

Mecanismo molecular de la acción relajante inducida por compuestos aromáticos aislados de la *Scaphyglottis livida* en el íleo de la rata

Molecular mechanism of the relaxation induced by aromatic compounds isolated from *Scaphyglottis livida* in rat ileum rings

YAIRA MATHISON^{1*}, SAMUEL ESTADA², ALEJANDRA ROJAS³, RACHEL MATA² y ANITA ISRAEL⁴

Resumen

La *Scaphyglottis livida* es una orquídea mexicana popularmente utilizada para el tratamiento de cólicos y para prevenir abortos, usos que sugieren la presencia de compuestos relajantes del músculo liso. El extracto crudo y los compuestos aislados de la *S. livida* inhiben la contracción espontánea del íleo de la rata e inducen la relajación de anillos de aorta previamente contraídos con noradrenalina. El sistema óxido nítrico/GMPc media la relajación vascular y participa en la relajación no adrenérgica-no colinérgica del tracto gastrointestinal. Para evaluar la posible mediación del ON/GMPc en la relajación inducida por los compuestos aislados de *S. livida*, 3,4-dihidroxi-5,5 -dimetoxibenzil (C-1) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (C-2), determinamos su efecto sobre la producción de GMPc y sobre la actividad de la sintasa del ON (SON) en anillos del íleo de la rata. Ratas Sprague-Dawley, machos, fueron sacrificadas y el íleo disecado bajo control estereomicroscópico. El GMPc formado fue determinado mediante radioinmunoensayo, y la actividad de la SON mediante la cuantificación de la conversión de L-arginina radiomarcada a citrulina. Ambos compuestos incrementan la producción de GMPc (Basal= 1.620,85 ± 86 vs C-1= 2.260 ± 88; C-2= 1.322± 66 fmol/10 min/ mg proteína). El incremento en la producción de GMPc inducida por el C-1 fue abolido por el L-NAME, un inhibidor de la SON; el ODQ, un bloqueante selectivo de la guanililciclase soluble y cuando el tejido fue incubado en un medio libre de calcio. El C-1 incrementó de manera significativa la actividad de la SON (Basal= 43,2 ± 4 vs C1= 68,3 ± 14 pmol/hr/mg proteína). Nuestros resultados demuestran la participación de la vía de señalización mediada por el ON/GMPc en la relajación inducida por estos compuestos en el íleo de la rata.

Palabras clave: Óxido nítrico, GMPc, acción espasmolítica, *Scaphyglottis livida*.

Abstract

The *Scaphyglottis livida* is a Mexican orchid that is popularly used for the treatment of stomach ache and to avoid abortion, uses that suggested the presence of smooth muscle relaxant agents. The crude extract and pure compounds isolated from *S. livida* produces a significant inhibition of the spontaneous rat ileum contraction and induce relaxation of the rat aorta rings previously contracted with noradrenaline. The nitric oxide/cGMP system mediates vascular smooth muscle relaxation and has been postulate a most likely candidate for mediating the nonadrenergic-noncholinergic smooth muscle relaxation through the gastrointestinal tract. To evaluated the possible role of the NO/cGMP system in the relaxation induced by those compounds, we assessed the effect of two compounds isolated from *S. livida*, 3,4-dihydroxy-5,5 -dimethoxybibenzyl (C-1) and 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene (C-2) on cGMP production in rat ileum rings. Additionally we determined the effect of C-1 on nitric oxide synthase (NOS) activity. Male Sprague-Dawley rats were killed by decapitation and the tissues dissected under a stereomicroscope. The cGMP formed was determined by radioimmunoassay. NOS activity was assayed by monitoring the conversion of radiolabeled L-arginine to citruline. Our results shown that C-1 and C-2 significantly increased cGMP production in rat ileum rings (Basal= 1.620,85 ± 86 vs C-1= 2.260 ± 88; C-2= 1.322± 66 fmol/10 min/ mg protein). C-1-induced cGMP production was abolished in presence of L-NAME, a NOS inhibitor, ODQ a selective soluble guanylyl cyclase blocker and when the tissues were incubated in calcium free medium. Additionally C-1 significantly increased NOS activity (in pmol/hr/mg protein; basal = 43.2 ± 4 and C-1 = 68.3 ± 14). Our results indicate that two of the major active principles isolated from *S. livida* provoke relaxation in ileal tissue through NO/cGMP signaling pathway.

Key words: Nitric oxide, cGMP, spasmolytic action, *Scaphyglottis livida*.

¹ Cátedra de Farmacología, Escuela de Medicina José María Vargas.

² Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Universidad Autónoma de Querétaro, México.

⁴ Unidad de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La *Scaphyglottis livida* (Linddley) Schltr., es una especie de orquídea ampliamente distribuida en los bosques tropicales de los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero en México (Ames y Correl, 1952). Los habitantes de la región de los Tuxtlas, Veracruz designan a la especie con el nombre vulgar de «parasita» y la emplean medicinalmente para el tratamiento de heridas, prevenir el aborto y como repelente de insectos. La hierba es aplicada tópicamente para eliminar ectoparásitos, y emplean el cocimiento para el tratamiento de cólicos abdominales (Hietz y Hietz-Seifert, 1994), uso popular que sugiere la presencia de un agente relajante de la musculatura lisa en esta especie.

En la búsqueda de nuevos agentes espasmolíticos provenientes de plantas medicinales de México, se demostró que tanto el extracto de *Scaphyglottis livida*, como varios compuestos aislados de la misma, producen inhibición de la contracción espontánea del íleo de la rata con una potencia comparable o mayor que la papaverina. Adicionalmente, estos compuestos inducen la relajación de la aorta previamente contraída con noradrenalina (Estrada y col., 1999; Estrada-Soto y col., 2006).

La caracterización farmacológica de los compuestos activos, utilizando preparaciones *in vitro* y estimulados por diferentes espasmógenos (acetilcolina, histamina y BaCl₂) permitió establecer que el mecanismo de acción de estos compuestos no involucra un efecto anticolinérgico o un bloqueo en la entrada de calcio al interior de la célula muscular lisa (Estrada y col., 1999; Estrada-Soto y col., 2006). Estos hallazgos sugieren la posible participación de un mecanismo no-adrenérgico no-colinérgico en la acción antiespasmódica de estos compuestos.

Ahora bien, el óxido nítrico (ON) es una molécula de señalización multifuncional, implicada en numerosos procesos fisiológicos que abarcan desde la activación de mecanismos de defensa mediados por el sistema inmune hasta la regulación del tono vascular y mediación de la comunicación neuronal (Moncada, 1992; Hanafy y col., 2001). La mayoría de sus efectos fisiológicos están mediados por la activación de la enzima guanililciclase y la producción de GMPc (Moncada, 1992; Hanafy y col., 2001; Moncada y Higgs, 1995). Se sabe que el ON generado en las neuronas del plexo mientérico del intestino constituye uno de los neurotransmisores más importantes que participan en el proceso de relajación no adrenérgica no colinérgica (NANC) del músculo liso del tracto gastrointestinal (Moncada, 1992; Kanada y col., 1992; Okishio y col., 2000). Sin embargo, su participación

en el mecanismo espasmolítico de los compuestos aislados de la *Scaphyglottis livida* no ha sido evaluada hasta ahora.

En el presente trabajo quisimos determinar si la actividad espasmolítica de los compuestos 3,4-dihidroxi-5,5-dimetoxibenzil (C-1) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (C-2) extraídos de la *Scaphyglottis livida* se encuentran mediados por el ON/GMPc, mediante el uso de anillos enteros provenientes del íleo de la rata.

Materiales y métodos

ANIMALES

Los animales de experimentación fueron ratas albinas, macho, de la cepa Sprague-Dawley, de 6 a 7 semanas de edad, con peso comprendido entre 220-250 g, provenientes del bioterio de la Facultad de Farmacia UCV, Caracas, las cuales fueron mantenidas con períodos alternos de luz y oscuridad, permitiéndoles libre acceso al agua y a la comida.

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide for the care and use of Laboratory Animals).

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación entre las 9:00 y 10:00 h. Los anillos de íleo fueron disecados de inmediato bajo control estereomicroscópico y mantenidos en buffer Krebs-Ringer (KBR) frío, con la siguiente composición (en mM): NaCl 125; KCl 3,5; KH₂PO₄ 1,25; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 0,75; NaHCO₃ 25; glucosa 10 y teofilina 1,6; gaseada con 95% O₂ y 5% de CO₂. La formación de GMPc fue determinada mediante la cuantificación del GMPc acumulado en el tejido intacto, en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa (Mathison e Israel, 1998). Los anillos de íleo fueron transferidos individualmente a tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 200 µl de KBR y fueron preincubados por 30 min a 37 °C en presencia o ausencia de los antagonistas correspondientes (L-NAME, 0,1 µM o 1H-(1,2,4) oxadiazol (4,3-a) quinoxalin-1-ona (ODQ) 1 µM. En experimentos previos se estableció que la formación de GMPc fue lineal en el tiempo al menos hasta 15 min. Los compuestos fueron disueltos en DMSO preparando soluciones de 100 µg/ml. Los compuestos o el DMSO (para las muestras controles) fueron añadidos en un volumen de 20 µl al medio de incubación, y los tejidos nuevamente incubados a 37 °C por 10 min. La reacción fue detenida añadiendo 20 µl de EDTA (166 mM, pH 7,5); las muestras fueron calentadas en baño María a 90 °C durante 3 min y luego mantenidas en hielo. El tejido fue sonificado, y se utilizó una alícuota de 100 µl para determinar el GMPc formado

mediante radioinmunoensayo utilizando un kit obtenido de Amersham Corp, MA (Steiner, Parker y Kipnis, 1972). La actividad de la guanilciclasa soluble se expresa como fmol de GMPc formado/10 min/mg de proteínas. El contenido tisular de proteínas se determinó utilizando albúmina sérica de bovino como patrón (Lowry y col., 1951).

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO

La actividad de la SON fue determinada mediante la cuantificación de la conversión de (^3H)-L-arginina a (^3H)-L-citrulina (Bredt y Snyder, 1990; Mathison e Israel, 2002). Los anillos de íleo de la rata fueron mantenidos en buffer Hepes 50mM, pH 7,1 + EDTA 1mM. Posteriormente cada muestra fue preincubada por 30 min a 37°C en buffer Hepes 50mM, pH 7,1 conteniendo ditiotretitol 1mM, β -NADPH 0,5 mM; CaCl_2 1,25 mM y 10 mg/ml de calmodulina, (^3H)-L-arginina 0,12mM y arginina 0,3 mM, seguido de un período de incubación de 10 min. Para determinar el efecto de C-1 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre la actividad de la SON, el mismo fue agregado al inicio de los 10 min de incubación. La reacción fue detenida agregando buffer Hepes 20 mM, pH 5,5; EDTA 4mM, frío, seguido de calentamiento de las muestras durante 5 min a 90°C. Los tejidos fueron sonicados, centrifugados a 12.000 rpm durante 4 min y el sobrenadante adsorbido a una columna que contenía Dowex 50, forma Na^+ (BioRad), desde donde fue eluido con 2 ml de agua. La (^3H)-L-citrulina formada fue cuantificada mediante espectroscopia de centelleo líquido.

La identificación de la (^3H)-L-citrulina se confirmó mediante cromatografía en papel. El porcentaje de recuperación fue determinado utilizando una concentración conocida de ^3H -citrulina. La actividad de la sintasa del óxido nítrico se expresó como picomoles de (^3H)-L-citrulina formados/hora/mg de proteínas. Las proteínas tisulares se determinaron por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. La significancia entre las medias fue evaluada mediante la prueba de *t* de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Los compuestos aislados de *S. livida*, 3,4-dihidroxi-5,5 -dimetoxibenzil (C-1) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (C-2), a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, incrementan significativamente la producción de GMPc en anillos aislados del íleo de rata, expresa-

do en fmol/10 min/ mg proteína (Figura 1). Basal= $1,114 \pm 40$ vs C-1= $1,988 \pm 88$ ($p < 0,01$), o vs C-2= 1.322 ± 66 ($p < 0,05$).

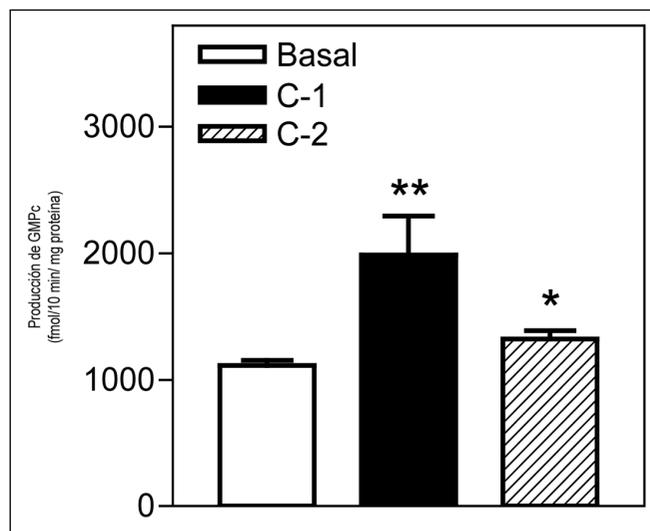


Figura 1. Efecto de los compuestos C-1 y C-2 extraídos de la *S. livida* sobre la producción de GMPc en anillos de íleo de rata. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. (N=7-9). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

El ON es el principal candidato para mediar la relajación inducida por estos compuestos en los plexos mientéricos. Así, al evaluar el efecto de C-1 sobre la actividad de la SON en los anillos de íleo de rata se demuestra un incremento significativo de la actividad de la enzima. Basal= $43,2 \pm 4$ vs C-1= $68,3 \pm 14$ ($p < 0,01$ vs basal) (figura 2).

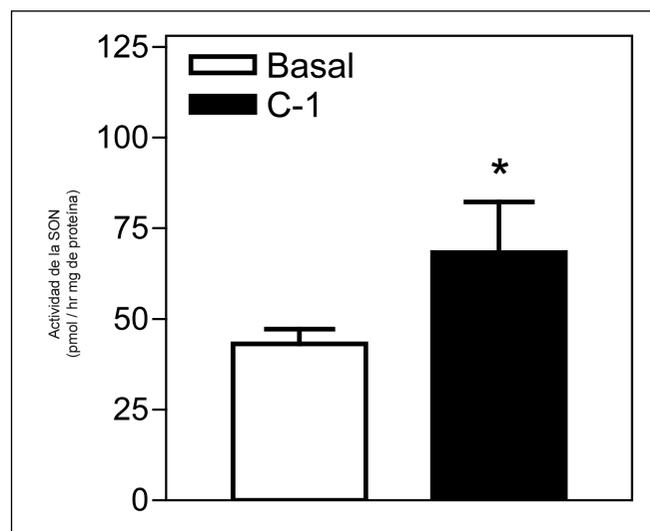


Figura 2. Efecto del compuesto C-1 sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico en anillos de íleo de la rata. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. (N= 5-7), * $p < 0,01$ vs basal.

Con el fin de evaluar la posible participación del incremento de la síntesis de ON en la producción de GMPc inducida por el compuesto C-1, empleamos el análogo de la L-arginina, L-NAME; un conocido inhibidor de la SON. Como se observa en la figura 3, la adición de L-NAME (10^{-5} M) a la mezcla de incubación, disminuye significativamente el incremento en la producción de GMPc inducida por el compuesto C-1, siendo este incremento de un 40% en condiciones basales y se reduce a un 18% en presencia de L-NAME.

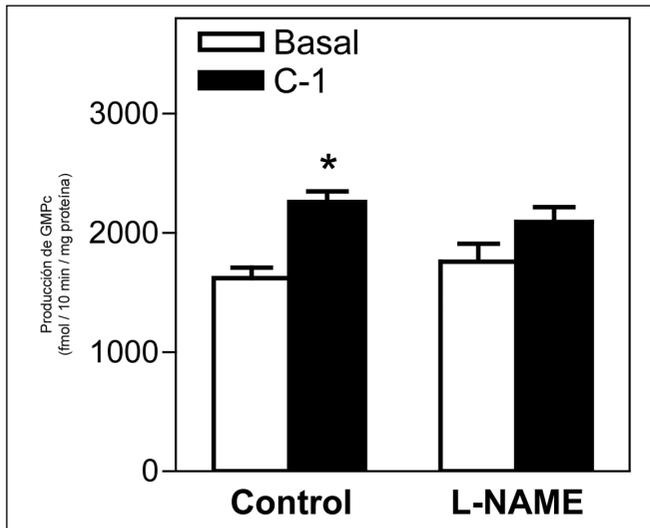


Figura 3. Efecto del L-NAME sobre la producción de GMPc inducida por el compuesto 1 (C-1) en anillos de íleo de la rata. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. (N=16-26), * $p<0,01$ vs basal.

El calcio es fundamental para la activación de la SON constitutiva. Por ello se evaluó el efecto de la ausencia del calcio sobre la producción de GMPc inducida por el compuesto C-1 en los anillos del íleo de la rata. Como se muestra en la figura 4, la ausencia de calcio en el medio de incubación abolió completamente el incremento de la producción de GMPc inducida por el compuesto C-1 ($-Ca^{+2}$ = $1900,61 \pm 188$ vs $-Ca^{+2} + C-1$ = $1430,49 \pm 158$).

Se evaluó la posible participación de la guanililciclasa soluble. Para ello utilizamos el bloqueante selectivo de la enzima GCs, el ODQ (10^{-5} M). Como se muestra en la figura 5, la presencia de ODQ en el medio de incubación inhibió completamente el incremento de la producción de GMPc inducida por el compuesto C-1. ODQ = $1.770,25 \pm 209$ vs ODQ + C-1 = $1480,4 \pm 158$.

Discusión

Desde que se demostró la presencia de la sintasa del óxido nítrico en los plexos mientéricos, el ON se

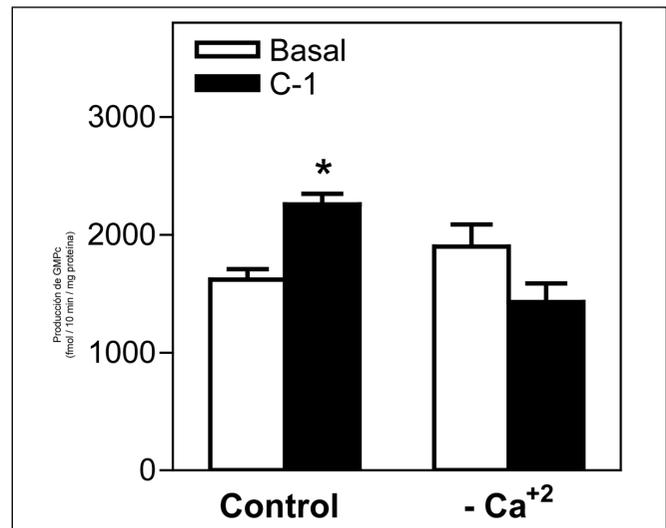


Figura 4. Efecto de la ausencia de calcio en el medio de incubación sobre la producción de GMPc inducida por el compuesto 1 (C-1) en anillos de íleo de la rata. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. (N= 11-26), * $p<0,01$ vs basal.

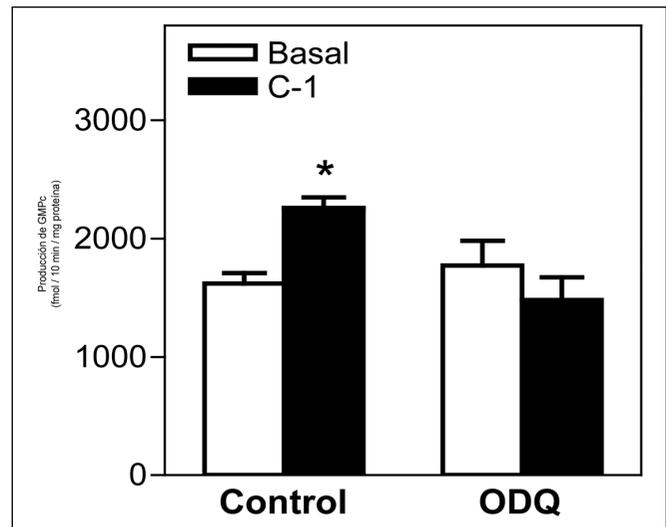


Figura 5. Efecto del ODQ sobre la producción de GMPc inducida por el compuesto 1 (C-1) en anillos de íleo de la rata. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. (N= 11-26); * $p<0,01$ vs basal.

convirtió en el principal candidato a ser el mediador de la relajación no adrenérgica-no colinérgica (NANC) del músculo liso del tracto gastrointestinal (Kanada y col., 1992; Okishio y col., 2000; Bredt y Snyder, 1990). En efecto, diversos autores han demostrado la participación del ON en la relajación de músculo liso. Así, Kanada y col. (1992) demostraron que la respuesta inhibitoria NANC en músculos circulares y longitudinales del íleo de la rata, es inhibida por la nitró-arginina, un inhibidor de la SON, y este efecto era contrarrestado por la administración de L-arginina, precursor de la síntesis del ON (Kanada y col., 1992). Mientras que Williams y Parson (1995) demostraron en músculos longitudinales del íleo de cobayo, con el plexo mientérico intacto, que la relajación en res-

puesta a la estimulación eléctrica era bloqueada por N^G-nitro-L-arginina, inhibidor de la SON, efecto que fue revertido por la L-arginina. Aún más, el efecto relajante en esta preparación fue potenciado en presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa (Williams y Parson, 1995), reforzando la evidencia de participación del ON en esta respuesta.

Existe evidencia que indica que algunos compuestos aromáticos aislados de la *S. livida*, como los C-1 - C-2 producen la inhibición de la contracción espontánea del íleo de la rata *in vitro* y que este efecto es bloqueado por el L-NAME (Estrada y col., 1999), lo cual sugiere la participación de la vía de señalización de ON/GMPc. Nuestros resultados apuntan a esta posibilidad ya que demuestran que el 3,4-dihidroxi-5,5 -dimetoxibenzil (C-1), aislado de la *S. livida* incrementa la actividad de la SON en anillos de íleo de rata, lo que indica que el ON actúa como posible mediador de los efectos relajantes de este compuesto.

La mayoría de los efectos fisiológicos del ON, como relajación del músculo liso vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria y sus efectos sobre la neurotransmisión, requieren concentraciones en el orden nanomolar de este neurotransmisor, y dependen de su acción sobre la guanililciclase soluble con el consecuente incremento en la producción de GMPc (Moncada, 1992; Bian y col., 2008). De tal forma que el ON generado en las neuronas del plexo mientérico del intestino, difunde hacia las células blanco donde se une a la guanililciclase, la cual sintetiza el GMPc. Este aumento de los niveles de GMPc trae como consecuencia la relajación del músculo liso intestinal a través de una proteína quinasa dependiente de GMPc, la cual al fosforilar a la cadena ligera de la miosina, la inactiva inhibiendo la fosforilación de la miosina que es indispensable para activar a la ATPasa del complejo miosina-actina en el proceso de contracción muscular (Kanada y col., 1992). El ON además de participar en la relajación del músculo liso vascular y el incremento de GMPc que precede la relajación NANC de la musculatura lisa también participa en la relajación del sistema genito-urinario, del tracto gastrointestinal y el músculo liso bronquial (Rand, 1992; Moro y col., 1996).

Desde que los compuestos aislados de *S. livida*, 3,4-dihidroxi-5,5 -dimetoxibenzil (C-1) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (C-2) incrementa el GMPc en anillos de íleo de la rata, se sustenta el papel del óxido nítrico y la activación de la guanililciclase en el efecto relajante del músculo liso de estos compuestos. Aún más, la evidencia de la participación del sistema ON/GMPc en el efecto relajante del C-1 se refuerza por el hecho que al inhibir la actividad de la enzima SON con L-NAME, se bloquea total-

mente el incremento de GMPc producido por el compuesto. El GMPc producido por el compuesto C-1 parece ser la consecuencia de la estimulación de guanililciclase soluble, ya que el ODQ, un potente inhibidor específico de la GCs, bloquea completamente la producción de GMPc en el anillo aislado del íleo de la rata.

En conclusión, la vía de señalización ON/GMPc media el efecto espasmolítico del 3,4-dihidroxi-5,5'-dimetoxibenzil, aislado de la *S. livida*. Estos resultados constituyen las bases científicas y soporte farmacológico del uso tradicional de esta especie de orquídea como agente antiespasmódico en la región de los Tuxtlas, Veracruz, México.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por el proyecto IN205197 de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM.

Referencias bibliográficas

- Bian K, Doursout MF, Murad F. 2008. Vascular system: Role of nitric oxide in cardiovascular disease. *J Clin Hypertension* (Greenwich) 10(4):301-310.
- Bredt DS, Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-685.
- Estrada S, Rojas A, Mathison Y, Israel A, Mata R. 1999. Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Médica*, 65: 1-6.
- Estrada-Soto S, Llópez-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R, Mata R. 2006. Endothelium-independent relaxation of aorta rings by two stilbenoids from the orchids *Scaphyglottis livida*. *Fitoterapia* 77(3): 236-239.
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* 7(4):801-819
- Hietz P, Hietz-Seifert U. 1994. in: Epiphytes of Veracruz. An illustrated guide for the regions of Xapala and los Tuxtlas, Veracruz, p. 57, Instituto de Ecología A.C Xapala, Veracruz, México.
- Instituto de Biología. «Scaphyglottis livida (Lindl.) IBUNAM:MEXU:PV620465» UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2006-03-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en 2010-1-24. Disponible en <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV620465>.
- Kanada A, Hata F, Suthamnatpong N, Maehara T, Ishii T, Takeuchi T, Yagasaki O. 1992. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. *Eur J Pharmacol.* 216(2):287-292.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75.

- Mathison Y, Israel A. 1998. Endothelin ET_B receptor mediates nitric oxide/cGMP formation in rat adrenal medulla. *Brain Res. Bull.*, 45(1): 15-19.
- Mathison Y, Israel A. 2002. Role of endothelin type B receptor in nitric oxide/cGMP signaling pathway in rat median eminence. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 22(5-6): 783-795.
- Moncada S, Higgs EA. 1995. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*. 9(13):1319-1330.
- Moncada S. 1992. The L-arginine:nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145:201-27.
- Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. 1996. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(4):1480-1485.
- NIH Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Guide (1996) 25(28): 1-111.
- Okishio Y, Niioka S, Yamaji M, Yamazaki Y, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. 2000. Mediators of nonadrenergic, noncholinergic relaxation in Sprague Dawley rat. *J Vet Med Sci*. 62(8):821-828.
- Rand MJ. 1992. Activation of noradrenergic and nitrenergic mechanisms in the rat anococcygeus muscle by nicotine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19(3):147-169.
- Steiner A, Parker C, Kipnis DM. 1972. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247: 1106-1113.
- Williams SJ, Parson ME. 1995. Nitric oxide, an enteric nonadrenergic-noncholinergic relaxant transmitter: evidence using phosphodiesterase V and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 116(2): 1789-1796.