características de priapismo e aumento do relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso, assim como redução na expressão da PDE5 e aumento do estresse oxidativo no pênis (CHAMPION et al., 2005; NANGLE; COTTER; CAMERON, 2004; SILVA et al., 2016; SOPKO et al., 2015). O estudo com esses animais indica que a disfunção da enzima eNOS no pênis é uma importante alteração para desencadear o priapismo (CHAMPION et al., 2005) (Fig. 4). Alterações na via da rho-kinase e adenosina também parecem colaborar para o priapismo em camundongos falciformes (BIVALACQUA et al., 2010; LA FAVOR et al., 2018; MUSICKI; BURNETT, 2020; NING et al., 2014).

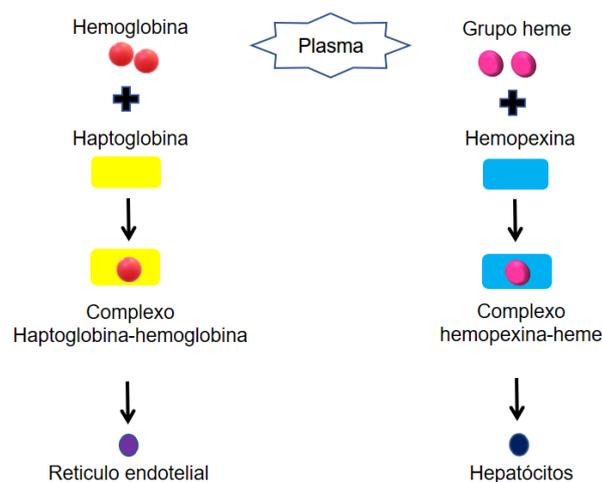


**FIGURA 4. Alterações na via de sinalização do NO e priapismo.**

Estudos clínicos apontam uma correlação forte e positiva entre o priapismo e níveis elevados de hemólise intravascular em homens com anemia falciforme (CITA et al., 2006; KATO et al., 2006; NOLAN et al., 2005). O processo de hemólise intravascular acarreta a liberação de Hb para o plasma podendo consumir o NO e ser rapidamente oxidada. Durante essas reações, forma-se a Hb na forma férrica (metahemoglobina;  $Hb^{Fe^{3+}}$ ), que libera prontamente o grupamento heme (SCHAER et al., 2013; GLADWIN, 2016). Em condições fisiológicas, a haptoglobina e a hemopexina são as proteínas plasmáticas responsáveis pela defesa do organismo contra o acúmulo de Hb e heme livre no plasma, respectivamente (DEUEL et al., 2015). No plasma, a haptoglobina se liga à Hb livre e a hemopexina se liga ao grupamento heme, formando complexos. Os complexos haptoglobina-hemoglobina são metabolizados pelos macrófagos no sistema retículo-endotelial, principalmente no baço, enquanto o complexo hemopexina-heme é metabolizado nos hepatócitos (HVIDBERG et al., 2005; SCHAER et al., 2016; SMITH; MORGAN, 1979) (Fig. 5). Porém, na anemia falciforme, concentrações mais altas de Hb e heme são liberadas no plasma, saturando a haptoglobina e hemopexina cujos níveis declinam rapidamente, assim acumulando hemoglobina e heme livre no plasma (MULLER-EBERHARD et al., 1968; REITER et al., 2002; VERCELLOTTI et al., 2016; VINCHI et al., 2013; YALAMANOGLU et al., 2018). Em pesquisas utilizando modelos de roedores para anemia falciforme, foi apresentado que o grupamento heme consegue ativar o endotélio dos vasos pelos receptores do tipo Toll-Like 4 (TLR4). Os produtos gerados a partir

da ativação do TLR4 são os mediadores inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8), as espécies reativas de oxigênio (ERO), a liberação de P-selectina e do fator de von Willebrand, que atuam na coagulação do sangue e na adesão das células, contribuindo para eventos de estase vascular e também vaso-oclusão (BELCHER et al., 2014; BELCHER et al., 2018).

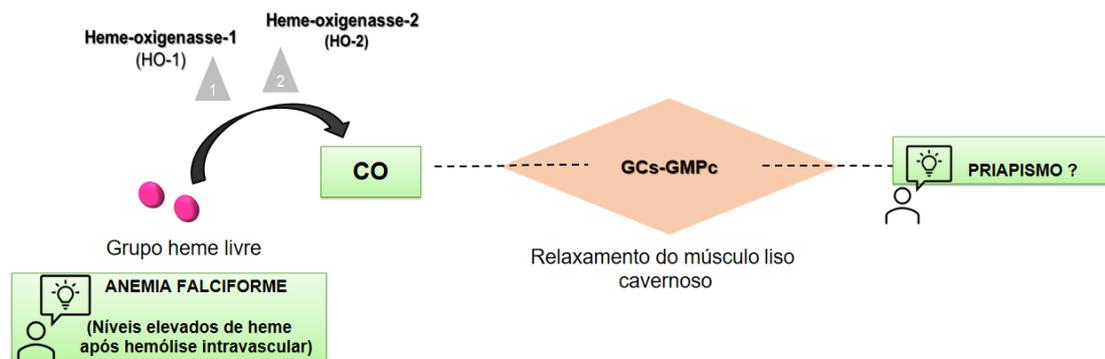
Para reduzir a toxicidade dos produtos gerados pela a hemólise, o grupamento heme é metabolizado pela heme oxigenase-1 (HO-1, induzível) e heme oxigenase-2 (HO-2, constitutiva), gerando CO, biliverdina e ferro (MONTFORT, WALES, WEICHSEL, 2017; SHAMLOUL, 2009). Entre os três derivados da metabolização do heme, o CO que antes era visto apenas como agente tóxico, tem se mostrado uma importante molécula sinalizadora relacionada a fisiologia e fisiopatologia de muitos processos biológicos (GIBBONS et al., 2013). A principal fonte da produção de CO endógeno é a degradação do heme (RODGERS et al., 1994; WU et al., 2005). Sabe-se que o CO se liga na GCs através do ferro da porção heme, estimulando sua atividade e aumentando a produção de GMPc. A ativação da via CO-GCs-GMPc promove vasodilatação (MUSTAFA et al., 2009; WANG et al., 1997) e relaxamento do músculo liso de corpos cavernosos, podendo induzir a ereção peniana (USHIYAMA et al., 2004).



**FIGURA 5. Haptoglobina e hemopexina em condições fisiológicas.**

### 3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

O priapismo é um importante e grave problema clínico para os pacientes homens com anemia falciforme. Esta condição é uma emergência urológica e os tratamentos atualmente disponíveis atuam de forma aguda e frequentemente são administrados tardiamente. Quando os tratamentos medicamentosos não são eficientes, é necessário submeter o paciente ao tratamento cirúrgico, pois o priapismo não tratado pode acarretar uma disfunção erétil irreversível (SALONIA et al., 2014). Estudos clínicos apontam que o priapismo está associado com o aumento de hemólise intravascular em pacientes falciformes (BELCHER et al., 2014; GLADWIN, 2016; HVIDBERG et al., 2005). Pacientes falciformes possuem uma maior concentração de heme plasmático, resultado da hemólise intravascular. Neste estudo, uma vez que o CO é conhecido por ativar a GCs, propusemos a hipótese que a produção de CO, como subproduto do metabolismo do heme, pode contribuir para o priapismo através do aumento do relaxamento e redução da contração do músculo liso do corpo cavernoso através da ativação da via GCs-GMPc (Fig. 6).



**FIGURA 6.** Metabolização do heme, produção de CO e ativação da via GCs-GMPc.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito do grupamento heme nas alterações das respostas relaxantes e contráteis de corpos cavernosos.

##### **4.1. Objetivos específicos:**

- (I) Investigar o efeito do heme (*in vitro*) na via de sinalização NO–GMPc nos corpos cavernosos.
- (II) Investigar o efeito do heme (*in vitro*) na resposta contrátil de corpos cavernosos.
- (III) Analisar a inibição da HO e GCs nas alterações causadas pelo grupamento heme nas respostas contráteis e relaxantes de corpos cavernosos.
- (IV) Avaliar o efeito do heme (*in vitro*) na produção do segundo mensageiro - GMPc.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. *Modelo animal e preparação do músculo liso do corpo cavernoso*

Foram utilizados para o estudo camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre 3 – 5 meses (pois já apresentam tamanho e maturação ideal para os estudos), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos no Biotério da Universidade São Francisco (USF) à 24°C, em ciclos de claro/escuro (12/12 h), com ração e água ad libitum. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USF (002.03.2021) onde os experimentos foram realizados.

Para a preparação do músculo liso cavernoso, os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (100/10 mg/Kg). O pênis foi removido da região de inserção da crura. Após esse procedimento os pênis foram colocados em solução de Krebs-Henseleit na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO<sub>3</sub>, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.17 e CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.6. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conectivos e glândula peniana, os corpos cavernosos foram isolados a partir da extremidade proximal após secção do septo fibroso que os conecta. Desta forma, dois segmentos de corpos cavernosos foram obtidos de cada camundongo e, em seguida, eram suspensos entre um transdutor de força de unidade fixa em um miógrafo para banho de órgãos isolados. Foi aplicada nesses tecidos uma tensão de 2,0-2,5 mN, sendo regularmente ajustados por 60 minutos até alcançar a estabilização dos mesmos e, durante esse período, a solução de Krebs foi trocada de 15 em 15 minutos. As mudanças de tensão foram medidas utilizando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/35 de aquisição de dados (software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Este método foi reproduzido de estudo anterior realizado pelo nosso grupo (SILVA; ANTUNES, 2014).

### 5.2. *Curvas concentração-resposta*

Em corpos cavernosos, foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas ao agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico fenilefrina (1 nM – 300  $\mu$ M) e KCl (1 – 300 mM) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO, 0,1%) por 30 minutos (SILVA; ANTUNES, 2014). O DMSO (dimetilsulfóxido) é um solvente muito utilizado na área de

pesquisas farmacológicas ou toxicológicas e, geralmente, abaixo de 10% (v/v) é considerado não tóxico. Reconhece-se que os efeitos do DMSO são praticamente baixíssimos (VERHEIJEN et al., 2019).

A resposta contrátil induzida por estes agentes também foi avaliada em tecidos pré-incubados com o 1J (inibidor da heme oxigenase; 10  $\mu$ M) ou ODQ (inibidor da GCs; 10  $\mu$ M) por 30 minutos antes da pré-incubação com o heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO). Dessa forma, tivemos os seguintes grupos experimentais:

- Controle-Veículo, corpos cavernosos incubados apenas com o veículo (DMSO).
- Heme 100  $\mu$ M, corpos cavernosos incubados apenas com o heme (100  $\mu$ M).
- Controle-1J, corpos cavernosos incubados com o 1J (10  $\mu$ M) e veículo (DMSO).
- Heme-1J, corpos cavernosos incubados com o 1J (10  $\mu$ M) e heme (100  $\mu$ M).
- Controle-ODQ, corpos cavernosos incubados com o ODQ (10  $\mu$ M) e veículo (DMSO).
- Heme-ODQ, corpos cavernosos incubados com o ODQ (10  $\mu$ M) e heme (100  $\mu$ M).

Para analisarmos a resposta relaxante do corpo cavernoso, realizamos a pré-contracção tecidual com fenilefrina (10  $\mu$ M). Após a estabilização da resposta contrátil (sem variações na tensão), foram construídas curvas concentração-resposta nos tecidos a agentes relaxantes, acetilcolina (1 nM - 10  $\mu$ M) e doador de NO (SNP; 10 nM - 100  $\mu$ M) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. Também foram construídas curvas concentração-resposta ao heme (10  $\mu$ M - 300  $\mu$ M) para avaliar o relaxamento em corpos cavernosos pré-incubados com veículo (DMSO, 30 minutos). A resposta relaxante induzida por estes agentes também foi avaliada em tecidos pré-incubados com o 1J (inibidor da heme oxigenase; 10  $\mu$ M) por 30 minutos, antes da pré-incubação com o heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO).

A resposta relaxante foi calculada em relação à contracção máxima produzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), a qual foi tomada como 100%. A resposta contrátil foi calculada em mN. Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência ( $pEC_{50}$ ) e resposta máxima ( $E_{max}$ ) foram calculados pela seguinte equação:  $E = E_{max}/[(1+(10^c/10^x)^N) + \Phi]$ , os valores de resposta máxima e potência foram calculados, onde: “E”: elevação do tônus basal; “ $E_{max}$ ”: a máxima resposta que o agonista pode produzir; “c”: o logaritmo da  $EC_{50}$ , que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x”: o logaritmo da

concentração do agonista; “N” exponencial: a inclinação da curva concentração-resposta; “ $\Phi$ ”: a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para obter os parâmetros  $E_{max}$ ,  $\log EC_{50}$  e o “n” foram feitas usando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro  $\Phi$  como zero.

### 5.3. Estimulação elétrica

De acordo com experimentos prévios de Silva e Antunes (2014) para a investigação da estimulação elétrica (EFS), foram utilizados dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela e, entre eles, foram incubados os corpos cavernosos, os quais eram estimulados eletricamente (50 V), com duração dos pulsos de 1 milissegundo (ms), intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração da estimulação de 10 segundos, nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 2 minutos entre os estímulos.

As respostas relaxantes à estimulação elétrica (EFS, 2-32 Hz) foram avaliadas em corpos cavernosos primeiramente tratados com atropina (1  $\mu$ M, para bloquear a resposta muscarínica) e guanetidina (30  $\mu$ M, para depletar os estoques de noradrenalina) durante 30 minutos. Os tecidos também foram pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) durante 30 minutos. Logo após, os corpos cavernosos foram pré-contráídos com fenilefrina (10  $\mu$ M) para a construção da curva frequência-resposta (2-32 Hz). A resposta relaxante induzida pela EFS também foi avaliada em tecidos pré-incubados com o 1J (inibidor da heme oxigenase; 10  $\mu$ M) por 30 minutos, antes da pré-incubação com o heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%.

As respostas contráteis induzidas pela EFS foram analisadas em tecidos previamente tratados com L-NAME (100  $\mu$ M, inibidor não seletivo da NOS) e atropina (1  $\mu$ M, antagonista de receptores muscarínicos). Os tecidos também foram pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) durante 30 minutos. A resposta contrátil induzida pela EFS também foi avaliada em tecidos pré-incubados com o 1J (inibidor da heme oxigenase; 10  $\mu$ M) ou ODQ (inibidor da GCs; 10  $\mu$ M) por 30 minutos antes da pré-incubação com o heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO). As respostas contráteis foram medidas em mN.

### 5.4. Determinação dos níveis de GMPc

Para a determinação dos níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de camundongos, os tecidos foram incubados durante 30 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Os tecidos foram então estimulados por 30 min com heme (100 µM) ou veículo (DMSO = controle). Alguns tecidos foram incubados com o composto 1J (100 µM, 30 min) ou ODQ (100 µM, 30 min) antes da adição de heme ou DMSO. Para controle positivo utilizamos SNP (100 µM, 15 min). Também incubamos alguns corpos cavernosos com SNP (100 µM, 15 min) e, após esse tempo, foi incubado ODQ (100 µM, 30 min). Em seguida, todos os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 2000 g por 10 min à 4 °C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do tracer, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram feitas conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP ELISA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata e o peso do pellet foi utilizado para normalizar os dados que foram expressos em pmol/mg de tecido.

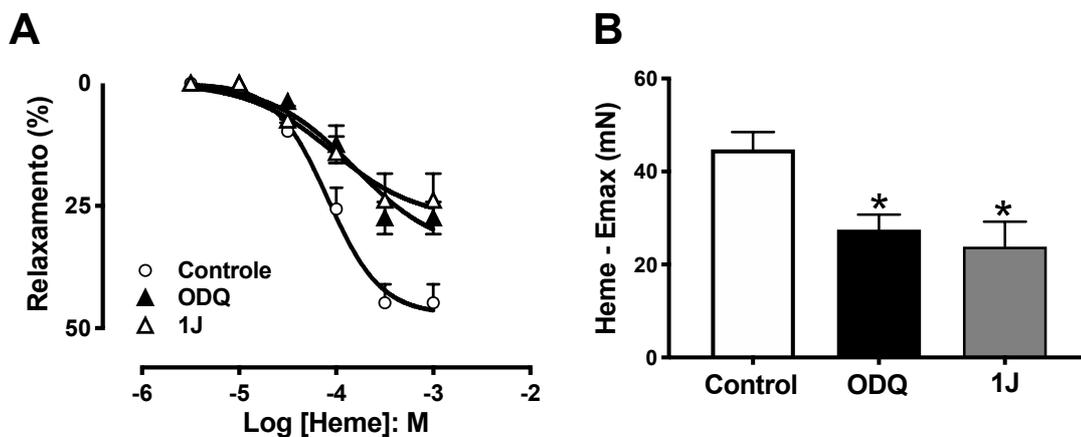
### ***5.5. Análise estatística***

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão das médias (E.P.M.) de *n* experimentos indicados em cada caso. Teste t não-pareado de *Student* foi utilizado para comparação de dois grupos. Para comparações múltiplas entre 3 grupos, foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-uma via), seguido pelo teste de Tukey. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo heme: efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel e heme oxigenase *in vitro*

O heme (10  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ ) produziu relaxamento dependente da concentração em corpos cavernosos de camundongos saudáveis (Figura 7A). O relaxamento também foi avaliado em tecidos pré-incubados com ODQ (10  $\mu\text{M}$ , inibidor da guanilato ciclase solúvel) ou 1J (10  $\mu\text{M}$ , inibidor não seletivo da heme oxigenase) por 30 minutos (Figura 7A). O ODQ e o 1J reduziram significativamente os valores de resposta máxima do heme (Figura 7B).



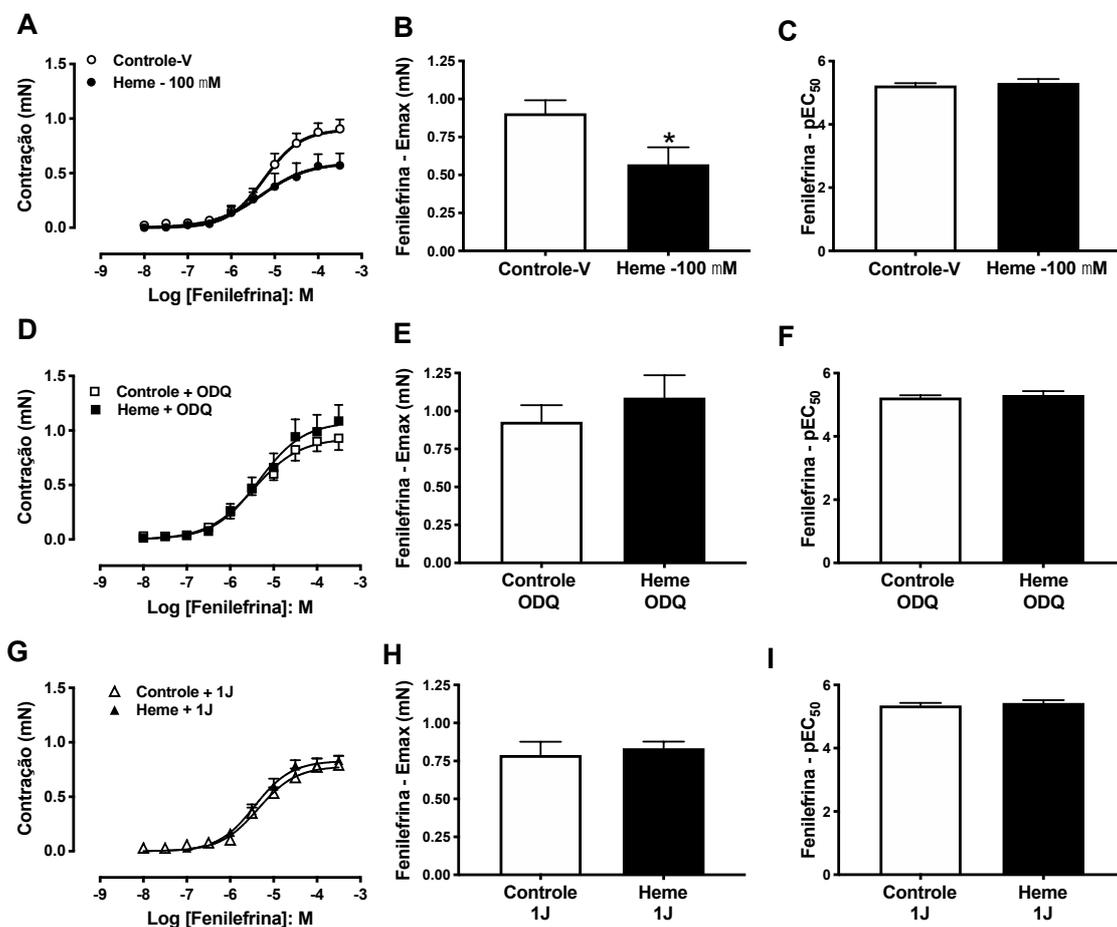
**FIGURA 7.** Curvas concentração-efeito ao heme em corpos cavernosos de camundongos na presença do ODQ e 1J. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  comparado com o grupo controle.

### 6.2. Papel do heme na contração de corpo cavernoso induzida pela fenilefrina: efeito do inibidor da GCs e heme oxigenase *in vitro*

A contração dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliada através da construção de curvas concentração-resposta cumulativas á fenilefrina (1 nM – 300  $\mu\text{M}$ ) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu\text{M}$ ) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. A fenilefrina produziu contração dependente da concentração nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100  $\mu\text{M}$ ) e no grupo controle (Figura 8A). A resposta máxima ( $E_{\text{max}}$ ) da fenilefrina foi significativamente ( $P < 0.05$ ) menor nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100  $\mu\text{M}$ ) em comparação com o grupo controle (Figura 8B) e não houve diferença para os valores de potência ( $p\text{EC}_{50}$ ) (Figura 8C).

A contração dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliada em tecidos pré-incubados com ODQ (10  $\mu$ M, inibidor da guanilato ciclase solúvel) por 30 minutos (Figura 8D). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  (Figura 8E) e  $pEC_{50}$  (Figura 8F) para a fenilefrina entre os grupos controle-ODQ e Heme-ODQ.

A contração dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliada em tecidos pré-incubados com 1J (10  $\mu$ M, inibidor da não seletivo da heme oxigenase) por 30 minutos (Figura 8G). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  (Figura 8H) e  $pEC_{50}$  (Figura 8I) para a fenilefrina entre os grupos controle-1J e Heme-1J.



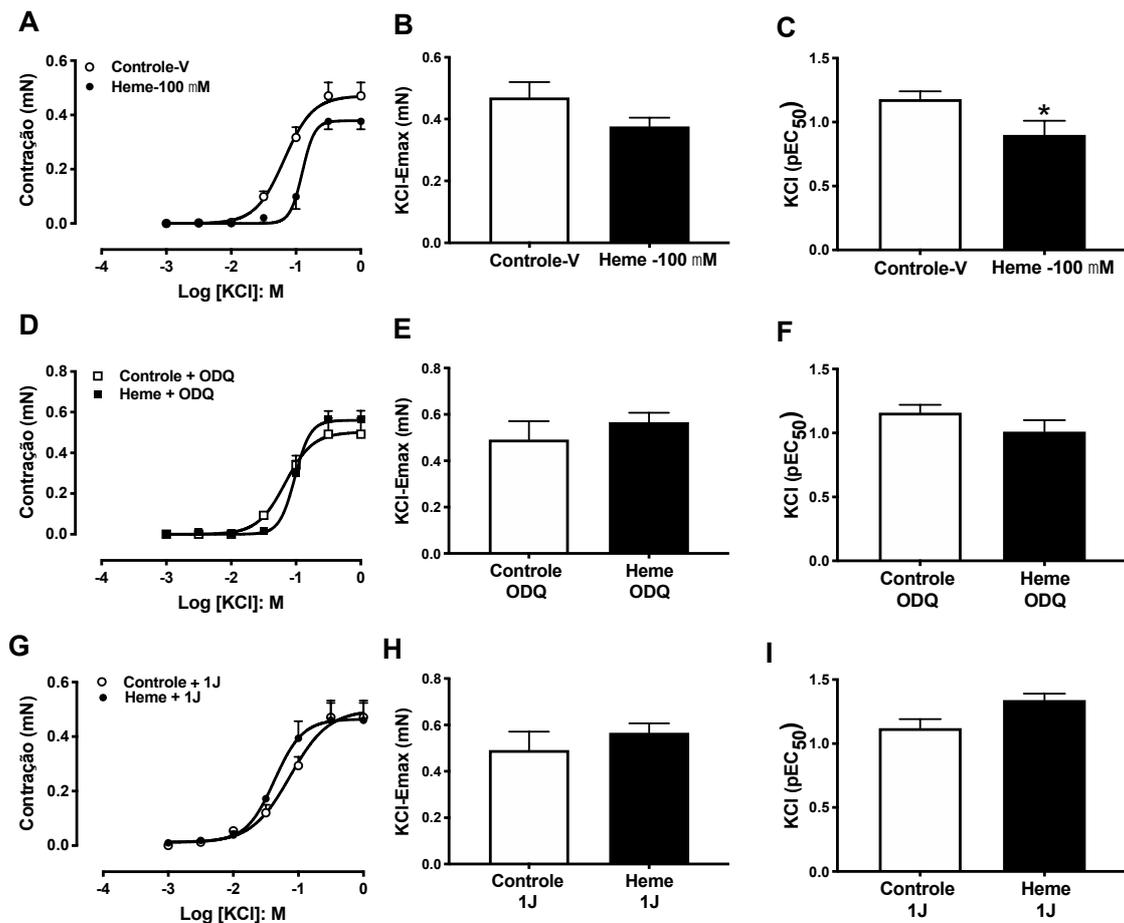
**FIGURA 8.** Curvas concentração-efeito à fenilefrina em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + ODQ (D) e heme + 1J (G). Painel B, E e H: valores de resposta máxima ( $E_{max}$ ). Painel C, F e I: valores de potência ( $pEC_{50}$ ). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 7 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \*  $P < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle.

### ***6.3. Papel do heme na contração de corpo cavernoso induzida pelo KCl: efeito do inibidor da GCs e heme oxigenase***

A contração dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliada através da construção de curvas concentração-resposta cumulativas ao KCl (1 – 300 mM) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. O KCl produziu contração dependente da concentração nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) e no grupo controle (Figura 9A). A resposta máxima ( $E_{max}$ ) do KCl não foi modificada após a pré-incubação com o heme (100  $\mu$ M) em comparação com o grupo controle (Figura 9B). Entretanto, os valores de potência ( $pEC_{50}$ ) para o KCl foram significativamente menores no grupo heme em comparação com o grupo controle (Figura 9C).

A contração dos corpos cavernosos induzida pelo KCl foi avaliada em tecidos pré-incubados com ODQ (10  $\mu$ M, inibidor da guanilato ciclase solúvel) por 30 minutos (Figura 9D). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  (Figura 9E) e  $pEC_{50}$  (Figura 9F) para o KCl entre os grupos controle-ODQ e Heme-ODQ.

A contração dos corpos cavernosos induzida pelo KCl também foi avaliada em tecidos pré-incubados com 1J (10  $\mu$ M, inibidor da não seletivo da heme oxigenase) por 30 minutos (Figura 9G). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  (Figura 9H) e  $pEC_{50}$  (Figura 9I) para o KCl entre os grupos controle-IJ e Heme-IJ.



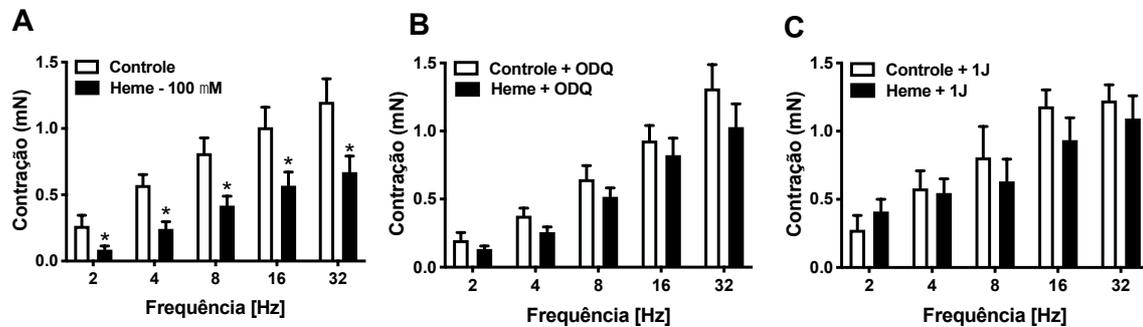
**FIGURA 9.** Curvas concentração-efeito ao KCl em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + ODQ (D) e heme + 1J (G). Painel B, E e H: valores de resposta máxima (E<sub>max</sub>). Painel C, F e I: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.

#### 6.4. Contração de corpo cavernoso induzida pela estimulação elétrica: efeito do heme in vitro

A contração dos corpos cavernosos induzidas pela EFS foram avaliadas em tecidos pré-incubados com heme (100 μM) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. A EFS da preparação induziu contrações frequência-dependentes nos corpos cavernosos (2-32 Hz) que foram abolidas pela pré-incubação com guanetidina (30 μM, N=10), confirmando que as respostas contráteis induzidas pelas EFS são mediadas pela liberação de noradrenalina. Nos corpos cavernosos pré-incubados com heme, a resposta neurogênica contrátil foi menor (P < 0.05) em comparação com o grupo controle, em todas as frequências estudadas (Figura 10A).

A contração dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliada em tecidos pré-incubados com ODQ (10 μM, inibidor da guanilato ciclase solúvel; Figura 10B) ou 1J (10 μM,

inibidor da não seletivo da heme oxigenasse; Figura 10C) por 30 minutos. Não houve diferença na contração neurogênica entre os grupos controle-ODQ e Heme-ODQ, assim como entre os grupos controle-1J e Heme-1J.

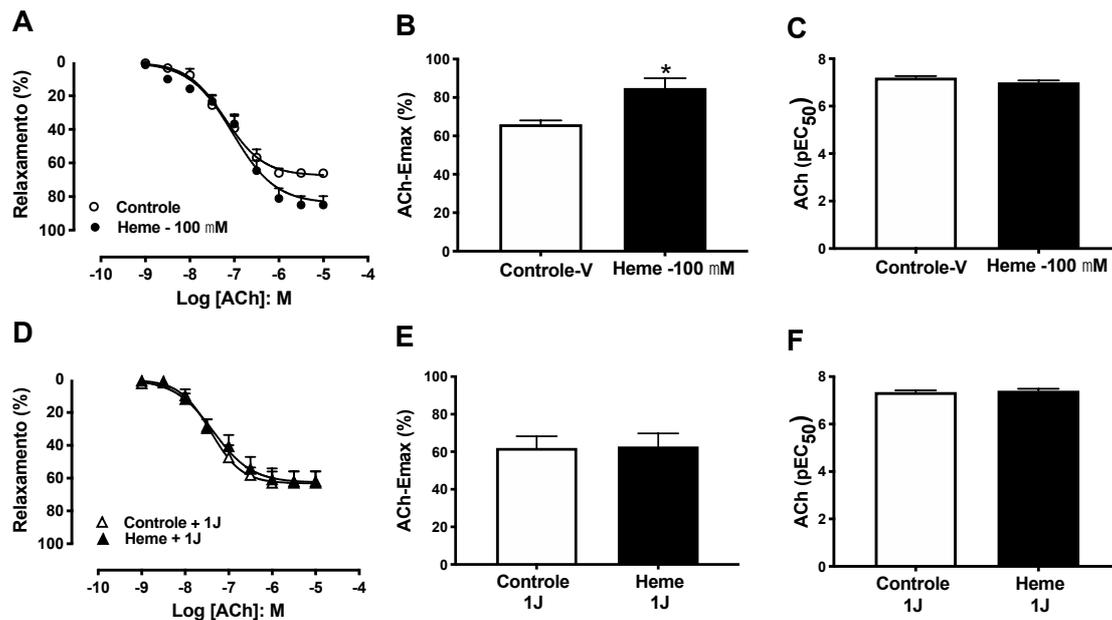


**FIGURA 10.** Contração induzida pela EFS em corpos cavernosos na presença do heme (A), heme + ODQ (B) e heme + 1J (C). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \*  $P < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle.

### 6.5. Relaxamento de corpo cavernoso induzida pela acetilcolina: efeito do heme *in vitro*

O relaxamento dependente de endotélio em corpos cavernosos dos camundongos foi avaliado através da construção de curvas concentração-resposta cumulativas á acetilcolina (ACh, 1 nM – 10  $\mu$ M) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. A ACh produziu relaxamento dependente da concentração nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) e no grupo controle (Figura 11A). A resposta máxima ( $E_{max}$ ) da ACh foi significativamente ( $P < 0.05$ ) maior nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) em comparação com o grupo controle (Figura 11B) e não houve diferença para os valores de potência ( $pEC_{50}$ ) (Figura 11C).

O relaxamento dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliado em tecidos pré-incubados com 1J (10  $\mu$ M, inibidor da não seletivo da heme oxigenase) por 30 minutos (Figura 11D). Não houve diferença nos valores de  $E_{max}$  (Figura 11E) e  $pEC_{50}$  (Figura 11F) para a ACh entre os grupos controle-1J e Heme-1J.

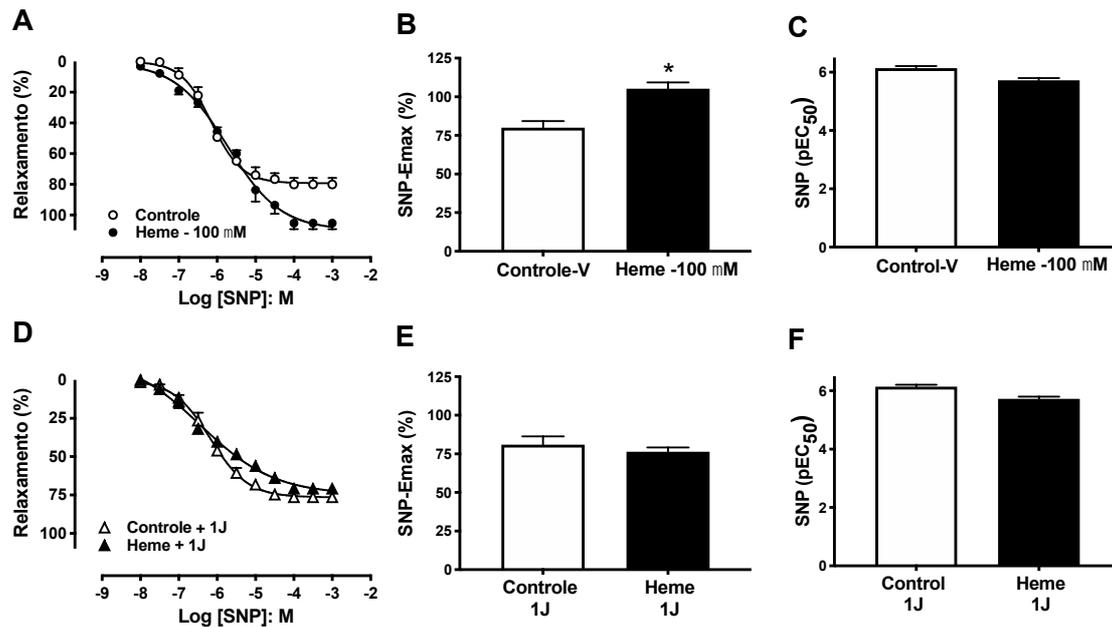


**FIGURA 11.** Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + 1J (D). Paineis B e E: valores de resposta máxima (Emax). Paineis C e F: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.

### 6.6. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo nitroprussiato de sódio: efeito do heme *in vitro*

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 100 μM) em corpos cavernosos pré-incubados com heme (100 μM) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. O SNP produziu relaxamento dependente da concentração nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100 μM) e no grupo controle (Figura 12A). A resposta máxima (E<sub>max</sub>) do SNP foi significativamente (P < 0.05) maior nos corpos cavernosos pré-incubados com heme (100 μM) em comparação com o grupo controle (Figura 12B) e não houve diferença para os valores de potência (pEC<sub>50</sub>) (Figura 12C).

O relaxamento dos corpos cavernosos dos camundongos foi avaliado em tecidos pré-incubados com 1J (10 μM, inibidor da não seletivo da heme oxigenase) por 30 minutos (Figura 12D). Não houve diferença nos valores de E<sub>max</sub> (Figura 12E) e pEC<sub>50</sub> (Figura 12F) para o SNP entre os grupos controle-1J e Heme-1J.

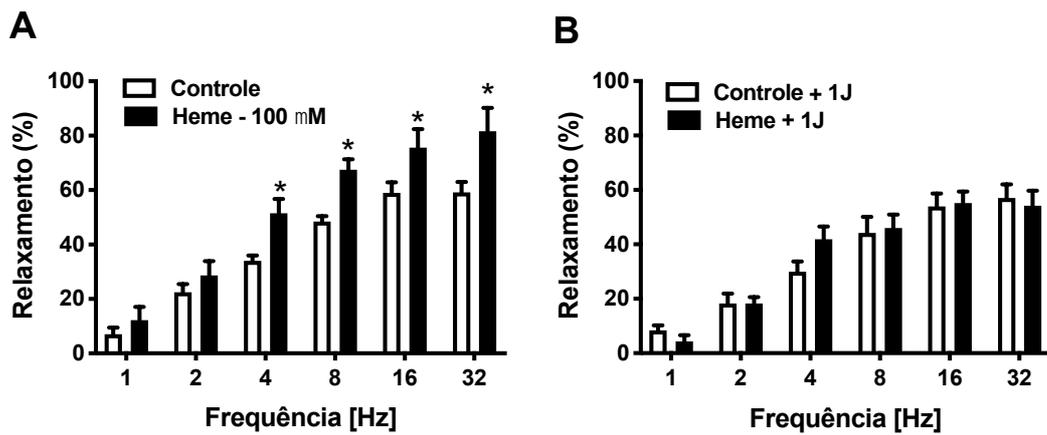


**FIGURA 12.** Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos na presença do heme (A) ou heme + 1J (D). Painel B e E: valores de resposta máxima (Emax). Painel C e F: valores de potência (pEC<sub>50</sub>). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. As respostas contráteis são apresentadas em mN. \* P<0,05 comparado com o respectivo grupo controle.

### 6.7. Relaxamento de corpo cavernoso induzida pela estimulação elétrica: efeito do heme *in vitro*

Os relaxamentos nitrérgicos foram avaliados em corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M), pré-tratados com guanetidina (30  $\mu$ M) e atropina (1  $\mu$ M). A estimulação elétrica da preparação induziu relaxamentos frequência-dependentes (1-32 Hz) em tecidos pré-incubados com heme (100  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) por 30 minutos. Nos corpos cavernosos pré-incubados com heme, o relaxamento neurogênico foi maior (P < 0.05) em comparação com o grupo controle, nas frequências de 4-32 Hz (Figura 13A).

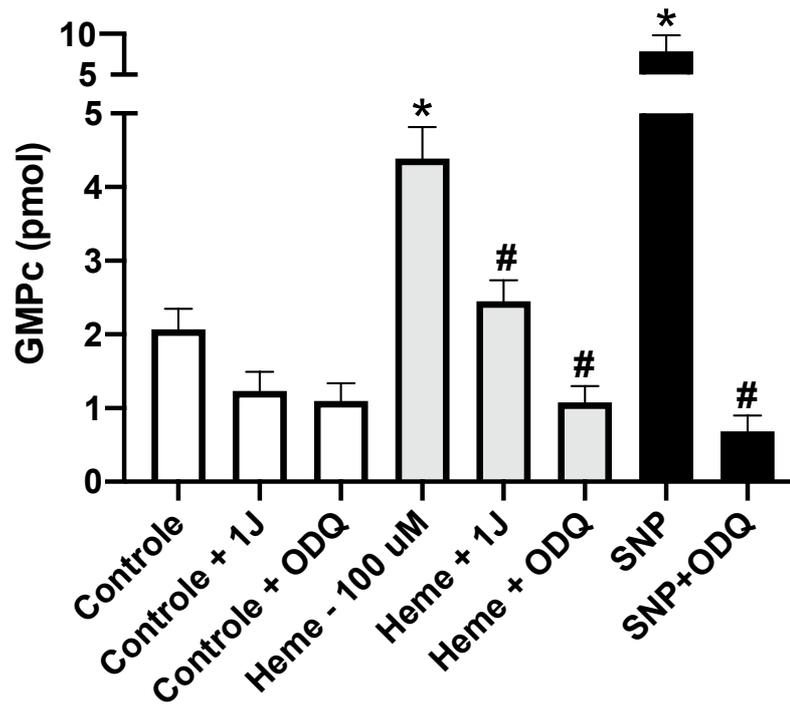
Os relaxamentos nitrérgicos dos corpos cavernosos dos camundongos foram avaliados em tecidos pré-incubados com o composto 1J (10  $\mu$ M) por 30 minutos. Não houve diferença na contração neurogênica entre os grupos controle-1J e Heme-1J (Figura 13B).



**FIGURA 13. Relaxamento induzido pela EFS em corpos cavernosos na presença do heme (A) e heme + 1J (B).** O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 experimentos. \*  $P < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle.

#### 6.8. Determinação dos níveis de GMPc em corpos cavernosos

Os níveis basais de GMPc nos corpos cavernosos foram 112% maiores no grupo heme (100  $\mu$ M) em comparação com o grupo controle (Figura 14). A pré-incubação dos corpos cavernosos com 1J (100  $\mu$ M) ou ODQ (100  $\mu$ M) reduziu significativamente ( $P < 0.05$ ) os níveis de GMPc em comparação o grupo heme (100  $\mu$ M) e não alterou no grupo controle (Figura 14). Como controle positivo, o SNP (100  $\mu$ M) aumentou significativamente ( $P < 0.05$ ) os níveis de GMPc em comparação com o grupo controle. O ODQ (100  $\mu$ M) aboliu o aumento dos níveis de GMPc pelo SNP (Figura 14).



**FIGURA 14.** Níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de camundongos. Os níveis de GMPc são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 5 animais. \*P < 0.05 comparado com o grupo controle. #P < 0.05 comparado com o respectivo grupo (na ausência do ODQ ou 1J).

## 7. DISCUSSÃO

Estudos clínicos indicam uma correlação forte e positiva entre o priapismo e os níveis elevados de hemólise intravascular em homens com anemia falciforme (BELCHER et al., 2014; GLADWIN, 2016; HVIDBERG et al., 2005). Na anemia falciforme, devido aos níveis elevados de hemólise, altas concentrações de heme são liberadas da hemoglobina para o plasma, saturando e reduzindo os níveis de hemopexina, dessa forma, acumulando heme livre plasmático (DETZEL et al., 2021). O excesso de heme no plasma participa da fisiopatologia da anemia falciforme causando danos teciduais e estimulando a vaso-oclusão (KATO et al., 2018; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito do heme nos mecanismo de relaxamento e contração do músculo liso de corpos cavernosos. Portanto, no presente estudo, investigamos o efeito do heme no relaxamento induzido pela via NO-GCs-GMPc, assim como na contração induzida pela estimulação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgico em corpos cavernosos isolados de camundongos C57BL/6.

Durante o estado de flacidez peniana, a atividade simpática promove a liberação do neurotransmissor noradrenalina que causa contração das arteríolas e dos sinusóides dos corpos cavernosos, permitindo pequena quantidade de influxo arterial no pênis. A noradrenalina causa contração do tipo concentração-dependente em corpos cavernosos, artérias e veias penianas (ANDERSSON, 2011). O receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico é funcionalmente predominante em corpo cavernoso e o agonista deste receptor, fenilefrina, promove potente contração no músculo liso desse tecido (CHRIST et al., 1990; IMAGAWA et al., 1989). Em camundongos transgênicos para anemia falciforme, o priapismo tem sido associado com a redução da atividade contrátil do músculo liso dos corpos cavernosos (BIVALACQUA et al., 2012). Em nosso estudo, avaliamos inicialmente o efeito do heme na contração induzida pela fenilefrina e estimulação neurogênica (EFS). A pré-incubação com o heme reduziu a contração de corpos cavernosos induzidos pela fenilefrina e EFS. O KCl promove contração independente de receptores, atua despolarizando a membrana celular do músculo liso e promove influxo de cálcio que é um estímulo essencial para a contração do músculo liso (LA FAVOR, 2018). Nós verificamos que a pré-incubação com o heme também reduziu a contração de corpos cavernosos promovida pelo KCl. O grupamento heme é metabolizado pela heme oxigenase, gerando CO, que por sua vez ativa a GCs, gerando GMPc e levando ao relaxamento do músculo liso de vasos (MONTFORT, 2017; SHAMLOUL, 2009). Em nossa pesquisa, é provável que o acúmulo de GMPc esteja induzindo o relaxamento do músculo liso de corpos cavernosos e com isso reduzindo a resposta contrátil da fenilefrina e do KCl no tecido erétil. Um estudo anterior relatou que a incubação de

heme, reduziu a vasoconstrição induzida pela fenilefrina em artéria caudal de ratos através de um mecanismo dependente de CO e GMPc (WANG; WANG; WU, 1997). Outros autores mostraram que o heme diminuiu a contração de artérias placentárias em 61%, através de um mecanismo dependente de CO e HO (AHMED et al., 2000).

O ODQ é um inibidor da GCs usado como ferramenta farmacológica para avaliar mecanismos dependente de GCs-GMPc. Em nossa avaliação, o ODQ inibiu o efeito do heme em reduzir a contração induzida pelo agonista dos receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos e KCl nos corpos cavernosos, indicando que o heme exerce seus efeitos através da ativação da GCs. O CO gerado do metabolismo do heme é conhecido por ativar a GCs (STONE; MARLETTA, 1994) e induzir o relaxamento do músculo liso de corpo cavernoso (USHIYAMA et al., 2004) e artérias (MUSTAFA et al., 2009; WANG et al., 1997). Nós verificamos que o inibidor da heme oxigenase (1J) também inibiu o efeito do heme em reduzir a contração induzida pela fenilefrina e KCl, indicando que o metabolismo do heme é necessário para o seu efeito farmacológico. É provável que o metabolismo do heme esteja gerando CO que ativa a GCs, gerando GMPc nas células musculares lisas dos corpos cavernosos, assim reduzindo a contração.

O NO nitrérgico é o principal mediador do relaxamento neurogênico do músculo liso peniano (ANDERSSON, 2011). Estudo prévio mostrou que o endotélio sinusoidal também libera NO em resposta à ACh (TEJADA et al., 1988). Entretanto, a remoção do endotélio sinusoidal do tecido cavernoso não previne o relaxamento nitrérgico (IGNARRO et al., 1990; KIM et al., 1993). Estudos experimentais mostram que é provável que o NO liberado das fibras nitrérgicas promove o início do processo de ereção peniana, enquanto o NO derivado do endotélio, concomitantemente com o NO nitrérgico, atue na sustentação do processo erétil (HURT et al., 2002; 2012). Desta forma, decidimos investigar, o relaxamento induzido pela ACh e pela estimulação elétrica em corpos cavernosos de camundongos pré-incubados com o heme. O heme aumentou o relaxamento dependente de endotélio induzido pela ACh e estimulação neurogênica (EFS), efeito que foi abolido pelo inibidor da HO, indicando que o metabolismo do heme também potencializa o relaxamento induzido pela estimulação da via GCs-GMPc. A administração de heme via intraperitoneal aumentou o relaxamento induzido pela ACh em aortas de ratos diabéticos (CHEN et al., 2008). Estudo anterior examinando a via HO-CO, mostra que o CO regula positivamente o relaxamento induzido pelo EFS no corpo cavernoso do rato (USHIYAMA et al., 2004). Também foi mostrado que o CO aplicado exogenamente induziu relaxamento dependente da concentração em artéria da cauda de rato pré-contraída com fenilefrina (WANG; WANG; WU, 1997).

Os doadores de NO são compostos que podem fornecer NO exogenamente para os tecidos e células. O composto inorgânico SNP é um agente que libera NO no sistema biológico por mecanismos não enzimáticos e enzimáticos, produzindo relaxamento independente de endotélio, mas dependente de GMPc (BONAVENTURA et al., 2008; FEELISCH et al., 1998; KOWALUK et al., 1992). Estudo anterior relatou também que o relaxamento induzido pelo SNP é potencializado pelo NO oriundo do endotélio em aorta de rato (BONAVENTURA et al., 2008). Em nossos resultados, o relaxamento induzido pelo SNP foi maior nos corpos cavernosos pré-incubados com heme, o qual foi inibido pela pré-incubação do inibidor da HO. É provável que a ativação da via CO-GCs-GMPc originada pelo metabolismo do heme esteja favorecendo o relaxamento induzido pelo SNP. De acordo com nosso resultado, estudo anterior relatou que o relaxamento de corpos cavernosos induzido pelo CO é potencializado pela ativação da GCs (DECALUWÉ et al., 2012).

O grupamento heme promove relaxamento de artérias de animais através da ativação da via CO-GCs (HOSEIN et al., 2002; KOZMA et al., 1997). Um estudo anterior mostrou que o tratamento crônico com o heme, assim como a administração sistêmica de uma única dose de heme aumentou a produção de GMPc em corpos cavernosos de ratos por mecanismo dependente da HO (AZIS et al., 2008). Entretanto, nosso estudo é o primeiro a mostrar que o heme promove relaxamento dependente da concentração em corpos cavernosos. O relaxamento induzido pelo heme foi reduzido pelo inibidor da HO ou GCs. De acordo com estes resultados, os níveis de GMPc foram maiores nos corpos cavernosos pré-incubados com o heme, e inibidos pela pré-incubação com o inibidor da HO ou GCs. No geral, estes resultados indicam que o subproduto, CO, gerado pelo metabolismo do heme através da HO e a ativação da via GCs-GMPc são responsáveis pelo efeito farmacológico do heme nos corpos cavernosos.

## 8. CONCLUSÃO

O heme *in vitro* reduziu a contração do músculo liso de corpos cavernosos em camundongos C57BL/6, assim como aumentou o relaxamento estimulado pela via NO-GMPc no tecido erétil. Os efeitos farmacológicos do heme foram bloqueados pela inibição da HO e GCs, indicando que o mecanismo do heme é dependente da HO e GCs. É provável que a ativação da via CO-GCs-GMPc, resultante do excesso de heme livre, pode contribuir para o priapismo na anemia falciforme. Nosso estudo aponta o heme como um novo alvo farmacológico para o tratamento do priapismo e abre caminhos para novas terapias que busquem reduzir o excesso de heme no plasma, como o tratamento com a hemopexina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYOJU, A.B.; OLUJOHUNGBE, A.B.K.; MORRIS, J.; YARDUMIAN, A.; BAREFORD, D.; AKENOVA, A.; et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. **BJU Int.**, v. 90, p. 898–902, 2002.

AHMED, A.; RAHMAN, M.; ZHANG, X.; ACEVEDO, C.H.; NIJJAR, S.; RUSHTON, I.; BUSSOLATI, B.; JOHN, J.S.T. Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. **Mol. Med.**, 6(5):391-409, 2000.

AHMED, M. H.; GHATGE, M. S.; SAFO, M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. **Sub-cellular biochemistry**, 94, 345–382, 2020.

ALVAIA, M. A.; MAIA, H.; NELLI, A. M.; GUIMARÃES, C.; CARVALHO, E.; NETTO, J.; MIRANDA, E. P.; GOMES, C. M.; BESSA JÚNIOR, J. Prevalence of priapism in individuals with sickle cell disease and implications on male sexual function. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, 18, eAO5070, 2020.

ANDERSSON, K-E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 811–859, 2011.

ANELE, U.A.; LE, B.V.; RESAR, L.M.S.; BURNETT, A.L. How I treat priapism. **Blood**, v. 125, p. 3551–3558, 2015.

ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciformes**. Brasília, 2001.

BELCHER, J.D.; CHEN, C.; NGUYEN, J.; MILBAUER, L.; ABDULLA, F.; ALAYASH, A.I. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, p. 377–390, 2014.

BERRIDGE, M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **J. Physiol.**, v. 586, p. 5047–5061, 2008.

BIVALACQUA, T.J.; ROSS, A.E.; STRONG, T.D.; GEBSKA, M.A.; MUSICKI, B.; CHAMPION, H.C.; et al. Attenuated RhoA/Rho-kinase signaling in penis of transgenic sickle cell mice. **Urology**, v. 76, p. 510, 2010.

BIVALACQUA, T.J; MUSICKI, B.; KUTLU, O.; BURNETT, A.L. New insights into the pathophysiology of sickle cell disease-associated priapism. **J. Sex. Med.**, v. 9, p. 79–87, 2006.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric oxide: biology and chemistry**, 18(4), 287–295, 2008.

BOON, E. M.; HUANG, S. H.; MARLETTA, M. A. A molecular basis for NO selectivity in soluble guanylate cyclase. **Nature chemical biology**, 1(1), 53–59, 2005.

BRASIL. Ministério da saúde. **Ministério da Saúde reforça a importância da detecção da Doença Falciforme**, 2020.

BURNETT, A.L.; ALLEN, R.P; TEMPANY, C.M; DOVER, G.J; BRENDLER, C.B. Evaluation of erectile function in men with sickle cell disease. **Urology**, v. 45, p. 657–663, 1995.

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

CHAMPION, H.C.; BIVALACQUA, T.J.; TAKIMOTO, E.; KASS, D.A.; BURNETT, A.L. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, p. 1661–1666, 2005.

CHEN, Y.S.; ZHU, X.X.; ZHAO, X.Y.; XING, H.Y.; LI, Y.G. Hemin, a heme oxygenase-1 inducer, improves aortic endothelial dysfunction in insulin resistant rats. **Chin. Med. J. (Engl.)**, 2008 Feb 5;121(3):241-7.

CITA, K-C.; BRUREAU, L.; LEMONNE, N.; BILLAUD, M.; CONNES, P.; FERDINAND, S.; et al. Men with Sickle Cell Anemia and Priapism Exhibit Increased Hemolytic Rate, Decreased Red Blood Cell Deformability and Increased Red Blood Cell Aggregate Strength. **PloS One**, v. 11, 2006.

DEAN, R.C.; LUE, T.F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol. Clin. North. Am.**, v. 32, p.379–395, 2005.

DECALUWÉ, K.; PAUWELS, B.; BOYDENS, C.; VAN DE VOORDE, J. Divergent molecular mechanisms underlay CO- and CORM-2-induced relaxation of corpora cavernosa. **The journal of sexual medicine**, 9(9), 2284–2292, 2012.

DEUEL, J. W.; VALLELIAN, F.; SCHAER, C. A.; PUGLIA, M.; BUEHLER, P. W.; SCHAER, D. J. Different target specificities of haptoglobin and hemopexin define a sequential protection system against vascular hemoglobin toxicity. **Free radical biology & medicine**, 89, 931–943, 2015.

EHMKE, H.; JÜNEMANN, K.P.; MAYER, B.; KUMMER, W. Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. **Int. J. Impot. Res.**, v. 7, p. 147–156, 1995.

EVGENOV, O.V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P.M.; HASKÓ, G.; SCHMIDT, H.H.H.W.; STASCH, J-P. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 755–768, 2012.

FEELISCH M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 358(1), 113–122, 1998.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur. Heart J.**, v.33, p. 829–837, 2012.

GLADWIN, M.T. Cardiovascular complications and risk of death in sickle-cell disease. **Lancet. Lond. Engl.**, v. 387, p. 2565–2574, 2016.

GLADWIN, M.T.; SACHDEV, V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 59, p. 1123–1133, 2012.

GRATZKE, C.; ANGULO, J.; CHITALEY, K.; DAI, Y-T.; KIM, N.N.; PAICK, J-S.; et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J. Sex. Med.**, v. 7, p. 445–475, 2010.

HEDLUND, P.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127: p. 349–360, 1999.

HOSEIN, S.; MARKS, G.S.; BRIEN, J.F.; MCLAUGHLIN, B.E.; NAKATSU, K. An extracellular source of heme can induce a significant heme oxygenase mediated relaxation in the rat aorta. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 80(8):761-5, 2002.

HOUWING, M. E.; DE PAGTER, P. J.; BEERS, E. J. V.; BIEMOND, B. J.; RETTENBACHER, E.; RIJNEVELD, A.; W.; SCHOLS, E. M.; PHILIPSEN, J.; TAMMINGA, R.; VAN DRAAT, K. F.; NUR, E.; CNOSSEN, M. H.; SCORE, C. Sick cell disease: Clinical presentation and management of a global health challenge. **Blood reviews**, 37, 100580, 2019.

HURT, K.J.; SEZEN, S.F.; LAGODA, G.F.; MUSICKI, B.; RAMEAU, G.A.; SNYDER, S.H.; et al. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, p. 16624–16629, 2012.

HURT, K.J.; MUSICKI, B.; PALESE, M.A.; CRONE, J.K.; BECKER, R.E.; MORIARITY, J.L.; et al. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 4061–4066, 2002.

HVIDBERG, V.; MANIECKI, M.B.; JACOBSEN, C.; HØJRUP, P.; MØLLER, H.J.; MOESTRUP, S.K. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. **Blood**, v. 106, p. 2572–2579, 2005.

KATO, G.J. Priapism in sickle-cell disease: a hematologist's perspective. **J. Sex. Med.**, v. 9, p. 70–78, 2012.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; LITTLE, J.A.; TAYLOR, J.; MORRIS, C.R.; et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v.107, p. 2279–2285, 2006.

KATO, G.J.; PIEL, F.B.; REID, C.D.; GASTON, M.H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, WR.; PANEPINTO, JA.; WEATHERALL, D.J.; COSTA, F.F.; VICHINSKY, E.P. Sick cell disease. **Nat. Ver. Dis. Primers**, v.4, n. 18010, p. 1-22, 2018.

KATO, G.J.; STEINBERG, M.H.; GLADWIN, M.T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **J. Clin. Invest.**, v. 127, p. 750-760, 2017.

KOZMA, F.; JOHNSON, R.A.; NASJLETTI, A. Role of carbon monoxide in heme-induced vasodilation. **Eur J Pharmacol.**, 4;323(2-3):R1-2, 1997.

KOWALUK, E. A.; SETH, P.; FUNG, H. L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 262(3), 916–922, 1992.

LA FAVOR, J.D.; FU, Z.; VENKATRAMAN, V.; BIVALACQUA, T.J.; VAN, E. J.E.; BURNETT, A.L. Molecular Profile of Priapism Associated with Low Nitric Oxide Bioavailability. **J. Proteome Res.**, v. 17, p. 1031-1040, 2018.

LAGODA, G.; SEZEN, S.F.; CABRINI, M.R.; MUSICKI, B.; BURNETT, A.L. Molecular analysis of erection regulatory factors in sickle cell disease associated priapism in the human penis. **J. Urol.**, v. 189, p. 762–768, 2013.

LAGODA, G.; SEZEN, S.F.; CABRINI, M.R.; MUSICKI, B.; BURNETT, A.L. Molecular Analysis of Erection Regulatory Factors in Sickle Cell Disease-Associated Priapism in Human Penis. **J. Urol.**, v.189, p.762–768, 2012.

LEONE, A.M.; WIKLUND, N.P.; HÖKFELT, T.; BRUNDIN, L.; MONCADA, S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. **Neuroreport**, v. 5, p. 733–736, 1994.

LUCAS, K.A; PITARI, G.M; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 375–414, 2000.

MANDAL, A.K.; MITRA, A.; DAS, R. Sickle Cell Hemoglobin. **Subcell Biochem**, 2020;94:297-322.

MANTADAKIS, E.; EWALT, D. H.; CAVENDER, J. D.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Outpatient penile aspiration and epinephrine irrigation for young patients with sickle cell anemia and prolonged priapism. **Blood**, 95(1), 78–82, 2000.

MACDONALD, S. M.; BURNETT, A. L. Physiology of Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **The Urologic clinics of North America**, 48(4), 513–525, 2021.

MITIDIERI, E.; CIRINO, G.; D'EMMANUELE, D. V. B. R.; SORRENTINO, R. Pharmacology and perspectives in erectile dysfunction in man. **Pharmacol. Ther.**, 2020.

MIZUSAWA, H.; HEDLUND, P.; HÅKANSSON, A.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 132, p. 1333–1341, 2001.

MONTFORT, W.R.; WALES, J.A.; WEICHSEL, A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 26, p. 107-121, 2017.

MULLER-EBERHARD, U.; JAVID, J.; LIEM, H.H.; HANSTEIN, A.; HANNA, M. Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. **Blood**, v. 32, p. 811–815, 1968.

MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. Mechanisms underlying priapism in sickle cell disease: targeting and key innovations on the preclinical landscape. **Expert opinion on therapeutic targets**, 24(5), 439–450, 2020.

MUSICKI, B.; BURNETT, A. L. Mechanisms underlying priapism in sickle cell disease: targeting and key innovations on the preclinical landscape. **Expert opinion on therapeutic targets**, 24(5), 439–450, 2020.

MUSICKI, B.; KARAKUS, S.; AKAKPO, W.; SILVA, F.H.; LIU, J.; CHEN, H.; ZIRKIN, B.R.; BURNETT, A.L. Testosterone replacement in transgenic sickle cell mice controls priapic activity and upregulates PDE5 expression and eNOS activity in the penis. **Androlog**, 6(1):184-191, 2018.

MUSICKI, B.; KARAKUS, S.; LA FAVOR, J.D.; CHEN, H.; SILVA, F.H.; STURNY, M.; ZIRKIN, B.R.; BURNETT, A.L. TSPO ligand FGIN-1-27 controls priapism in sickle cell mice via endogenous testosterone production. **J. Cell. Physiol.**, 236(4):3073-3082, 2021.

NANGLE M.R.; COTTER, M.A.; CAMERON, N.E. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.**, v. 448, p. 139–145, 2004.

NING, C.; WEN, J.; ZHANG, Y.; DAI, Y.; WANG, W.; ZHANG, W.; et al. Excess adenosine A2B receptor signaling contributes to priapism through HIF-1 $\alpha$  mediated reduction of PDE5 gene expression. **FASEB**, v. 28, p. 2725–2735, 2014.

NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRER, L.A.; STEINBERG, M.H. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v.106, p. 3264–3267, 2005.

PÁSZTY, C.; BRION, C.M.; MANCI, E.; WITKOWSKA, H.E.; STEVENS, M.E.; MOHANDAS, N.; et al. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. **Science**, v. 278, p. 876–878, 1997.

PIEL, F.B.; STEINBERG, M.H.; REES, D.C. Sickle Cell Disease. **N. Engl. J. Med.**, 376: 1561-1573, 2017.

REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, p. 2018–2031, 2010.

REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E; HOGG, N.; CANNON, R.O.; SCHECHTER, A.N.; et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat. Med.**, v. 8; p. 1383–1389, 2002.

SALONIA, A.; EARDLEY, I.; GIULIANO, F.; HATZICHRISTOU, D.; MONCADA, I.; VARDI, Y.; et al. European Association of Urology guidelines on priapism. **Eur. Urol.**, v. 65, p. 480–489, 2014.

SCHAER, C. A.; DEUEL, J. W.; SCHILDKNECHT, D.; MAHMOUDI, L.; GARCIA-RUBIO, I.; OWCZAREK, C.; SCHAUER, S.; KISSNER, R.; BANERJEE, U.; PALMER, A. F.; SPAHN, D. R.; IRWIN, D. C.; VALLELIAN, F.; BUEHLER, P. W.; SCHAER, D. J. Haptoglobin Preserves Vascular Nitric Oxide Signaling during Hemolysis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 193(10), 2016.

SCHAER, D.J.; BUEHLER, P.W.; ALAYASH, A.I.; BELCHER, J.D.; VERCELLOTTI, G.M. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, v. 121, p. 1276–1284, 2013.

SHAMLOUL, R. The potential role of the heme oxygenase/carbon monoxide system in male sexual dysfunctions. **J. Sex. Med.**, v. 6, p. 324-333, 2009.

SILVA, F.H.; ANTUNES, E. Role of oxidative stress in erectile dysfunction in middle-aged rats: prevention by antioxidant therapy. **UNICAMP**, 2014.

SILVA, F.H.; CLAUDINO, M.A.; CALMASINI, F.B.; ALEXANDRE, E.C.; FRANCO-PENTEADO, C.; BURNETT, A.L.; et al. Sympathetic Hyperactivity, Increased Tyrosine Hydroxylase and Exaggerated Corpus Cavernosum Relaxations Associated with Oxidative Stress Plays a Major Role in the Penis Dysfunction in Townes Sickle Cell Mouse. **PloS One**, v. 11, 2016. a

SILVA, F.H.; KARAKUS, S.; MUSICKI, B.; MATSUI, H.; BIVALACQUA, T.J.; DOS SANTOS, J.L.; et al. Beneficial effect of the nitric oxide donor compound 3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)benzyl nitrate on dysregulated phosphodiesterase 5, NADPH oxidase and nitrosative stress in the sickle cell mouse penis: implication for priapism treatment. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2016. b

SMITH, A.; MORGAN, W.T. Haem transport to the liver by haemopexin. Receptor-mediated uptake with recycling of the protein. **Biochem J.**, v.182, p. 47–54, 1979.

SOPKO, N.A.; MATSUI, H.; HANNAN, J.L.; BERKOWITZ, D.; CHAMPION, H.C.; HSU, L.L.; MUSICKI, B.; BURNETT, A.L.; BIVALACQUA, T.J. Subacute Hemolysis in Sickle Cell Mice Causes Priapism Secondary to NO Imbalance and PDE5 Dysregulation. **J. Sex. Med.**, v. 12, p. 1878-1885, 2015.

TEJADA, I. S. D.; BLANCO, R.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; DE LAS MORENAS, A.; KRANE, R.J.; et al. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 459-467, 1988.

USHIYAMA, M.; MORITA, T.; KURAMOCHI, T.; YAGI, S.; KATAYAMA, S. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. **Hypertens Res.**, 2004 Apr;27(4):253-61.

VERCELLOTTI, G.M.; ZHANG, P.; NGUYEN, J.; ABDULLA, F.; CHEN, C.; NGUYEN, P.; et al. Hepatic Overexpression of Hemopexin Inhibits Inflammation and Vascular Stasis in Murine Models of Sickle Cell Disease. **Mol. Med. Camb. Mass.**, v. 22, p. 437–451, 2016.

VERHEIJEN, M.; LIENHARD, M.; SCHROODERS, Y.; CLAYTON, O.; NUDISCHER, R.; BOERNO, S.; TIMMERMANN, B.; SELEVSEK, N.; SCHLAPBACH, R.; GMUENDER, H.; GOTTA, S.; GERAEDTS, J.; HERWIG, R.; KLEINJANS, J.; CAIMENT, F. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. **Scientific reports**, 9(1), 4641, 2019.

VINCHI, F.; DE FRANCESCHI, L.; GHIGO, A.; TOWNES, T.; CIMINO, J.; SILENGO, L.; et al. Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. **Circulation**, v. 127, p. 1317–1329, 2013.

WANG, R.; WANG, Z.; WU, L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. **Br. J. Pharmacol.** 1997 Jul;121(5):927-34.

WU, L-C.; SUN, C-W.; RYAN, T.M.; PAWLIK, K.M.; REN, J.; TOWNES, T.M. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. **Blood**, v. 108, p. 1183–1188, 2006.

YALAMANOGLU, A.; DEUEL, J.W.; HUNT, R.C.; BAEK, J.H.; HASSELL, K.; REDINIUS, K.; et al. Depletion of haptoglobin and hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 315, p. L765–L774, 2018.

YILDIRIM, C.; ERTURK, H.; PEKKAN, K.; DENIZ, S.; SEREFOGLU, E.C. A novel method for hemodynamic analysis of penile erection. **Int. J. Impot. Res.**, 2020.

## ANEXOS

### Anexo I: Parecer do Comitê de Ética



Bragança Paulista, 18 de Março de 2021

**Projeto de Pesquisa:** "Papel do heme livre na fisiopatologia do priapismo: estudos funcionais, bioquímicos e moleculares."

**Área de Conhecimento:** 2.10.06.00-8 Farmacologia

**Autor:** Prof. Fábio Henrique da Silva

**Colaboradores:** Dalila Andrade Pereira

**Instituição:** Universidade São Francisco

**Protocolo:** 002.03.2020

**IP. Ciúca:** 200.225.122.34

**CIAEP/CONCEA Nº** 01.226.2014

**Vigência do Projeto:** 19/03/2021 – 31/12/2022

**Número de Animais:** 168 animais

**Espécie:** Camundongo

**Linhagem:** C57BL/6J

**Peso:** 30gr

**Total de Animais:** 168 Camundongos Machos

**Espécie:** C57BL/6J

**Procedência do Animal:** Biotério/CEMIB - UNICAMP

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião no dia 18/03/2021, o projeto de pesquisa, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Parecer: **APROVADO**

**Prof. Giovanna Barbarini Longato**  
Vice Coordenadora do Comitê de Ética com  
Uso de Animais de Experimentação



#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Papel do heme livre na fisiopatologia do priapismo: estudos funcionais, bioquímicos e moleculares." protocolo: 002.03.2021 sob responsabilidade da pesquisador Fábio Henrique da Silva, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional e Controle a Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética o Uso de Animais (CEUA da Universidade São Francisco – USF), em reunião do dia 18/03/2021.

**Prof. Giovanna Barbarini Longato**  
Vice Coordenadora do Comitê de Ética com  
Uso de Animais de Experimentação