

ANDREY CHRISTIAN DA COSTA GONÇALVES

PAPEL DO EIXO ANGIOTENSINA-(1-7)-MAS NA FUNÇÃO ERÉTIL

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia - da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Robson A. S. Santos

Belo Horizonte –MG
Junho de 2006

ANDREY CHRISTIAN DA COSTA GONÇALVES

PAPÉL DO EIXO ANGIOTENSINA-(1-7)-MAS NA FUNÇÃO ERÉTIL

Belo Horizonte - MG
Junho de 2006

*À DEUS,
Aos meus pais, Jassy e Odete,
Às Minhas irmãs Andreza,
Andiara e Andrielle,
Ao meu irmão André,
À Mariana.*

AGRADECIMENTOS

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os Seus juízos, e quão inescrutáveis os Seus caminhos! Porque quem compreendeu o intento do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a Ele, para que lhe seja recompensado? Porque d’Ele e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória pois a Ele eternamente. Amém (Rom 11: 33-36).” Obrigado Deus pela oportunidade de realizar este feito, pela saúde e pela força que vem do Senhor. Obrigado pela sabedoria que o Senhor em concedeu.

Aos meus pais que mais uma vez souberam fazer com que a distância existente entre nós se tornasse em um pequeno obstáculo e não impedisse toda manifestação de amor e companheirismo. Agradeço ao meu pai, Jassy, e à minha mãe, Odete, pela compreensão com relação às minhas poucas visitas, pela força e motivação que contribuíram muito para que este trabalho fosse realizado. Agradeço às minhas irmãs Andreza, Andiara e Andrielle, e ao meu irmão André. Obrigado porque vocês são minha família, e são co-responsáveis por este feito. Eu amo muito vocês.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Robson A. S. Santos. Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecê-lo por ter aceitado ser meu orientador neste trabalho. Somente nós sabemos em que circunstâncias isto aconteceu. Obrigado por ter se dedicado ao meu aprendizado, mesmo diante de todas as minhas limitações. Agradeço também por ter me ensinado a pesquisar com profissionalismo e amor à ciência. Obrigado pela amizade, pelas conversas

juntamente com o Prof. Anderson. Estes momentos foram de aprendizado e descontração.

Aos Departamentos de Fisiologia e Farmacologia, seus alunos e professores. Em especial aos professores do laboratório de Hipertensão, Prof. Marco Antônio P. Fontes, Profa. Maria José Campagnole Santos e Andréa Siqueira Haibara. Obrigado pela amizade e convivência harmoniosa.

À Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia pelo apoio para realização deste trabalho de doutorado. Agradeço especialmente à coordenadora desta pós-graduação, Profa. Adelina Marta dos Reis pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório Rodrigo (da Smirna), Serginho, Carlos, Daniel, Gonzaga, Guilherme, Marco Túlio, Marcos (Vet.), Rafael, Serjão, Rodrigo. Ao amigo José Roberto. Aos amigos do futebol de quarta-feira. Aos demais amigos da pós-graduação, em especial Gustavo e Cláudio Heitor. Às amigas do laboratório de hipertensão, que graça a Deus e ao Zezé são muitas: Fabiane, Denise, Gisele, Jean Carla, Quênia, Ana Paula, Lenice, Leonor, Betinha, Tatiane, Marina, Marcela, Sônia, Walkyria, Elizabeth. Obrigado pela amizade.

À Adelaide e Vanessa do Departamento de Fisiologia o meu agradecimento e meu reconhecimento pelo esforço diário, nas grandes e pequenas coisas. À secretária Celinha pelo trabalho responsável e incansável, tão essencial para o sucesso deste curso de Pós-graduação.

E finalmente, mas não menos importante, aos órgãos financiadores FAPEMIG, CAPES e CNPq pela concessão de bolsas e auxílios financeiros para fomento dessa pesquisa e participação em congressos.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE IMAGENS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Estrutura peniana.....	02
1.2- Neurofisiologia da função erétil.....	03
1.3- Fisiologia da função erétil.....	09
1.4- Definição e epidemiologia da disfunção erétil	16
1.5- Farmacologia da disfunção erétil.....	19
1.6- Sistema renina-angiotensina e disfunção erétil	21
2- OBJETIVOS.....	27
2.1- Objetivos gerais.....	28
2.2- Objetivos específicos.....	28
3- MÉTODOS.....	29
3.1- Animais e tecido humano	30
3.2- Procedimentos de imunofluorescência	31
3.2.1- Drogas e reagentes	31
3.2.2- Preparação de tecido humano	31
3.3- Medidas da pressão intracavernosa.....	33

3.4- Animais Doca-sal.....	37
3.5- Medida da liberação de NO.....	38
3.6- Histologia	41
3.7- Análise estatística.....	41
4- RESULTADOS.....	42
4.1- Imunolocalização do receptor Mas em corpo cavernoso humano e de rato	43
4.2- Avaliação do efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) e AVE 0991 em animais anestesiados	48
4.2.1- Efeito da estimulação elétrica do GPM na CCP/MAP.....	48
4.2.2 – Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida por estimulação ganglionar.....	51
4.2.3 – Papel do receptor Mas no efeito pró-erétil induzido pela Ang-(1-7)	53
4.2.4 – Efeito da Ang-(1-7) endógena na função erétil	54
4.2.5 – Papel do NO no efeito potencializador da ereção peniana induzido pela Ang-(1-7).....	56
4.2.6 – O composto AVE 0991 imita os efeitos da Ang-(1-7), potencializando o aumento da pressão intracavernosa induzido por estimulação ganglionar	58
4.3 - Estudo da liberação de NO induzido pela Ang-(1-7) em tecido cavernosal de humano, rato e camundongo Mas ^{+/+} e Mas ^{-/-}	62
4.4 – Efeito da deleção do <i>Mas</i> na função erétil de camundongos anestesiados	66
4.5 – Efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) em animais hipertensos DOCCA-sal	69
5- DISCUSSÃO.....	71
6- SUMÁRIO e CONCLUSÃO	90

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
Anexo I	113
Anexo II	114
Manuscrito	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC: monofosfato de adenosina cíclica;

ACh: acetilcolina;

Akt: serina/treonina proteína quinase;

A-779: antagonista específico para angiotensina-(1-7);

AM A: aminopeptidase A;

AM B: aminopeptidase B;

AM M: aminopeptidase M;

AM N: aminopeptidase N;

Ang II: angiotensina II;

Ang III: angiotensina-(2-8);

Ang IV: angiotensina-(3-8);

Ang-(1-7): angiotensina-(1-7);

Ang-(1-9): angiotensina-(1-9);

AT1: receptor de angiotensina;

AT2: receptor de angiotensina 2;

ATP: trifosfato de adenosina;

BSA: soro de albumina bovina;

CCP: pressão intracavernosa;

DAG: diacilglicerol;

DAF: diacetato 4-amino-5 metilamino-2'7'-difluoresceína;

DE: disfunção erétil;

DOCA: acetato de deoxicorticosterona;

ECA: enzima conversora de angiotensina;
ECA 2: Enzima conversora de angiotensina 2;
ET₁: endotelina 1;
ET_A: receptor A para endotelina 1;
ET_B: receptor B para endotelina 1;
GDP: guanosina bi-fosfato;
GABA: ácido γ -aminobutírico;
GC: guanilato ciclase;
GMPc: monofosfato de guanosina cíclica;
GPM: gânglio pélvico maior;
GTP: trifosfato de guanosina;
HO: hemeoxigenase;
5-HT: 5 hidróxi-triptamina;
iECA: inibidores de enzima conversora de angiotensina;
IP₃: trifosfato de inositol;
KCl: cloreto de sódio;
KH₂PO₄: fosfato de sódio dihidratado;
L-NAME: N^G-nitro-L-arginine metiléster;
MAP: pressão arterial média;
Mas: receptor para a Angiotensina-(1-7);
Mas-KO: camundongos knock out para receptor Mas;
MLC₂₀: subunidade 20 da cadeia leve de miosina;
MLCK: quinase da cadeia leve da miosina;

MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina;

NA: noradrenalina;

NaCl: cloreto de sódio;

Na₂HPO₄: fosfato de sódio monohidratado;

NANC: não adrenérgico-não colinérgico;

NO: óxido nítrico;

NOS: sintase de óxido nítrico;

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial;

nNOS: sintase de óxido nítrico neuronal;

PBS: tampão salina-fosfato;

PDE: fosfodiesterase;

PE: polietileno;

PGE: prostaglandina E;

PGF_{2α}: prostaglandina F 2α;

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase;

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato;

PKC: proteína quinase C;

PKG: proteína quinase G;

RAS: Sistema renina-angiotensina;

SHR: ratos espontaneamente hipertensos;

VIP: polipeptídeo intestinal vasoativo;

WT: camundongos tipo selvagem ou wild type.

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 – Representação esquemática da estrutura peniana.

Fig. 2 - Representação esquemática do Gânglio Pélvico Maior (GPM) no rato.

Fig. 3 – Diagrama representando as vias centrais e periféricas que regulam a ereção peniana.

Fig. 4 – Representação esquemática da via contrátil estimulada por agonistas α_1 -adrenérgicos.

Fig. 5 – Esquema representativo da interação entre os filamentos de actina e miosina no processo de contração da musculatura lisa.

Fig. 6 – Via Rho A/Rho quinase de contração do músculo liso vascular.

Fig. 7 – Mecanismo de ação da proteína quinase G (PKG) no processo de relaxamento da musculatura vascular lisa.

Fig. 8 – Representação esquemática do RAS baseado em últimas informações.

Fig. 9 – Representação esquemática dos passos cirúrgicos.

Fig. 10 - Representação esquemática do protocolo experimental 1.

Fig. 11 - Representação esquemática do protocolo experimental 2.

Fig. 12 – Protocolo experimental para avaliação do efeito da Ang-(1-7) e do composto AVE 0991 sobre a função erétil.

Fig. 13 - Esquema simplificado do mecanismo facilitador da ereção peniana induzido pela Ang-(1-7) em animais hipertensos DOCA-sal.

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Imunolocalização do receptor Mas nas estruturas penianas de humano.

Imagem 2 - Imunolocalização do receptor Mas em corpo cavernoso de ratos.

Imagem 3 - Imunolocalização do receptor Mas em arteríola de rato.

Imagem 4 - Liberação de NO em corpo cavernoso de humanos induzida pela Ang-(1-7).

Imagem 5 - Liberação de NO em corpo cavernoso de rato induzida pela Ang-(1-7).

Imagem 6 - Liberação de NO em corpo cavernoso de camundongos induzida pela Ang-(1-7).

Imagem 7 - Aumento no conteúdo de tecido fibroso produzido pela deleção do *Mas*.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da estimulação elétrica do GPM na CCP/MAP.

Gráfico 2 - Efeito da estimulação elétrica do GPM, com frequência crescente.

Gráfico 3 - Efeito da Ang-(1-7) na resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos.

Gráfico 4 - Efeito do A-779 sobre a ação potencializadora da função erétil induzido pela Ang-(1-7).

Gráfico 5 - Efeito do A-779 na resposta erétil induzida por estimulação elétrica sub-máxima do GPM.

Gráfico 6 - Efeito do NO na resposta potencializadora da função erétil induzida pela Ang-(1-7).

Gráfico 7 - Efeito dose-dependente do AVE 0991 na resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos.

Gráfico 8 - Efeito do A-779 sobre a ação potencializadora da função erétil induzido pelo AVE 0991.

Gráfico 9 - Efeito do NO na resposta potencializadora da função erétil induzida pelo AVE 0991.

Gráfico 10 - Efeito da deleção do *Mas* na função erétil de camundongos.

Gráfico 11 - Efeito da estimulação elétrica do GPM após a administração intracavernosa de Ang-(1-7) em animais Sham-operados e DOCA-sal.

RESUMO

Foi descrito que a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], um peptídeo cujos principais efeitos são vasodilatação e atividade antiproliferativas, é liberada dentro dos sinusóides que delineiam as trabéculas de células musculares lisas do corpo cavernoso. Entretanto, o papel deste peptídeo na função erétil ainda não foi determinado. Neste estudo nós demonstramos que a Ang-(1-7) potencializa a resposta erétil evocada pela estimulação elétrica do gânglio pélvico maior, e que esta resposta foi bloqueada pelo A-779, um antagonista para o receptor Mas. Foi documentada a imunolocalização do receptor Mas para a Ang-(1-7) em corpo cavernoso de humano e rato. Além disso, nós observamos que a Ang-(1-7) induz liberação de óxido nítrico em corpo cavernoso de humano, rato e camundongo, um efeito que é ausente em camundongos com deleção para o gen que codifica o Mas. Interessantemente, a deleção genética do Mas resulta em função erétil comprometida como demonstrado pela fibrose peniana e uma resposta à estimulação elétrica ganglionar severamente comprometida. Além do mais, a disfunção erétil severa observada em animais hipertensos DOCA-sal foi completamente revertida pela administração intracavernosa de Ang-(1-7). Sendo assim, estes dados fornecem fortes evidências de que o eixo Ang-(1-7)/Mas apresenta um papel chave na função erétil, bem como um potencial terapêutico para o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas para o tratamento da disfunção erétil.

Abstract

The vasodilator/antiproliferative peptide angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] is released into the corpus cavernosum sinuses, but its role on erectile function has not yet been defined. In this study we are reporting that Ang-(1-7) increases the erectile response induced by electrical stimulation of the major pelvic ganglion, and that this response is blockade by the Mas receptor antagonist, A-779. We documented the immunolocalization of the Ang-(1-7) receptor Mas, in human and rat corpus cavernosum. In addition, we observed that Ang-(1-7) induces nitric oxide release in human, rat and mouse corpus cavernosum, an effect that is absent in Mas-KO mice. More important, genetic deletion of Mas results in compromised erectile function as demonstrated by penile fibrosis and severely depressed response to electrical stimulation of the major pelvic ganglion. Furthermore, the attenuated erectile function of DOCA-salt hypertensive rats was fully restored by Ang-(1-7) administration. Altogether, these data provide strong evidence for a key role of the Ang-(1-7)-Mas axis in erectile function.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Estrutura peniana

O pênis é constituído por um par de tecidos erétil, os *corpos cavernosos*, e um *corpo esponjoso*, o qual delinea e suporta a *uretra* ventralmente. Tais estruturas são inseridas ou não, sendo denominadas “crura” peniana e porção peniana pendular. Os primeiros são inseridos firmemente ao osso isquial imediatamente anterior à tuberosidade isquial, o que confere a eles mínima complacência, ao contrário da porção pendular peniana que aumenta tanto em extensão quanto em espessura durante a ereção. Ambos são envolvidos por uma membrana fibrosa espessa, a *túnica albugínea*, composta predominantemente por fibras colágenas espessas as quais são onduladas no estado flácido e estiram-se durante a distensão dos corpos cavernosos. Os dois corpos cavernosos permanecem unidos por um septo na porção peniana livre, e terminam internamente à *glande*, numa região em que esta estrutura apresenta um aspecto esponjoso. Outro componente peniano importante é o *ligamento suspensório* do pênis, que emerge da linha Alba/sínfise púbica para inserir-se internamente a fáscia que recobre os corpos cavernosos.

Os corpos cavernosos são constituídos por trabéculas que consistem de células musculares lisas, fibras elásticas e colágenas, e um tecido areolar frouxo constituído de numerosas arteríolas e nervos. Tais trabéculas apresentam uma disposição tortuosa formando entre elas espaços vasculares delineados por células endoteliais, cujo aspecto se assemelha a cavernas (10).

O aporte sanguíneo arterial que supre as estruturas penianas deriva principalmente da artéria pudendal interna, a qual divide-se em três ramos terminais quando próxima do bulbo uretral: artéria bulbouretral, artéria dorsal e artéria cavernosa. Destaca-se a artéria cavernosa, cuja importância ultrapassa a função nutridora. Esta artéria atravessa o corpo cavernoso ao longo de sua superfície dorsomedial, penetrando o hílio peniano adjacente à junção dos corpos cavernosos, e continua distalmente no centro do corpo cavernoso quase até seu ápice. Ao longo de seu curso intracavernoso, ela divide-se em múltiplos ramos terminais tortuosos conhecidos como artérias helicinas que drenam dentro dos sinusóides.

A drenagem peniana é feita por três tipos de veias: superficial, intermediária e profunda. O *sistema de drenagem superficial* é constituído de múltiplas veias localizadas na superfície dorsolateral do pênis, drenando prepúcio, pele e fáscia que o recobrem, para a veia safena ou para a artéria pudendal externa. O *sistema de drenagem intermediário* inclui a *veia dorsal profunda* e as *veias circunflexas*. A veia dorsal profunda é formada por pequenas veias que emergem da glândula peniana, drenando para o plexo venoso periprostático. As veias circunflexas são canais venosos estreitos que emergem da porção interna do corpo esponjoso e cursam superficialmente a túnica albugínea ao longo da superfície lateral do pênis. O *sistema de drenagem profundo* é constituído pela *veia cavernosa* e *crural*, que drenam para a veia pudendal interna e veia ilíaca interna, respectivamente.

1.2 - Neurofisiologia da função erétil

A ereção peniana é o resultado final do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano. A resposta erétil do pênis é associada ao músculo liso vascular na túnica média das artérias e arteríolas que carregam sangue dentro do corpo cavernoso, e também às células do músculo liso vascular que delineiam os sinusóides cavernosais (Fig.1). O relaxamento destas células no início da resposta erétil permite aos sinusóides expandir e acomodar o aumento do influxo sangüíneo. Ao expandirem-se contra a túnica albugínea, os sinusóides comprimem as veias responsáveis pelo efluxo sangüíneo. A limitação do efluxo pressão-dependente constitui o processo veno-oclusivo. A resultante do aumento do influxo devido à dilatação arteriolar e à redução do efluxo resultante da veno-oclusão é a base da ereção peniana (71).

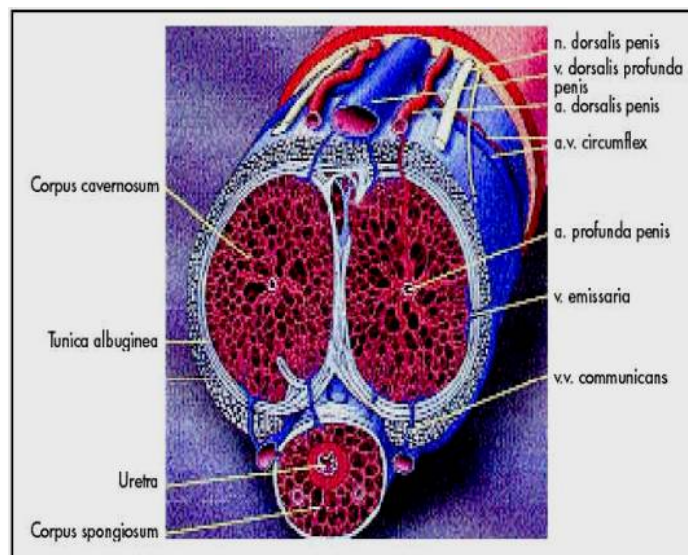


Fig.1 – Representação esquemática da estrutura peniana.

Neurofisiologicamente, a ereção peniana é basicamente mediada por um reflexo espinhal que envolve processamento e integração de estímulos tácteis, olfatórios, auditivos e mentais, ao sistema nervoso central (3). Esta mudança no estado contrátil das células do músculo liso cavernosal, que estão localizadas nas arteríolas cavernosais (15), envolve muitos transmissores do sistema nervoso central e sistemas de transmissão, e, periféricamente, vias autonômicas e eferentes somáticas. Ainda não são totalmente compreendidas as etapas de neurotransmissão, propagação de impulsos, e transdução intracelular de sinais neurais no músculo liso peniano (3).

Vários sítios cerebrais são candidatos a serem os controladores supraespinhais da ereção peniana. A formação reticular medular, que inclui o núcleo paragigantocelular, representa o sítio predominante para onde convergem as saídas neurais. Este centro processador autonômico retransmite informações ascendentes para a região rostral do cérebro, importante para a sensação somatovisceral, e descendentes para a coluna espinhal responsável pela modulação dos reflexos segmentais. No diencéfalo, a área hipotalâmica medial – que consiste do núcleo paraventricular, da região tuberal, da área preóptica medial e da área hipotalâmica dorsal – também parece contribuir para o controle supraespinhal. Esta área exibe conexões para coluna espinhal que medeia a ereção peniana reflexa, bem como para vários outros sítios cerebrais que parecem ter um importante papel na integração das informações neurais ascendentes e descendentes. As áreas talâmicas e corticais são implicadas na libido sexual e orgasmo. A área cortical e subcortical modulam estímulos primários, tais como:

estímulo visual, olfatório, auditivo e imaginativo, responsáveis pelo interesse sexual. Estas áreas se relacionam com o sistema límbico e delas partem projeções nervosas que se distribuem pelo hipotálamo.

Os mecanismos neurais responsáveis pela ereção peniana envolvem aferências e eferências periféricas (Fig.3). A via eferente deriva de divisões do sistema nervoso autonômico, simpático toracolombar (T_{10} - L_2) e parassimpático sacral (S_2 - S_4), e do sistema nervoso somático sacral (S_2 - S_4). A saída autonômica é primeiro representada pelo nervo pudendal emergindo do plexo sacral. A via aferente envolve inervação sacral, sendo representada pelo nervo dorsal do pênis - ramo sensorial do nervo pudendal. De acordo com Galindo e cols. (1997), o nervo pudendal é a maior, se não a exclusiva, via pela qual as fibras adrenérgicas alcançam o tecido erétil peniano do rato (35).

A ereção “reflexogênica” é resultado de um reflexo parassimpático espinal organizado dentro coluna espinal sacral. Esta via envolve uma calda aferente promovida pelo nervo dorsal do pênis, e uma calda eferente representada pelos axônios pré-ganglionares (nervo pélvico) e pós-ganglionares (nervo cavernoso) em direção ao pênis. A porção sacral da coluna espinal transmite o estímulo periférico para o cérebro que modula a ereção reflexa. Este estímulo proveniente da aferência parassimpática também influencia a musculatura estriada em torno do pênis (músculo isquiocavernoso e bulbocavernoso).

A ereção “psicogênica” envolve vias espinais descendentes e é desencadeada por descargas tanto simpáticas quanto parassimpáticas, de maneira que a primeira modula a segunda. A via eferente simpática antierétil

surge a partir de uma cadeia ganglionar simpática paravertebral e se projeta em direção ao pênis primariamente através do nervo hipogástrico e nervo pudendal, como pode ser observado nas figuras 2 e 3.

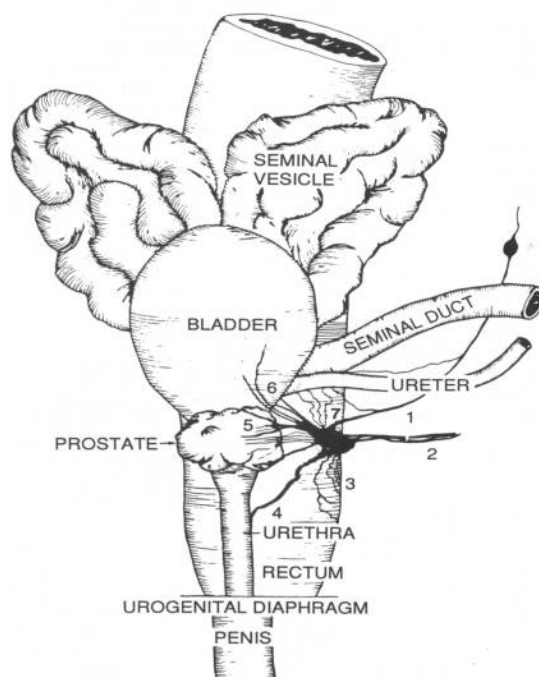


Fig. 2 - Representação esquemática do Gânglio Pélvico Maior (GPM) no rato. 1, nervo hipogástrico; 2, nervo pélvico; 3, ramos para o reto; 4, tronco maior que inerva a uretra e o pênis; 5-7, ramos para a próstata, bexiga e erétero, respectivamente.

A regulação da função erétil pelo sistema nervoso central envolve vias espinal e supraespinal. Estudos morfológicos e farmacológicos em modelos animais experimentais são os responsáveis por grande parte do conhecimento adquirido nesta área (3). Destas vias, foram identificados neurônios que liberam mediadores inibitórios que afetam a atividade sexual. Dentre os inibitórios podemos citar a serotonina (5-HT) (83), o ácido γ -aminobutírico (GABA) (92), os peptídeos opióides (70).

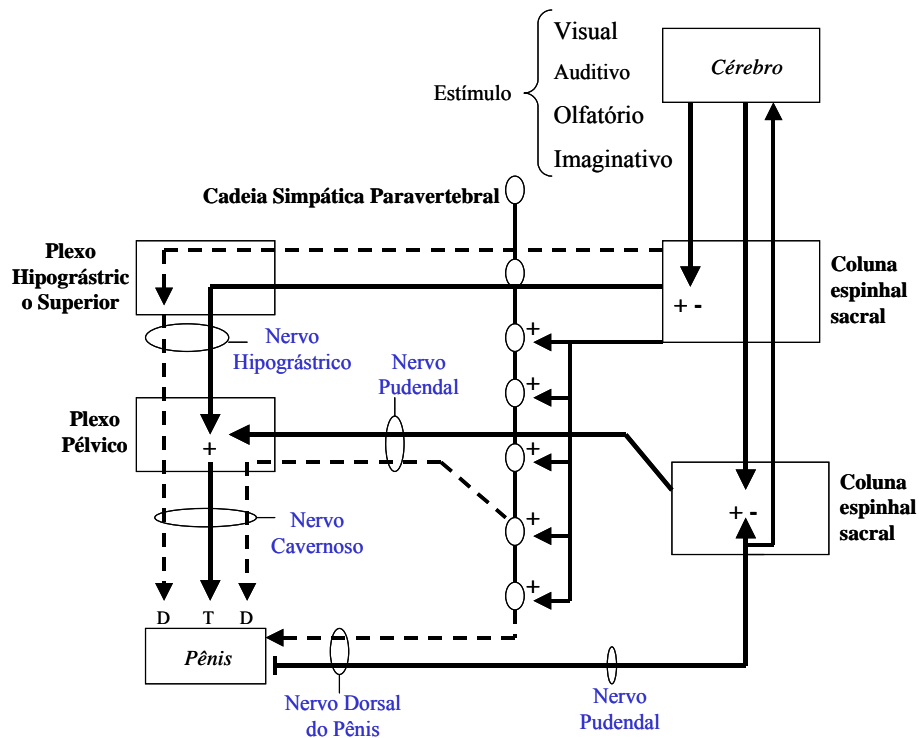


Fig. 3 – Diagrama representando as vias centrais e periféricas que regulam a ereção peniana. T, tumescência peniana; D, detumescência peniana. Mecanismos sinápticos excitatórios e inibitórios são indicados por + e -, respectivamente.

Quanto aos neurotransmissores excitatórios da atividade sexual podemos citar a dopamina (104), os aminoácidos excitatórios (109), a oxitocina (118), a adrenocorticotropina e peptídeos relacionados (117), a acetilcolina (ACh) (66), o óxido nítrico (NO) (100). Com relação à noradrenalina, alguns dados sugerem que o aumento da atividade noradrenérgica estimula, enquanto que uma redução nesta atividade inibe, a função sexual (9). Entretanto, quando a clonidina, um agonista de receptor adrenérgico α_2 (α_2 -RA), foi injetada diretamente na área préóptica medial (APOM), o comportamento sexual foi suprimido, e esta supressão foi inibida pelo pré-tratamento com antagonistas seletivos de α_2 -RA (20).

1.3 - Fisiologia da função erétil

Diferentes estruturas do pênis recebem inervação simpática, somática e sensorial (24). Os nervos têm sido categorizados como adrenérgicos, colinérgicos e não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC). Ressalta-se este último por ser uma importante população de nervos no corpo cavernoso, contendo ACh, NO, VIP, Neuropeptídeo Y (42), e enzimas geradoras de transmissores/moduladores tais como: NOS (NO sintase) e heme oxigenases (HO) (65).

As artérias e veias penianas, e o músculo liso cavernosal recebem uma rica inervação adrenérgica, e é geralmente aceito que o pênis se mantém em seu estado flácido principalmente via uma atividade tônica nestes nervos (3). A noradrenalina liberada estimula os α -AR na vasculatura peniana, contraindo-os, e no corpo cavernoso, contraindo o músculo liso trabecular (4). A ativação dos α receptores nas células do músculo liso cavernosal estimula a dissociação de subunidade α -GDP da proteína G acoplada ao receptor, subseqüentemente levando à ativação da fosfolipase C. Esta enzima catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para formar o trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ liga-se a receptores do retículo sarcoplasmático (compartimento intracelular de estoque de cálcio), causando a liberação de Ca⁺² dentro do citosol. Assim como no músculo estriado, a quantidade de cálcio intracelular livre é a chave para a regulação do tônus no músculo liso. No estado de repouso, o nível de cálcio livre no sarcoplasma é aproximadamente 100 nM, enquanto no fluído extracelular o nível é de 1,5 a 2 mM. Este gradiente de 10.000

vezes de diferença é mantido por uma bomba de Ca^{+2} na membrana da célula e por um trocador de $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$. Uma vez que a concentração de Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático é aproximadamente 1mM, este íon, seguindo um gradiente de concentração, é dirigido para o interior do sarcoplasma. Este aumento na concentração de Ca^{+2} sarcoplasmático pode ativar um canal de cálcio distinto, talvez o canal operado por receptor de rianodina, levando a uma liberação adicional deste íon no sarcoplasma muscular (Fig. 4). A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo DAG pode ser potencializada por elevadas concentrações de Ca^{+2} intracelular. Tal ativação aumenta, ainda mais, a concentração plasmática deste íon, além de promover a fosforilação de algumas enzimas envolvidas numa cascata de reações que facilitam o processo contrátil (52).

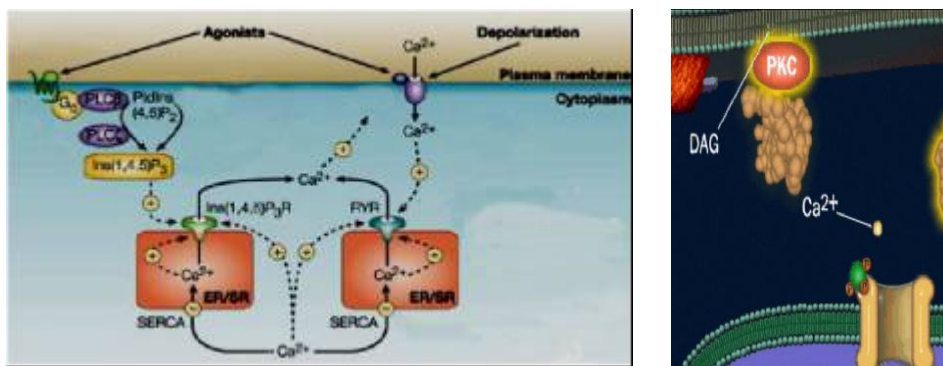


Fig. 4 – Representação esquemática da via contrátil estimulada por agonistas α_1 -adrenérgicos: aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} induzida pelo IP_3 e potencializada pelo DAG por intermédio da PKC.

Na célula do músculo liso, o Ca^{+2} interage com a calmodulina. O complexo cálcio-calmodulina ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) associando-se com a subunidade catalítica desta enzima. A MLCK ativada catalisa, por sua vez, a fosforilação da subunidade regulatória da cadeia leve da miosina (MLC_{20}). A

MLC₂₀ fosforilada ativa a miosina ATPase, desencadeando a interação entre os filamentos de actina e miosina, resultando em contração do músculo liso (Fig. 5).

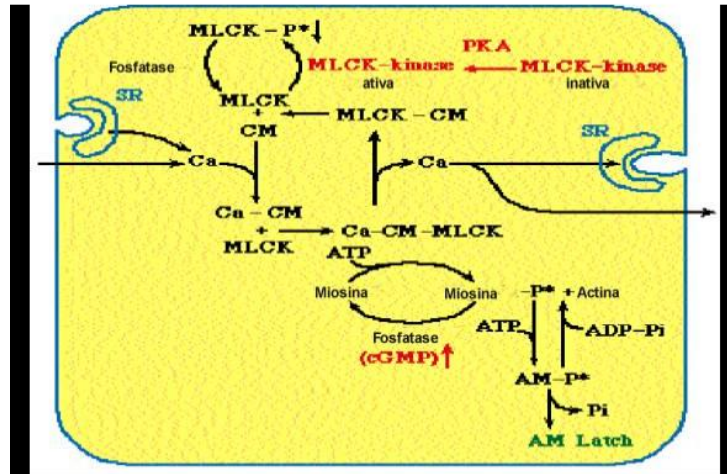


Fig. 5 – Esquema representativo da interação entre os filamentos de actina e miosina no processo de contração da musculatura lisa. ADP – bifosfato de adenosina; ATP – trifosfato de adenosina; Ca – íon cálcio; CM – calmodulina; MLCK – quinase da cadeia leve de miosina; SR – retículo sarcoplasmático.

Muitos investigadores acreditam que a contínua atividade simpática mantém o pênis no estado flácido (68). Uma redução do nível de cálcio intracelular induz a dissociação do complexo cálcio-calmodulina-MLCK, resultando na dissociação da MLC₂₀ pela fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) e em relaxamento do músculo liso (105).

Mecanismos farmacológicos acoplados podem também contrair ou relaxar o músculo liso sem uma mudança no influxo de Ca⁺². Uma via pela qual isto pode ocorrer é através da sensibilização e dessensibilização ao cálcio da fosforilação da miosina. A via de transdução de sinal que medeia esta contração (sensibilização ao cálcio) envolve uma proteína ligada ao GTP (guanosina trifosfato). A sensibilização

ao cálcio é acompanhada por um aumento de MLC₂₀ fosforilada, resultante de uma inibição da MLCP sem ativação da MLCK (56). A via Rho A / Rho-quinase contribui para a fase tônica da contração do músculo liso induzida por agonista (Fig. 6). Esta via pode ainda ter um papel sinérgico na vasoconstrição cavernosa para manter a flacidez peniana (106). Foi examinado o papel da enzima Rho-quinase usando um antagonista específico, o Y-27632, baseado na hipótese de que o antagonismo desta enzima estimularia a ereção peniana. Foi observado que a administração de Y-27632, em ratos anestesiados, aumenta a pressão no corpo cavernoso de maneira dose-dependente. Entretanto, este efeito não foi bloqueado pelo L-NAME, um antagonista inespecífico da sintase de NO (NOS), sugerindo independência de NO no processo de indução da ereção peniana, diferentemente dos fármacos já utilizados na clínica para o tratamento da disfunção erétil (19).

Diferentes mediadores incluindo noradrenalina, endotelina, angiotensina II (72), têm sido implicados na manutenção do tônus contrátil responsável pelo estado de flacidez peniano, bem como mediadores liberados durante a transição do estado erétil para o flácido, processo este denominado *detumescência*. Foi demonstrado uma maior importância do sistema renina-angiotensina (SRA) durante esta fase, principalmente pela liberação de angiotensina II (Ang II) (7). Durante a detumescência, há um aumento nos níveis de (Ang II) no sangue cavernosal comparado com os níveis da mesma no estado flácido (7). Entretanto, o exato papel deste peptídeo na função erétil é pouco compreendido, sendo necessário estudos adicionais para elucidar o exato papel do SRA, incluindo os outros peptídeos biologicamente ativos deste sistema na ereção peniana (*ver item 1.6*).

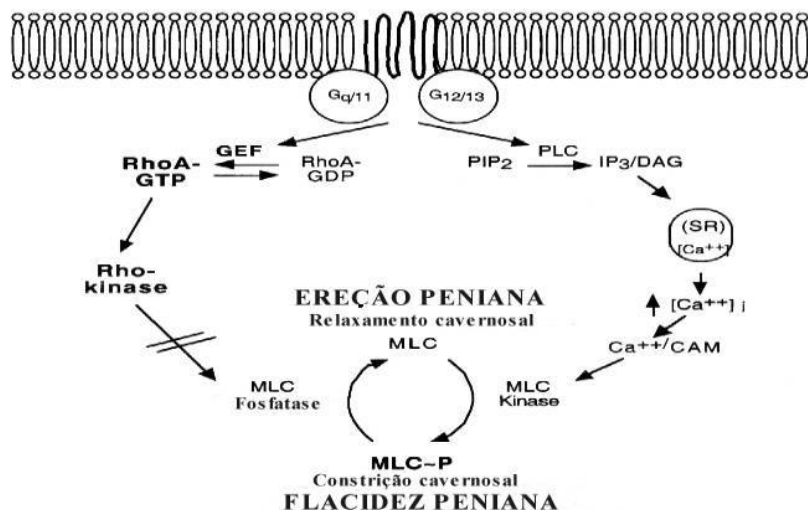


Fig. 6 – Via Rho A/Rho quinase de contração do músculo liso vascular.

Uma variedade de mecanismos intracelulares pode ativar o relaxamento da vasculatura cavernosal. O relaxamento é caracterizado por um declínio na fosforilação da cadeia leve da miosina via supressão da ativação da MLCK dependente ou independente de uma redução de Ca⁺² intracelular, e/ou via aumento da atividade da MLCP (18). É amplamente aceito que o NO, produzido pela inervação não-adrenérgica não-colinérgica da vasculatura cavernosal e células endoteliais locais, é o principal mediador do relaxamento do músculo liso (30). Independente da fonte, o NO entra na célula muscular lisa e ativa a guanilato ciclase solúvel, levando a um aumento dos níveis de GMP_C. Subseqüentemente, a proteína quinase dependente de GMP_C (PKG) pode alterar os níveis de Ca⁺² intracelular por reduzir a atividade dos canais de Ca⁺², ou por abrir os canais de K⁺ cálcio dependentes, levando à hiperpolarização das células do músculo liso (Fig. 7). A PKG pode ainda fosforilar outras proteínas para afetar os canais de Ca⁺² ou

levar a alteração no estado de fosforilação da MLC, resultando em um completo relaxamento do músculo liso cavernosal mediado pelo NO (22).

As fosfodiesterases (PDE) catalisam a hidrólise dos segundos mensageiros AMPc e GMPc. No tecido cavernoso de humanos foram identificadas pelo menos 13 isoenzimas incluindo PDE3 (PDE para AMPc inibida por GMPc), PDE4 (específica para AMPc) e PDE5 (específica para GMPc). Funcionalmente, PDE3A e PDE5A parecem ser as mais importantes para o processo de ereção peniana (5).

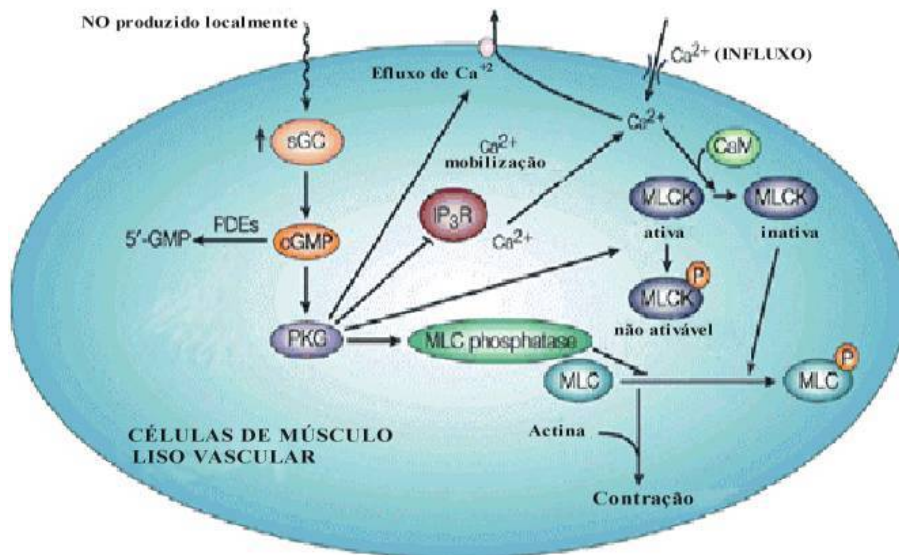


Fig. 7 – Mecanismo de ação da proteína quinase G (PKG) no processo de relaxamento da musculatura vascular lisa.

As células endoteliais e as fibras que inervam o corpo cavernoso podem ser fontes de NO e, portanto, mais que uma isoforma de NOS pode estar envolvida. Não há dúvidas com relação à presença da NOS neural (nNOS) no nervo cavernoso, no nervo peniano dorsal e plexo nervoso na adventícia da artéria cavernosa profunda (42). Entretanto foi demonstrado que camundongos deficientes

em nNOS tinham ereções, comportamento de acasalamento normal, e respondiam com ereção à estimulação elétrica do nervo cavernoso (43). Porém, foi mostrado que estes camundongos são ainda capazes de expressar um “splice” alternativo do mRNA (RNA mensageiro), que seria a fonte de NOS em camundongos mutantes (38).

Com relação a sintase de NO endotelial (eNOS), estudos funcionais dão suporte à ocorrência e importância desta enzima em tecido cavernoso humano (4), de ratos (13) e de camundongos (74). Com relação ao papel da eNOS na função erétil, acredita-se estar relacionado principalmente à manutenção da ereção iniciada pelo NO proveniente das terminações nervosas NANC. O estímulo sexual desencadeia a ativação da nNOS das terminações NANC, que liberam NO dentro corpo cavernoso. Este NO promove um aumento inicial de fluxo sanguíneo em direção aos corpos cavernosos, suficiente para ativar a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3 quinase) que, por conseguinte, ativa a proteína quinase serina/treonina (Akt) (12). Tal enzima fosforila a eNOS, de onde provém o NO responsável pela manutenção da ereção peniana e máximo aumento da pressão intracavernosa (10, 43).

Os tecidos penianos de animais de experimentação e de humanos recebem uma rica inervação colinérgica como mostrado por métodos de histoquímica e imunohistoquímica (42). A atividade parassimpática pode produzir tumescência peniana e ereção por inibir a liberação de NA através da estimulação de receptores muscarínicos em terminação nervosa adrenérgica, e/ou pela liberação de NO e peptídeos vasodilatadores dos nervos e endotélio (80). Em adição ao NO

e à ACh, os neurônios contendo polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) têm sido encontrados no tecido cavernosal, sendo que a administração de VIP leva a um aumento da pressão intracavernosa (PIC), resultando em ereção (55).

Componentes da via metabólica do ácido araquidônico têm sido localizados no pênis. As células musculares lisas do corpo cavernoso de humanos têm a habilidade de sintetizar vários prostanóides e metabolizá-los localmente (4). Os prostanóides podem estar envolvidos na contração do tecido erétil via $\text{PGF}_{2\alpha}$ e tromboxana A_2 , estimulando os receptores tromboxana e FP (receptor para $\text{PGF}_{2\alpha}$), e iniciando o “turnover” do fosfoinosítídeo, bem como no relaxamento via PGE_1 e PGE_2 , estimulando receptores EP, e iniciando um aumento na concentração intracelular de AMPc (3). Foi sugerido ainda que o relaxamento das células musculares lisas do corpo cavernoso de humanos induzido por PGE_1 está relacionado com a ativação dos canais de K^+ ativados por cálcio (K_{Ca}), resultando em hiperpolarização e conseqüente relaxamento das células musculares lisas (48).

1.4 - Definição e epidemiologia da disfunção erétil

A disfunção erétil (DE) é definida pelo National Institute of Health (NIH) Consensus Statemant (1993) como a “inabilidade de alcançar ou manter uma ereção adequada para a satisfação sexual”. A disfunção erétil é classificada dentro de quatro diferentes grupos: psicogênica, vasculogênica ou orgânica, neurológica, endocrinológica e iatrogênica, sendo esta última relacionada, principalmente, com

o efeito colateral de diferentes tratamentos farmacológicos. Por um longo tempo acreditava-se que o fator psicogênico fosse predominante. Entretanto, embora seja difícil separar fatores psicogênicos de doença orgânica, 75% dos casos de disfunção erétil estão relacionados a causas vasculogênicas (NIH Consensus Statement, 1993).

A DE pode ser devido à inabilidade do músculo liso vascular na túnica média das artérias, arteríolas e sinusóides cavernosos em relaxar. Esta inabilidade pode ter causas múltiplas, incluindo danos aos nervos, danos endoteliais, alterações na expressão e/ou função dos receptores e/ou na via de transdução de sinal que são implicados no relaxamento e contração das células do músculo liso. Alguns fatores de risco foram detectados, como: idade, diabetes mellitus, tabagismo, aterosclerose e hipercolesterolemia (3).

Feldman e cols. (1994) estudaram uma prevalência de impotência em uma determinada população usando resultados do "Massachusetts Male Aging Study". Este estudo foi conduzido de 1987 a 1989 utilizando uma amostragem aleatória constituída de 1290 homens não institucionalizados, com idade entre 40 e 70 anos, em 11 cidades selecionadas aleatoriamente nas proximidades de Boston, Massachusetts. Foi encontrada uma forte relação entre idade e a prevalência de disfunção erétil, de maneira que a probabilidade de um indivíduo ser acometido de uma completa disfunção erétil aumenta em 5% aos 40 anos e em 17% aos 70. Dentro desta mesma faixa etária a probabilidade de uma impotência moderada aumenta de 17 para 34% (31).

Nicolosi e cols. (2003) avaliaram a prevalência de disfunção erétil em populações do Brasil, Itália, Japão e Malásia, utilizando uma amostra selecionada aleatoriamente e constituída de 600 homens por país, com idade entre 40 e 70 anos. Foi encontrada uma prevalência de disfunção erétil de moderada a severa de 34% no Japão, 22% na Malásia, 17% na Itália e de 15% no Brasil. A prevalência total de disfunção erétil idade/específica foi de 9% entre os homens de 40 a 44 anos, 12% de 45 a 49 anos, 18% de 50 a 54, 29% de 55 a 59, 38% de 60 a 64, e 54% entre os de 65 a 70 anos. O aumento do risco de disfunção erétil foi associado a diabetes, doença cardíaca, tabagismo, depressão (78).

Um outro estudo realizado na cidade de Salvador, Bahia, mostrou um aumento na incidência de disfunção erétil relacionado com a idade, chegando a aproximadamente 19% em homens com idade entre 60 e 69 anos. Fazendo uma projeção destes dados, estima-se que aproximadamente 68,200 novos casos de disfunção erétil na Bahia e 1,025,600 em todo o Brasil podem ser esperados anualmente (75).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados objetivando determinar a prevalência de disfunção erétil em todo o mundo. De acordo com Kubim e cols. (2003), diferentes definições de disfunção erétil, distribuição de idade e concomitante condições médicas, bem como diferenças metodológicas, podem explicar as variações nas prevalências registradas (60). Sendo que as condições médicas englobam tanto a presença ou não de patologias no grupo avaliado, bem como o tipo de medicação utilizado pelos pacientes durante o estudo.

1.5 - Farmacologia da disfunção erétil

Uma grande variedade de drogas tem sido usada no tratamento da DE. Estas drogas podem ser administradas por via intracavernosa ou por outras vias denominadas não-intracavernosas. Dentre as drogas administradas por via intracavernosa já testadas, apenas três, usadas sozinhas ou em combinação, têm sido aceitas e utilizadas: papaverina, fentolamina e PGE₁ (3).

A papaverina é um inibidor não seletivo de fosfodiesterases (PDE). Juenemann e cols. (1986) demonstraram que a papaverina tem efeito hemodinâmico duplo, reduzindo a resistência para o influxo arterial e aumentando a resistência para o efluxo venoso (50).

A fentolamina é um antagonista competitivo de receptores adrenérgicos α com afinidade similar para os subtipos α_1 e α_2 . Entretanto esta droga pode bloquear receptores para 5-HT e causar liberação de histamina pelos mastócitos. Além disso, a fentolamina parece ter outra ação, possivelmente envolvendo a ativação da NOS (68). Em um estudo utilizando cães, Juenemann e cols. (1986) mostraram que o uso associado da fentolamina com papaverina reduz a resistência para o influxo arterial em direção ao pênis. Entretanto, a fentolamina, ao contrário da papaverina, não aumenta a resistência para o efluxo venoso (50).

A prostaglandina E₁ (PGE₁), injetada intracavernosamente ou administrada por via intrauretral, é uma das drogas mais usadas no tratamento da DE (88). A PGE₁ é metabolizada no tecido peniano a PGE₀, que é biologicamente ativa e

pode contribuir para o efeito da PGE₁. A PGE₁ pode atuar inibindo a liberação de NA, mas seu principal mecanismo de ação é pelo aumento da concentração intracelular de AMPc nas células musculares lisas no corpo cavernoso através da estimulação dos receptores EP (68). Em triagens clínicas, 40 a 70 % dos pacientes com DE respondem à injeção intracavernosa com PGE₁.

Dentre os fármacos administrados por via oral estão os inibidores seletivos para PDE5 como o Sildenafil, Tadalafil e Vardenafil. A via da L-arginina/NO/GC/GMPc parece ser a mais importante para a ereção peniana em muitas espécies, inclusive humanos (3). O sildenafil, o fármaco mais estudado da categoria, é 4000 vezes mais seletivo para a PDE5 que para a PDE3, e 70 vezes mais seletivo para a PDE5 que para a PDE4, mas apenas 10 vezes mais seletivo para a PDE5 em relação a PDE6 (5). O sildenafil é rapidamente absorvido após administração oral e tem uma meia-vida plasmática de 3 a 5 horas. Um grande número de triagens clínicas controladas por placebo, aleatórias e duplo cego tem mostrado que o sildenafil pode melhorar a ereção em homens com DE de origem psicogênica, orgânica ou quando ocorre associação desses fatores (107). Entretanto, em casos de DE severa, tais como resultantes de diabetes ou cirurgia de próstata, o tratamento com o sildenafil tem sido associado a apenas 41% de satisfação.

Uma vez que a PDE5 não é restrita ao pênis, efeitos colaterais como congestão nasal, dispepsia, dor de cabeça, rubor no peito e face, e diarreia, podem se desenvolver. Possíveis efeitos colaterais cardiovasculares e visuais têm dominado a discussão, sendo que uma contra-indicação absoluta para o sildenafil

é o uso de nitratos, uma vez que a maioria das mortes associadas ao sildenafil tem sido atribuída ao uso concomitante de nitratos (49).

Outro agente vasoativo também usado no tratamento da DE é o alprostadil, um fármaco administrado topicamente sobre a mucosa da uretra e pode aparentemente ser absorvido dentro do corpo esponjoso e transferido para o corpo cavernoso. A PGE₁ e a combinação de PGE₁/prazosin produz ereções na maioria dos pacientes com DE orgânica crônica (86). O efeito colateral mais comum é dor peniana. Entretanto, quando o alprostadil é administrado por via transuretral os efeitos colaterais são: dor peniana e em alguns casos ocorre priapismo (82).

1.6 – Sistema Renina-Angiotensina e Disfunção Erétil

O sistema renina-angiotensina (SRA) era visto como um sistema hormonal circulante envolvido na regulação da pressão arterial bem como na homeostase de fluídos e eletrólitos, funções estas realizadas pelo seu principal e único componente bioativo até então descrito, a angiotensina II (AngII). De acordo com esta visão, o angiotensinogênio, liberado pelo fígado, é convertido no decapeptídeo angiotensina I (Ang I) sob ação da renina, liberada pelos rins. Uma vez formada, a Ang I é substrato para a enzima conversora de angiotensina (ECA), que catalisa a hidrólise da ligação entre os aminoácidos Fen⁸-His⁹, resultando na formação da Ang II (94). Entretanto, nos últimos anos, inúmeros

estudos corroboraram de maneira a promover alterações conceituais importantes neste sistema, que passou a ser considerado não apenas um sistema hormonal circulante, mas também um sistema local, com ações parácrinas e autócrinas extremamente importantes. Achados como a clonagem e caracterização farmacológica de novos receptores (AT1a, AT1b, AT2 e Mas), a identificação de diversas enzimas, dentre as quais ressalta-se a enzima conversora de angiotensina II (ECA II) (23), bem como de peptídeos com atividades biológicas importantes, ressaltando-se dentre eles a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (37, 64, 94), contribuíram para que a visão clássica do SRA fosse alterada (Fig. 8).

Dentre os peptídeos que fazem parte do SRA, inúmeros estudos tem sido dedicados a caracterizar as ações biológicas de um em especial, a Ang-(1-7), principalmente pelo fato de este peptídeo contrapor grande parte das ações da Ang II. O primeiro relato da ação biológica da Ang-(1-7) foi feito por Schiavone e colaboradores, demonstrando que este heptapeptídeo é capaz de estimular a liberação de vasopressina do sistema hipotálamo-neurohipófise (101). A Ang-(1-7), gerada a partir da Ang I pela endopeptidase neutra 24.11 e prolil-endopeptidase 24.26, presentes no sangue, cérebro, rins e endotélio vascular (115), pela metilendopeptidase 24.15 presente no músculo liso vascular (16), e também a partir da hidrólise da Ang-(1-9) pela ECA II (23), se liga ao seu receptor específico Mas (98), e funciona como um hormônio anti-hipertensivo muito potente, que limita as ações vasopressora e hipertensiva mediadas pela Ang II (8, 76). Tal fato pode ser associado ao seu efeito vasodilatador em diversos leitos

vasculares, incluindo artérias coronárias de suínos (39) e caninos (11), aorta de rato (62) e artérias mesentéricas de felinos (81).

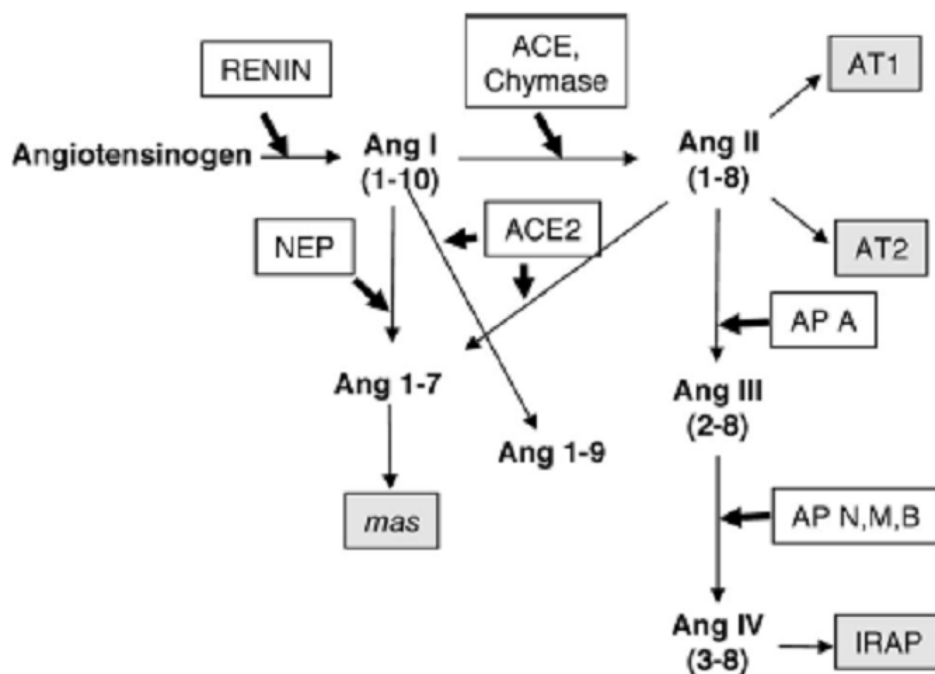


Fig. 8 – Representação esquemática do RAS baseado em últimas informações. AM A, N, M e B indica aminopeptidase A, N, M e B. IRAP, aminopeptidase regulada por insulina. Os passos catalíticos são representados pelas setas escuras, e as enzimas catalíticas estão dentro dos quadrados. Os receptores são mostrados como quadrados preenchidos.

A identificação do receptor Mas como sendo um receptor específico para a Ang-(1-7) (98), a caracterização farmacológica de seu antagonista específico, o A-779 (95), bem como a identificação da ECA II (23), colaboram no sentido de efetivar a Ang-(1-7) não apenas como um produto do metabolismo do SRA, mas como um peptídeo biologicamente ativo tão importante quanto a Ang II. Sendo assim, pode-se inferir que o SRA apresenta dois braços principais: a Ang II, com importante atividade vasoconstritora e proliferativa; e a Ang-(1-7), cujas ações

contrapõem às da Ang II, incluindo vasodilatação e inibição da proliferação de alguns tipos celulares (98).

Inúmeros estudos têm sido realizados com o intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos no processo fisiológico da ereção peniana, bem como os envolvidos em situações patológicas, em cuja via de sinalização atuam as principais drogas utilizadas atualmente para o tratamento da disfunção erétil (DE), a saber os inibidores de fosfodiesterase principalmente tipo 5 (iPDE5) (14, 68, 69, 93). Tem sido amplamente descrito e aceito que o principal mediador responsável pelo processo de ereção é o óxido nítrico (NO) (2, 43, 80, 90), entretanto outros mediadores participam no controle da contratilidade da musculatura lisa peniana. Por exemplo, em leitos vasculares extracavernosais, o tônus/contratilidade do músculo liso vascular e a modulação do fluxo sanguíneo regional, dependem de um balanço entre a Ang II e NO (26). No leito vascular peniano, foi descrito que o corpo cavernoso produz e secreta, fisiologicamente, quantidades relevantes de Ang II. Além disso, foi demonstrado que a injeção intracavernosa de Ang II resulta em contração do músculo liso cavernoso e término da ereção espontânea em cães anestesiados, enquanto a administração de um antagonista dos receptores da Ang II (AT1) induz relaxamento do músculo liso e, portanto, ereção (54).

Assim como observado em animais, a Ang II parece apresentar uma importância funcional no término da ereção em humanos. A análise de amostras de sangue do corpo cavernoso colhidas durante as fases de flacidez, tumescência e rigidez, não apresentaram diferença significativa nos níveis deste peptídeo. Entretanto, estes níveis encontraram-se significativamente aumentados na fase de

detumescência (7). Embora ainda não seja descrito o papel de todos os componentes do SRA na modulação do tônus e ereção peniana, é sabido que outros peptídeos, além da Ang II, são liberados dentro dos sinusóides cavernosais, incluindo a Ang-(1-7) (54).

A importância fisiológica do SRA no processo de ereção peniana fica evidente uma vez que drogas que antagonizam as ações da Ang II (antagonistas de receptor AT1) ou que impedem a sua síntese (os inibidores de ECA, iECA), estão incluídas no grupo de drogas anti-hipertensivas que não apresentam como efeito colateral a DE (29). Na verdade, tanto os iECA como os antagonistas de receptor AT1 tem sido descritos como drogas que apresentam ação potencializadora da função erétil (28, 40, 53). Outro achado importante é que as ações dos antagonistas de receptor AT1 bem como dos iECA tem sido associadas com o aumento nos níveis circulantes do vasodilatador Ang-(1-7), sugerindo que parte das ações destes fármacos estão relacionadas a este peptídeo (45, 61, 77). Assim, foi hipotetizado que o efeito pró-erétil induzido por este grupo de drogas poderia estar associado ao aumento dos níveis circulantes de Ang-(1-7), e que este heptapeptídeo, uma vez agindo em seu receptor específico, poderia participar do processo de ereção peniana, bem como modular as ações da Ang II. Para isso, foi examinada a presença do receptor Mas para a Ang-(1-7) no corpo cavernoso de rato e humano, avaliado o efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) sobre a ereção peniana induzida por estimulação ganglionar na presença e ausência de alguns antagonistas, tais como o A-779 e L-NAME. Foi avaliada ainda a liberação de NO induzida pela Ang-(1-7) em corpo cavernoso de humano, rato e

camundongo (tipo selvagem e knockout para o receptor Mas). A relevância fisiológica do receptor Mas foi examinada a partir das análises da função erétil de camundongos knockout para o receptor Mas bem como do conteúdo de tecido fibroso peniano destes animais, e do efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) em animais hipertensos DOCA-sal, os quais apresentam disfunção erétil.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

De acordo com o exposto previamente, o objetivo geral deste estudo foi examinar o papel do eixo Ang-(1-7)/Mas na função erétil.

2.2 - Objetivos Específicos

- Documentar a presença do receptor Mas em corpo cavernoso humano e de rato; Explorar o efeito da Ang-(1-7), administrada pela via intracavernosa, sobre a função erétil de ratos anestesiados; Determinar o papel da Ang-(1-7) liberada endogenamente na função erétil de ratos anestesiados; Estudar o papel do NO na resposta potencializadora da função erétil induzida pela Ang-(1-7); Avaliar o efeito da deleção do Mas na função erétil de animais anestesiados; Determinar possíveis alterações no conteúdo de tecido fibroso em corpo cavernoso de animais com deleção do receptor Mas; Examinar o efeito da Ang-(1-7), administrada pela via intracavernosa, em animais hipertensos DOCA-sal, que sabidamente apresentam disfunção erétil.

3. MÉTODOS

3.1 - Animais e Tecido Humano

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos (250 a 300 g) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO)-ICB-UFMG, e camundongos machos com deleção do proto-oncogene *Mas* (*Mas* KO – *Mas knockout*), criados a partir de camundongos C57BL/6, e camundongos sem essa deleção (*Mas* WT – *Mas wild type* C57BL/6) (114), com idade entre 12 e 24 semanas, pesando entre 20 e 25g, cedidos pelos professores Dr. Thomas Walther do departamento de Cardiologia e Pneumologia da Universidade de Berlim e Dr. Michael Bader do Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlim. O Comitê de Ética em Pesquisa Animal (COEP-UFMG) desta instituição de ensino aprovou todos estes protocolos experimentais.

Para a realização dos experimentos em tecido cavernoso humano, tiras de corpo cavernoso foram voluntariamente cedidas pelos pacientes submetidos à cirurgia de implante de prótese peniana do Centro de Urologia do Hospital das Clínicas (Faculdade de Medicina - UFMG) sob coordenação do Dr. Augusto B. Reis (Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas – UFMG). Para que este protocolo experimental fosse viabilizado, o mesmo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP-UFMG) desta instituição de ensino.

3.2 - Procedimentos de Imunofluorescência

A localização do receptor Mas foi verificada em corpo cavernoso de humano e rato Wistar, através de imunofluorescência com Anticorpo secundário marcado com fluoróforo Alexa 594.

3.2.1 - Drogas e Reagentes:

- Anticorpo policlonal anti-Mas produzido em camundongos Mas KO, a partir de um segmento N-terminal da proteína Mas (diluição final 1:500);
- Anticorpo anti-camundongo marcado com fluoróforo Alexa 594 produzido em cabra (*Molecular Probes, EUA*);
- Tampão fosfato 1X PBS (0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, azida de sódio 0,02%, pH = 7.4);
- Paraformaldeído 4% em tampão 1X PBS;
- Sacarose 30% em tampão 1X PBS;
- Triton 0.1% em 1xPBS;
- Albumina sérica bovina (BSA) 1% em 1x PBS
- Glicerol 90% em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 10.

3.2.2 - Preparação do tecido

Os ratos Wistar foram anestesiados com Tribromoetanol 2.5% (1mL/100g de peso por via intra-peritoneal) e perfundidos, através de cânula inserida no ventrículo esquerdo, com 1xPBS pH 7.4, até os corpos cavernosos expostos cirurgicamente tornarem-se limpos. Posteriormente, os corpos cavernosos foram rapidamente extraídos e colocados em frascos contendo paraformaldeído 4% em 1xPBS por 5-6h. Após fixação e lavagem em 1xPBS pH 7.4 (4 lavagens de 5 min/ cada), o tecido cavernoso foi colocado em imersão com Sacarose 30% por 2h, e então congelados em freezer a – 80°C.

O tecido cavernoso humano, uma vez removido em virtude de cirurgia de implante de prótese, foi rapidamente transportado para o laboratório em solução PBS resfriada a 4 °C. Posteriormente, processou-se a lavagem com PBS até que o tecido sanguíneo fosse removido e fixado em paraformaldeído 4% em 1xPBS por 5-6h. Após fixação e lavagem em 1xPBS pH 7.4 (4 lavagens de 5 min/ cada), o tecido cavernoso foi colocado em imersão com Sacarose 30% por 2h, quando então o tecido foi congelado em freezer à temperatura de -80 °C.

Subsequentemente, os tecidos foram cortados em fatias de 10 µm de espessura em criostato (Minotome Plus, IEC) a -20°C, e montadas em lâminas previamente cobertas com gelatina. Ao término da preparação do tecido, as lâminas foram colocadas em temperatura ambiente, onde foi realizado o ensaio.

Etapas do Ensaio

1. Hidratação dos cortes: 1xPBS, 60 minutos;
2. Permeabilização do tecido: Triton 0.1% em 1xPBS, 15 minutos;
3. Bloqueio da ligação inespecífica do anticorpo secundário: PBS / BSA 1% em 1xPBS durante 15 minutos;
4. Incubação com o anticorpo primário [anticorpo policlonal anti-Mas, diluição final 1:500] ou solução controle [consistindo de anticorpo primário (1:500) pré-incubado por 24 h a 4 °C com 50 µg do peptídeo bloqueador que corresponde à porção N-terminal da proteína Mas] em câmara úmida a 4 °C por 24 horas;
5. Lavagem: 3 lavagens com PBS, 5 minutos cada lavagem;
6. Incubação: Anticorpo secundário (*Anti-mouse* Alexa 594), 60 min em temperatura ambiente;
7. Lavagem: 3 lavagens com PBS, 5 minutos cada lavagem;
8. Montagem das lâminas: Glicerol 90% em Tris-HCl. Após adição das lamínulas, as lâminas foram seladas com esmalte transparente.

d) Análise dos tecidos

As lâminas foram analisadas através de microscopia confocal (LSM 510 laser scanning confocal, Zeiss).

3.3 - Medidas da Pressão Intracavernosa

O procedimento usado para induzir ereção e medida da pressão intracavernosa foi previamente descrito por (73). Inicialmente os animais foram anestesiados com uretana (140 mg/mL/Kg de peso, i.p.). A artéria femoral esquerda foi canulada com um tubo de polietileno (PE-10) contendo salina heparinizada (200 unidades mL⁻¹) e conectado a um transdutor de pressão para uma contínua monitorização da pressão arterial média (PAM) (ver figura 9).

A ereção peniana foi obtida através de estímulos elétricos no gânglio pélvico maior (GPM) acessado na região dorsolateral direita da próstata. Este gânglio, também denominado gânglio hipogástrico, é o principal componente do plexo pélvico. É acompanhado por outros dois gânglios acessórios, gânglio pélvico pequeno e médio, principalmente relacionados à vesícula seminal e ao canal deferente. Troncos pequenos de nervos eferentes emergem do GPM e alcançam o reto, o canal deferente, a vesícula seminal, a bexiga, a próstata e a uretra. O principal tronco é o que supre a uretra e prossegue para inervar o pênis.

Por meio de uma incisão mediana suprapubiana no abdômem o GPM, em um dos lados dorsolateral da próstata, foi identificado e isolado. Para produzir alterações na pressão intracavernosa (CCP), um eletrodo bipolar de prata foi posicionado sobre o gânglio pélvico maior. Os efeitos da estimulação ganglionar foram avaliados a partir de estímulos elétricos com voltagens crescentes (0.5, 0.75, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5 e 3.0 V). Cada pulso teve uma duração de 5 ms e uma frequência de 12 Hz. Para monitorar continuamente a pressão intracavernosa os

corpos cavernosos penianos do animal foram expostos e canulado (corpo cavernoso esquerdo) com agulha de calibre 30, a qual foi conectada a um sistema de aquisição de dados computadorizado por meio de uma cânula de polietileno PE 10 contendo salina heparinizada (200 unidades mL⁻¹) (ver figura 9).

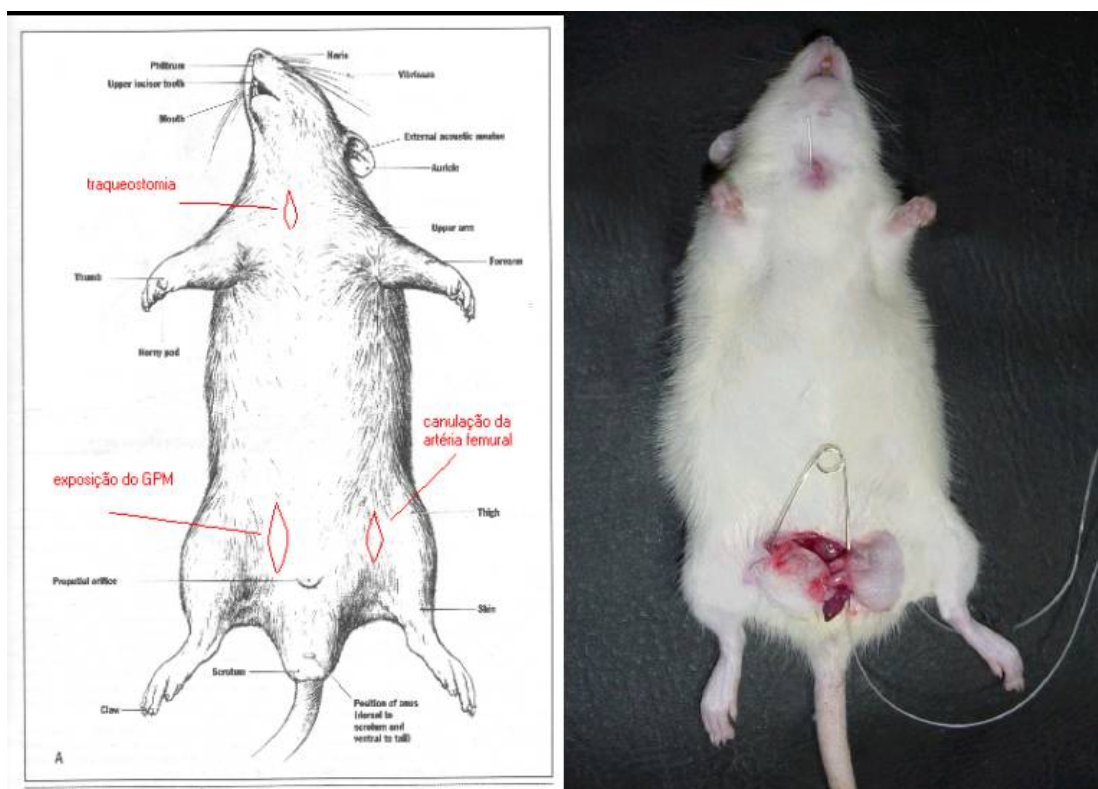


Figura 9 – Representação esquemática dos passos cirúrgicos que consiste de traqueostomia, canulação de artéria e veia femural, exposição do GPM e canulação do corpo cavernoso direito.

A Ang-(1-7), na dose de 15.0 pmol/Kg (0,5 µL/min), foi infundida dentro do corpo cavernoso direito de ratos Wistar. Após a administração da droga foi aguardado um período adicional de 5 minutos e então a segunda seqüência estimulatória foi repetida. Foi aguardado um período de 10 minutos entre as duas seqüências estimulatórias (Fig. 10).

Para estudarmos o efeito da Ang-(1-7) endógena na ereção peniana de ratos anestesiados induzida por estimulação elétrica ganglionar, o composto A-779 (155 pmol/Kg/min) [antagonista específico para a Ang-(1-7)] foi infundido pela via intracavernosa 10 minutos após uma seqüência estimulatória controle. Subsequentemente procedeu-se com uma segunda seqüência estimulatória (Fig. 10).

Para avaliarmos se a resposta produzida pela Ang-(1-7) é mediada pelo receptor Mas, uma solução contendo Ang-(1-7) e A-779 (15.5 e 155 pmol/Kg/min, respectivamente) foi infundida intracavernosamente após uma seqüência estimulatória controle, prosseguindo-se com uma segunda seqüência estimulatória como já descrito (Fig. 10).

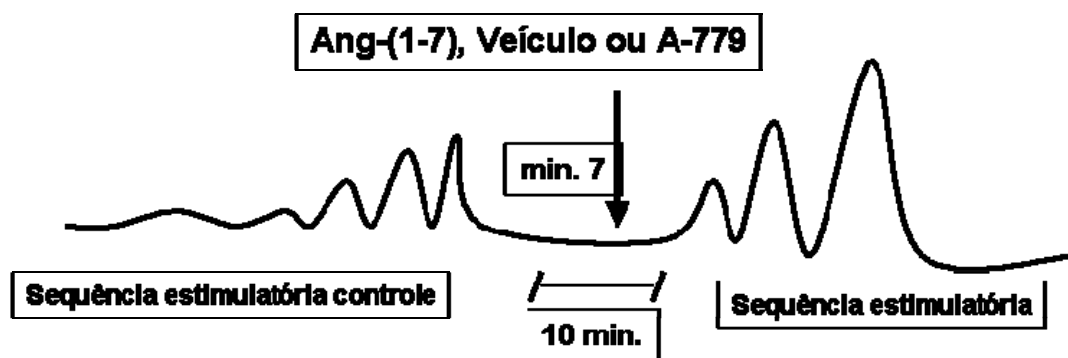


Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental (1) utilizado para avaliar o efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) e do antagonista específico para o receptor Mas, A-779.

Para avaliarmos o papel do NO sobre o possível efeito potencializador da função erétil promovido pela Ang-(1-7) foi utilizado o seguinte protocolo experimental: inicialmente foi determinada uma voltagem em que o valor de CCP/MAP gerado fosse inferior ao máximo obtido para cada animal. A seguir, o

GPM foi submetido à estimulação elétrica com esta voltagem pré-determinada durante dois minutos. Tendo aguardado 5 minutos após a administração do L-NAME (N^G -nitro-L-arginine metiléster), um antagonista de NOS, a estimulação elétrica foi repetida. Posteriormente, a Ang-(1-7) foi infundida e, 3 minutos após o início da infusão, a estimulação elétrica ganglionar foi repetida. Foi respeitado um período de 10 minutos entre as estimulações (Fig. 11).

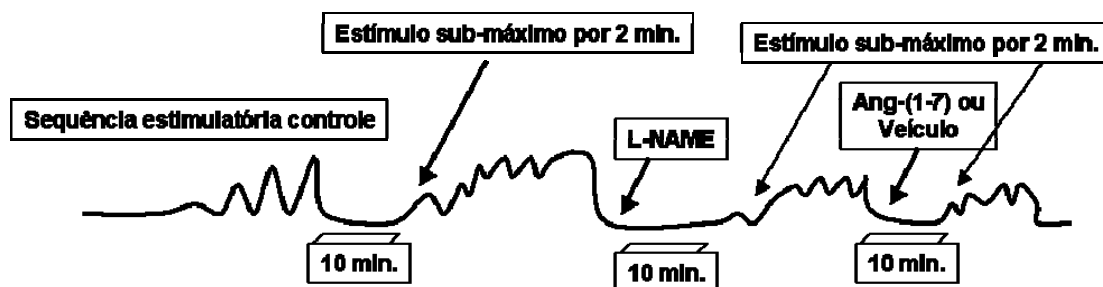


Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental (2) utilizado para avaliar o efeito da administração intracavernosa do L-NAME, e o efeito da Ang-(1-7) diante da inibição da NOS.

Os dados são apresentados como razão entre CCP/MAP em função da diferença de potencial utilizada para estimular o GPM, de acordo com a seqüência proposta.

3.4 – Animais DOCA-sal

Ratos Wistar pesando entre 130-150g foram usados nestes experimentos. Os ratos foram anestesiados usando tribromoetanol e submetidos a laparotomia

mediana. O rim direito foi identificado e isolado. Com auxílio de uma haste flexível de algodão foi retirada a cápsula do rim. A artéria e veia renais foram amarradas com fio de algodão e somente então foi feita a nefrectomia unilateral. Metade dos animais recebeu um implante subcutâneo de silicone no dorso contendo acetato de deoxicorticosterona (200 mg/Kg). Os animais controles (Sham-operados) foram submetidos somente a nefrectomia unilateral direita. Os locais de incisão foram suturados e os ratos colocados novamente no biotério. Os ratos DOCA-sal tiveram como água de beber solução contendo 1% de NaCl e 0,2% de KCl, e foram colocados em gaiolas unitárias durante 30 dias. Após o período de tratamento, os valores de pressão foram aferidos utilizando para tal um pletismógrafo acoplado ao sistema Biopac de aquisição de dados. Foram considerados hipertensos os animais cujas médias de três medidas consecutivas foram maiores ou iguais a 140 mmHg, considerando a pressão sistólica.

Para análise do efeito da Ang-(1-7) neste modelo animal que sabidamente apresenta disfunção erétil, os mesmos procedimentos cirúrgicos de canulação da artéria femoral e do corpo cavernoso para registros das pressões arterial média e cavernosa, respectivamente, bem como exposição do GPM para estimulação elétrica, foram realizados. Semelhantemente, foi realizada uma seqüência estimulatória controle, aguardado um período adicional de 10 minutos, quando então se iniciou a infusão de Ang-(1-7) à dose de 15.5 pmol/Kg/min. Após 3 minutos do início da infusão, foi confeccionada uma nova curva estímulo-resposta (Fig. 10).

3.5- Medida da liberação de NO

Para detectar a produção de NO bem como a liberação do mesmo induzido pela Ang-(1-7) no corpo cavernoso de humano, rato Wistar e camundongos WT e KO, o indicador de NO diacetato 4-amino-5 metilamino-2'7'-difluoresceína (DAF-FM DA) (85) foi usado. DAF-FM diacetato é um marcador permanente de NO, diacetilado por esterases intracelulares resultando em DAF-FM. Este composto reage com o NO na presença de oxigênio (O_2) formando triazolofluoresceínas verde-fluorescentes (57). Na presença de NO e O_2 , DAF-FM é transformado em um produto triazol fluorescente. Ele não reage com outras espécies reativas de oxigênio nem com formas oxidadas estáveis de NO. Em um estudo recente foi demonstrado que a reação de diaminofluoresceínas é completamente independente de cálcio ou magnésio em concentrações fisiológicas (58).

Para investigar se a Ang-(1-7) estimula a liberação de NO, tiras de corpo cavernoso humano e de camundongos foram expostos à Ang-(1-7) de acordo com o seguinte protocolo experimental: o tecido cavernoso humano uma vez removido durante cirurgia de implante de prótese, foi rapidamente transportado em solução PBS resfriada a $4\ ^\circ\text{C}$ para o laboratório. Posteriormente, ele foi lavado em solução PBS à temperatura de $36\ ^\circ\text{C}$ até que o tecido sanguíneo fosse removido.

Os camundongos foram anestesiados com uretana (140 mg/100 g, intraperitoneal, i.p.) e perfundidos, através de cânula inserida no ventrículo esquerdo, com 1xPBS pH 7.4, até os corpos cavernosos expostos cirurgicamente tornarem-se limpos. Posteriormente, os corpos cavernosos foram removidos

juntamente com as estruturas anexas (veia dorsal, uretra, corpo esponjoso) e mantidos em solução 1xPBS à temperatura ambiente.

Tanto o tecido cavernosal de humano quanto o de camundongo foi incubado em solução contendo DAF-FM (1 μ M em 1xPBS, pH 7.4) apenas ou solução contendo DAF-FM e Ang-(1-7) (10 nM em 1xPBS, pH 7.4), por um período de 5 minutos. Posteriormente o tecido foi lavado em PBS por 3 vezes, durante 5 minutos cada, e congelados a -80 °C.

Ratos Wistar machos foram submetidos ao procedimento cirúrgico mencionado anteriormente (item 3.3) para que a liberação de NO induzida pela Ang-(1-7) fosse avaliada *in vivo*, com e sem estimulação elétrica do GPM de acordo com o seguinte protocolo experimental: foi confeccionada uma curva estímulo-resposta controle para determinação do valor de voltagem em que o aumento da razão CCP/MAP fosse inferior à máxima. Em seguida foi iniciada a infusão iuntracavernosa de solução contendo DAF-FM apenas ou DAF-FM e Ang-(1-7) nas mesmas concentrações usadas no protocolo com corpos cavernosos de humano e camundongo. Passados 3 minutos do início da infusão destas soluções, o GPM foi estimulado eletricamente com a voltagem determinada anteriormente. Os animais foram perfundidos, por meio de cânula inserida no ventrículo esquerdo, com 1xPBS pH 7.4, até os corpos cavernosos expostos cirurgicamente tornarem-se limpos. Posteriormente, os corpos cavernosos foram removidos juntamente com as estruturas anexas (veia dorsal, uretra, corpo esponjoso) e congelados a -80 °C.

Subsequentemente, os tecidos (humano, rato e camundongo) foram cortados em fatias de 20 μm de espessura em criostato (Minotome Plus, IEC) a -20°C , e montadas em lâminas previamente cobertas com gelatina (montagem das lâminas: Glicerol 90% em Tris-HCl. Após adição das lamínulas, as lâminas foram seladas com esmalte transparente.

As imagens fluorescentes foram obtidas usando microscopia confocal (LSM 510 laser scanning confocal, Zeiss) excitada com laser argon-íon a 488 nm (objetiva 63x imersa em óleo).

3.6 – Histologia

Cortes de tecido cavernosal de camundongos WT e KO para o receptor Mas foram utilizados para coloração com Tricrômio de Gomori para análise do conteúdo de tecido colagenoso no corpo cavernoso destes animais.

Para análise quantitativa do conteúdo de tecido fibroso, foi medida a intensidade de coloração em diferentes áreas dos corpos cavernosos dos animais Mas^{+/+} e Mas^{-/-}. As imagens destas áreas foram capturadas a 12 bits e, usando um escala de cinza cujos valores de intensidade do preto ao branco variam entre 0 a 255, respectivamente, estas áreas foram comparadas e analisadas usando o Scion Image software (www.scioncorp.com).

3.7 – Análise Estatística

Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para análise do efeito da Ang-(1-7) em animais anestesiados. Para análise do efeito do A-779 na pressão intracavernosa bem como da influência do L-NAME no efeito potencializador da função erétil induzido pela Ang-(1-7), o teste *t* de Student foi usado. A análise estatística do conteúdo de tecido fibroso foi feita utilizando o teste *t* de Student não pareado seguido pelo teste de Mann Whitney. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 - Imunolocalização do receptor Mas em corpo cavernoso humano e de rato

Para que fossem determinadas a presença e localização precisa do receptor Mas em tecido peniano, especificamente corpo cavernoso, foi utilizada a técnica de imunofluorescência. A imunolocalização do receptor Mas foi realizada usando tiras de corpo cavernoso de humanos e ratos Wistar, como previamente descrito (veja item 3.2).

A partir das imagens adquiridas por microscopia confocal foi observado que o receptor Mas apresenta-se distribuído difusamente em todo o corpo cavernoso de humano. Neste tecido, o receptor Mas pode ser evidenciado nas trabéculas que o constituem, onde estão presentes principalmente células musculares lisas, bem como células que delineiam os sinusóides cavernosais, a saber, células endoteliais. Como não foi utilizada nenhuma marcação específica para que fosse feita a exata diferenciação dos tipos celulares, não foi possível determinar a presença do receptor Mas em fibroblasto em corpo cavernoso humano (Imagem 1).

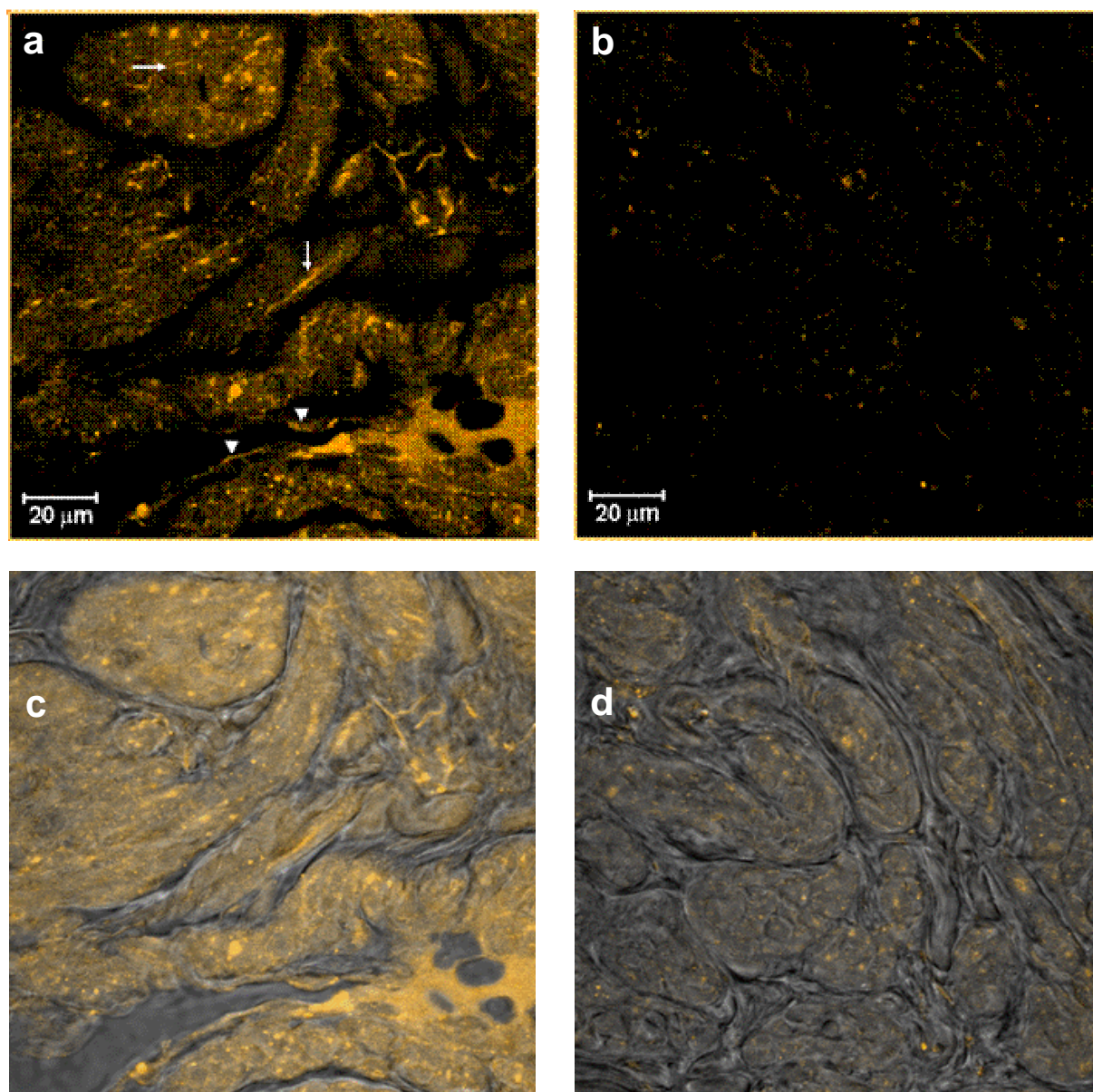


Imagem 1 – Imunolocalização do receptor Mas nas estruturas penianas de humano. O receptor Mas está localizado em células endoteliais (triângulos) e musculares lisas (setas) de corpo cavernoso de humanos (painel **a** e **b**). As imagens b e d representam os respectivos controles. Merged: painéis c e d. Objetiva 63x.

Em tecido cavernoso de ratos, foi observado que, semelhantemente ao evidenciado em corpo cavernoso humano, o receptor Mas está localizado em células musculares lisas do tecido trabecular que constitui o corpo cavernoso (Imagem 2). Entretanto, pôde-se determinar também sua localização em células endoteliais e musculares lisas dos sinusóides que irrigam o corpo cavernoso (Imagem 3).

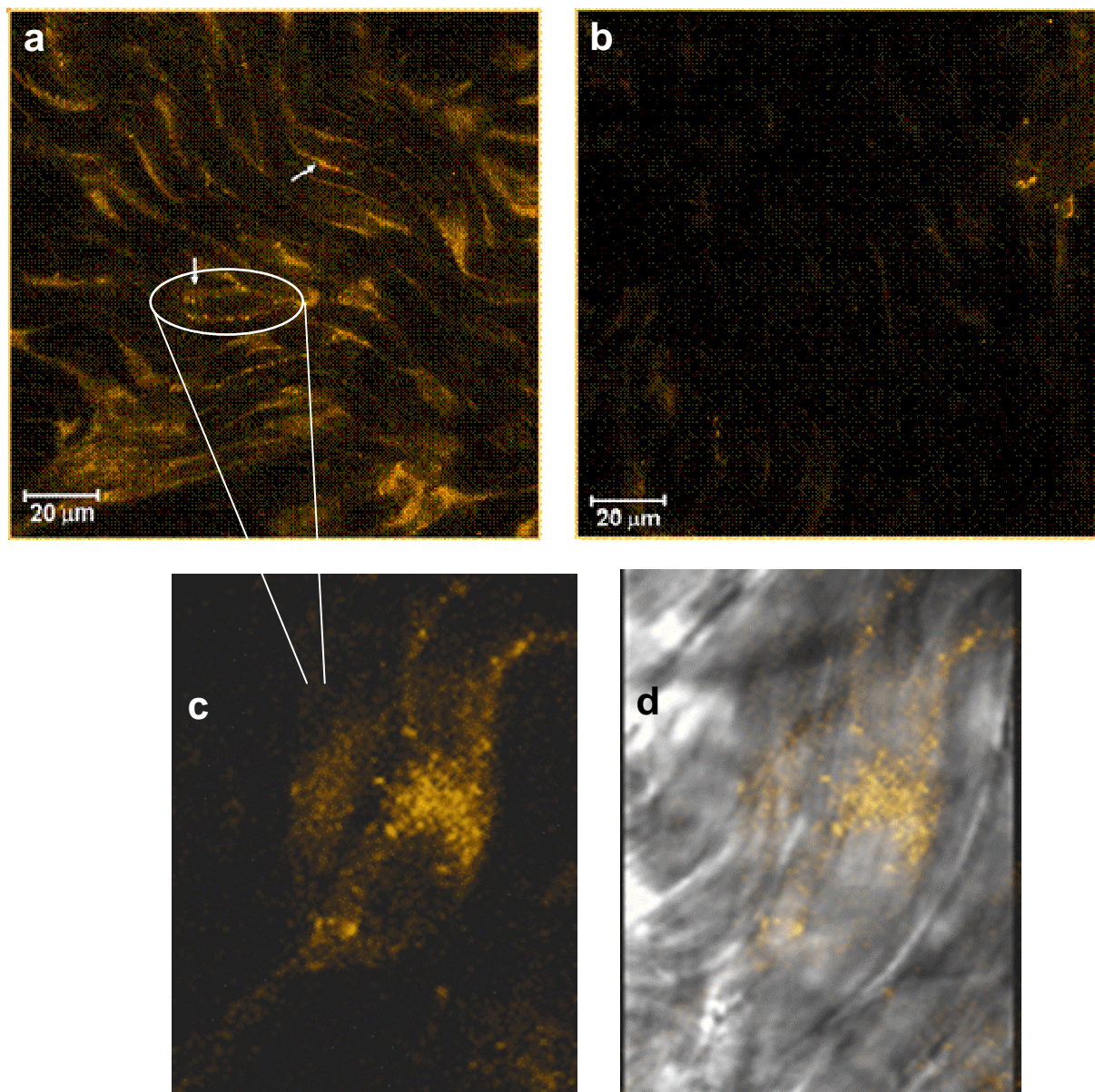


Imagem 2 – Imunolocalização do receptor Mas em corpo cavernoso de ratos. O receptor Mas está localizado em células musculares lisas de corpo cavernoso de ratos (setas, painel a), apresentando uma distribuição membranar (painel c). Controle: painel b; Merged: painel d. Objetiva: 63x, com exceção dos painéis c e d, os quais são imagens ampliadas representativas do painel a.

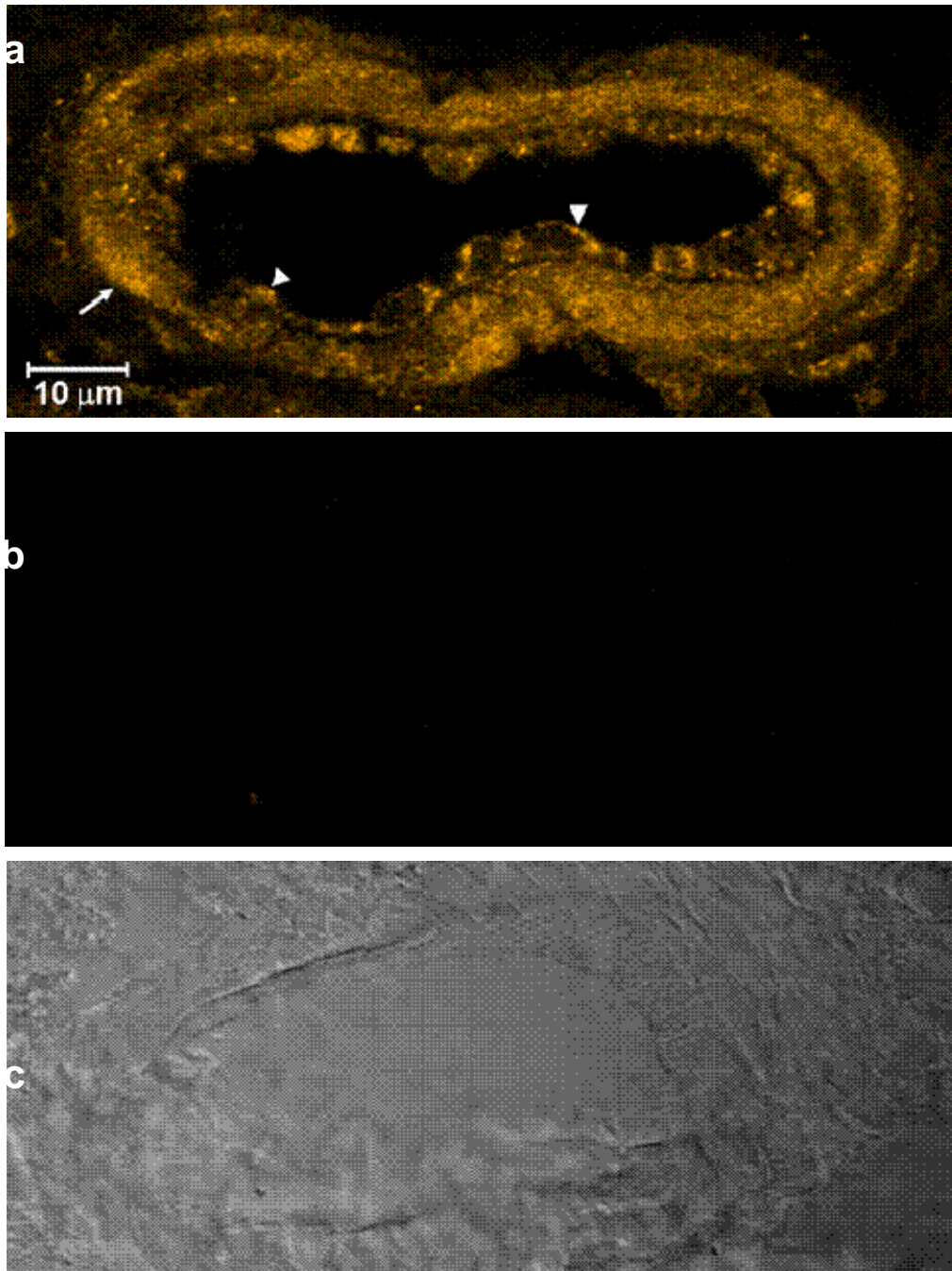


Imagem 3 – Imunolocalização do receptor Mas em arteríola de rato. O receptor Mas está localizado em células endoteliais e musculares lisas arteriolar de ratos (a, objetiva 63x). Os painéis b e c representam o controle e a imagem do tecido sem captação de fluorescência (DIC), respectivamente (Objetiva 63 x).

4.2 - Avaliação do efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) e AVE 0991 em animais anestesiados

4.2.1 - Efeito da estimulação elétrica do GPM na CCP/MAP

Usando um modelo de ereção “in vivo” em ratos anestesiados pela uretana, foi examinado o efeito da estimulação elétrica do GPM com voltagens crescentes, como descrito em materiais e métodos.

Como pode ser observado no gráfico 1, a estimulação elétrica do GPM resultou em um aumento voltagem-dependente na razão CCP/MAP, alcançando uma resposta máxima em 1.5 V. Sendo assim, o escalonamento de voltagem utilizado para confeccionar o gráfico 2 foi utilizado nos protocolos experimentais que se seguiram.

Após um período adicional de 10 minutos, uma segunda sequência estimulatória foi realizada. Como pode ser observado no gráfico 1 (A e B) não há diferença estatística entre as curvas 1 e 2.

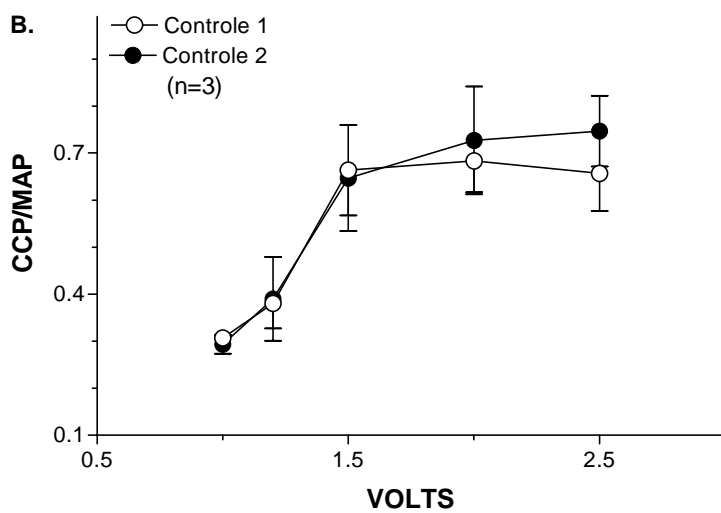
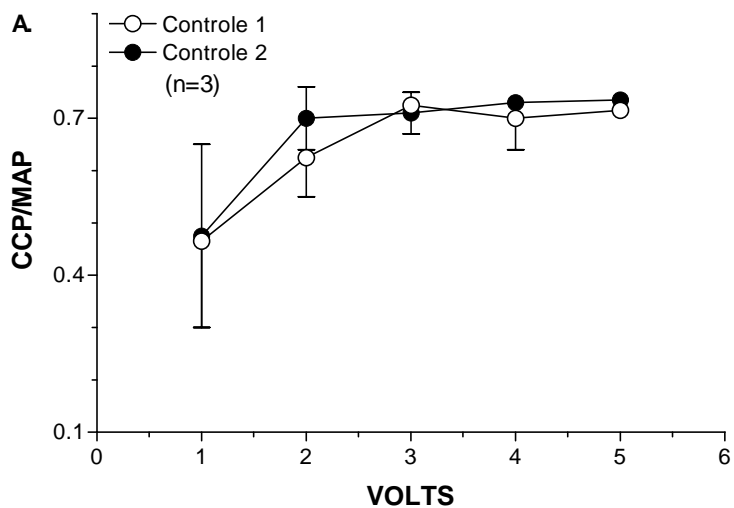


Gráfico 1 - Efeito da estimulação elétrica do GPM na PIC/PAM. (A) e (B): após um seqüência estimulatória inicial (○), foi aguardado um período adicional de 10 min, e, posteriormente, foi realizado uma segunda seqüência estimulatória (●). Cada ponto representa a média±EPM.

A estimulação elétrica do GPM com frequências crescentes (3, 6, 9, 12 e 24 Hz, por 30s, aguardando 1 minuto entre as estimulações) e mantendo-se fixa a voltagem de estimulação (2 V), resultou em aumento na CCP/MAP dependente da frequência, com a resposta máxima alcançada com 12 Hz. Aguardando um período adicional de 10 minutos, uma segunda curva foi construída. Salienta-se que não existe diferença estatística entre as mesmas (Gráf. 2). Esses dados demonstram que, variando-se voltagem ou frequência de estimulação, a resposta de aumento da pressão intracavernosa é semelhante para ambos.

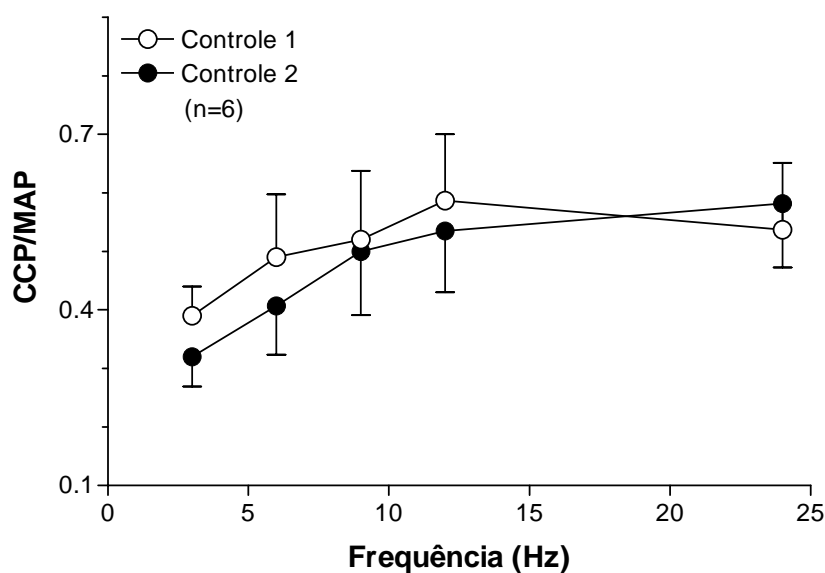


Gráfico 2 - Efeito da estimulação elétrica do GPM, com frequência crescente e mantendo-se fixa a voltagem (2 V), na CCP/MAP. Após um seqüência estimulatória inicial (○), foi aguardado um período adicional de 10 min, e, posteriormente, realizada uma segunda seqüência estimulatória (●). Cada ponto representa a média±EPM.

4.2.2 – Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida por estimulação ganglionar

Foi estudado o efeito da Ang-(1-7) na função erétil de ratos Wistar anestesiados seguindo metodologia semelhante à adotada por Mills e col. (73).

A Ang-(1-7), à dose de 15.0 pmol/Kg/min (0,5 μ L/min), foi infundida dentro do corpo cavernoso direito. Após o início da infusão da droga foi aguardado um período adicional de 3 minutos, e então a segunda seqüência estimulatória foi repetida (Fig. 12). A injeção de Ang-(1-7) produziu um aumento significativo na CCP sem alterar os valores basais de MAP (CCP/MAP média \pm EPM \rightarrow Antes: 0.17 ± 0.014 , n=10; Após Ang(1-7): 0.25 ± 0.027 , n=10; P < 0.05). De maneira importante, a Ang (1-7) potencializou o aumento da razão CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar (Gráfico 3).

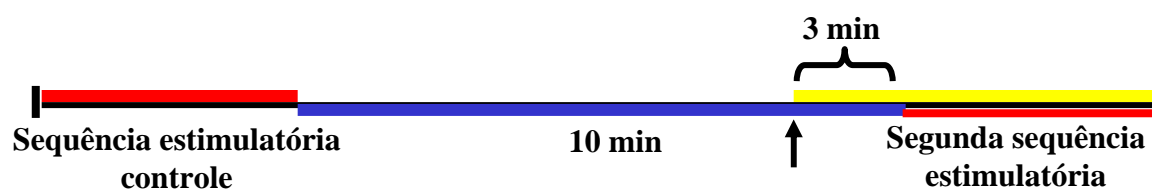


Fig. 12 – Protocolo experimental para avaliação do efeito da Ang-(1-7) e do composto AVE 0991 sobre a função erétil. Os traços representam as etapas experimentais: traço vermelha, período de estimulação ganglionar; traço amarelo, período de infusão dos compostos; traço azul, período de 10 minutos entre as duas seqüências estimulatórias. A seta representa o início da infusão dos compostos.

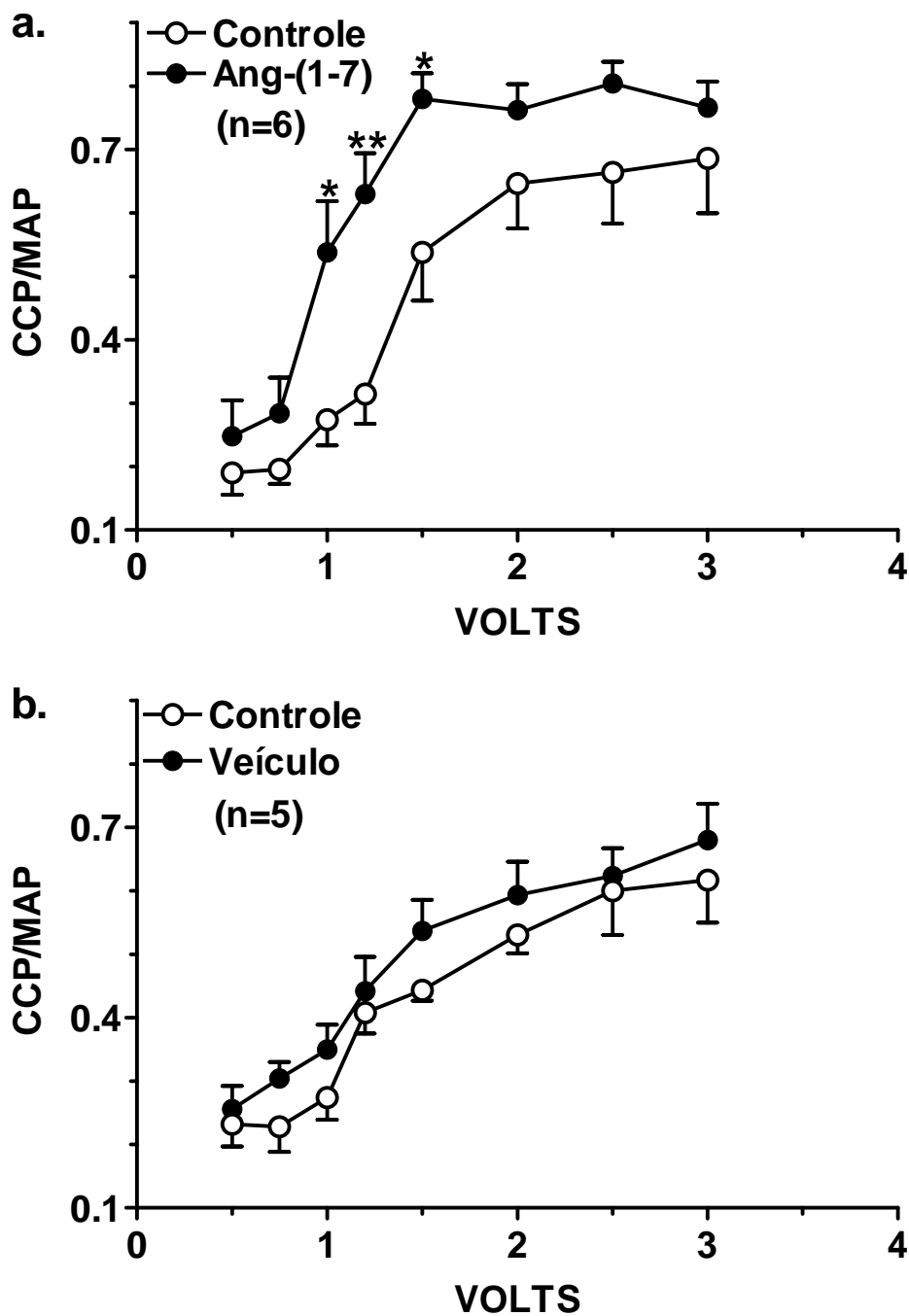


Gráfico 3 – Efeito da Ang-(1-7) na resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos. Efeito da estimulação elétrica do GPM com medidas feitas antes (○) e 3 minutos após (●) o início da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) (a) ou veículo (b). Cada ponto representa a média \pm EPM. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (two-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

4.2.3 – Papel do receptor Mas no efeito pró-erétil induzido pela Ang-(1-7)

Para avaliarmos se a resposta produzida pela Ang-(1-7) é mediada pelo receptor Mas acoplado à proteína G, uma solução contendo Ang-(1-7) e A-779 [antagonista específico para a Ang-(1-7)] (6) nas doses de 15.5 e 155 pmol/Kg/min, respectivamente, foi infundida intracavernosamente. A inibição farmacológica do receptor Mas pelo A-779 inibiu o efeito potencializador da função erétil induzido pela Ang-(1-7), sugerindo que tal efeito é mediado por este receptor (Gráfico 4).

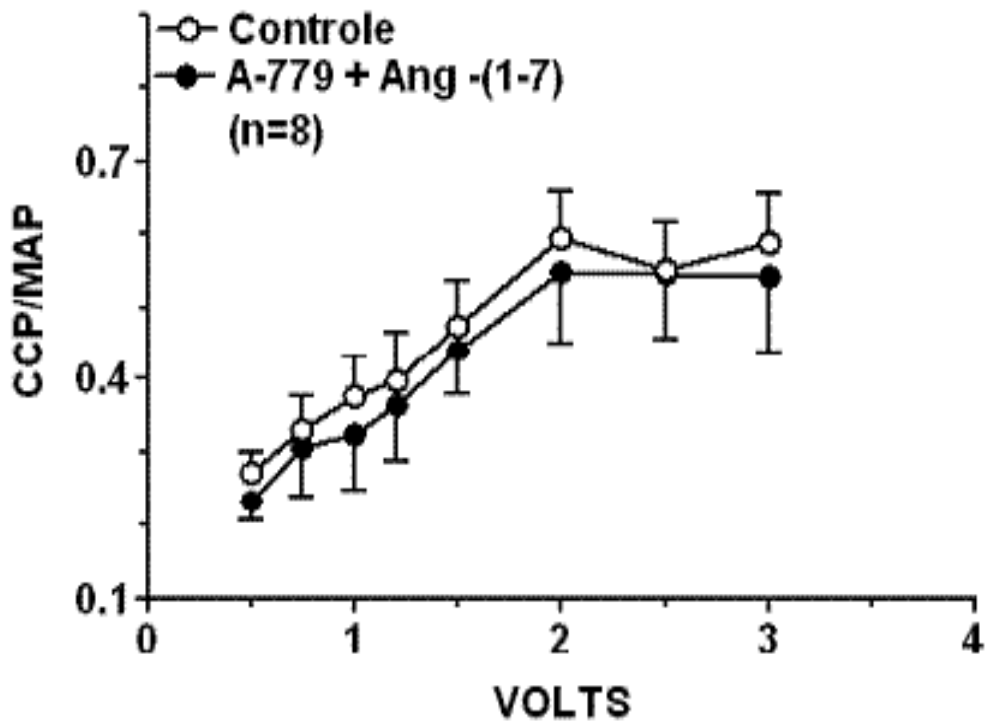


Gráfico 4 – Efeito do A-779 sobre a ação potencializadora da função erétil induzido pela Ang-(1-7). Efeito da estimulação elétrica do GPM com medidas feitas antes (o) e 3 minutos após (●) o início da co-administração intracavernosa de Ang-(1-7) e A-779 (15.5 e 155.0 pmol/Kg/min, respectivamente). Cada ponto representa a média \pm EPM.

4.2.4 – Efeito da Ang-(1-7) endógena na função erétil

Para estudarmos o efeito da Ang-(1-7) liberada endogenamente sobre a ereção peniana, o composto A-779 (155 pmol/Kg/min) foi infundido pela via intracavernosa 10 minutos após uma seqüência estimulatória controle. A infusão de A-779 (155.0 pmol/Kg/min) reduziu os valores da razão CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar com o menor valor de voltagem capaz de induzir um máximo aumento de pressão intracavernosa (Gráfico 5). Este resultado sugere que a Ang-(1-7), liberada endogenamente, participa do aumento da pressão intracavernosa induzido por estimulação elétrica do GPM.

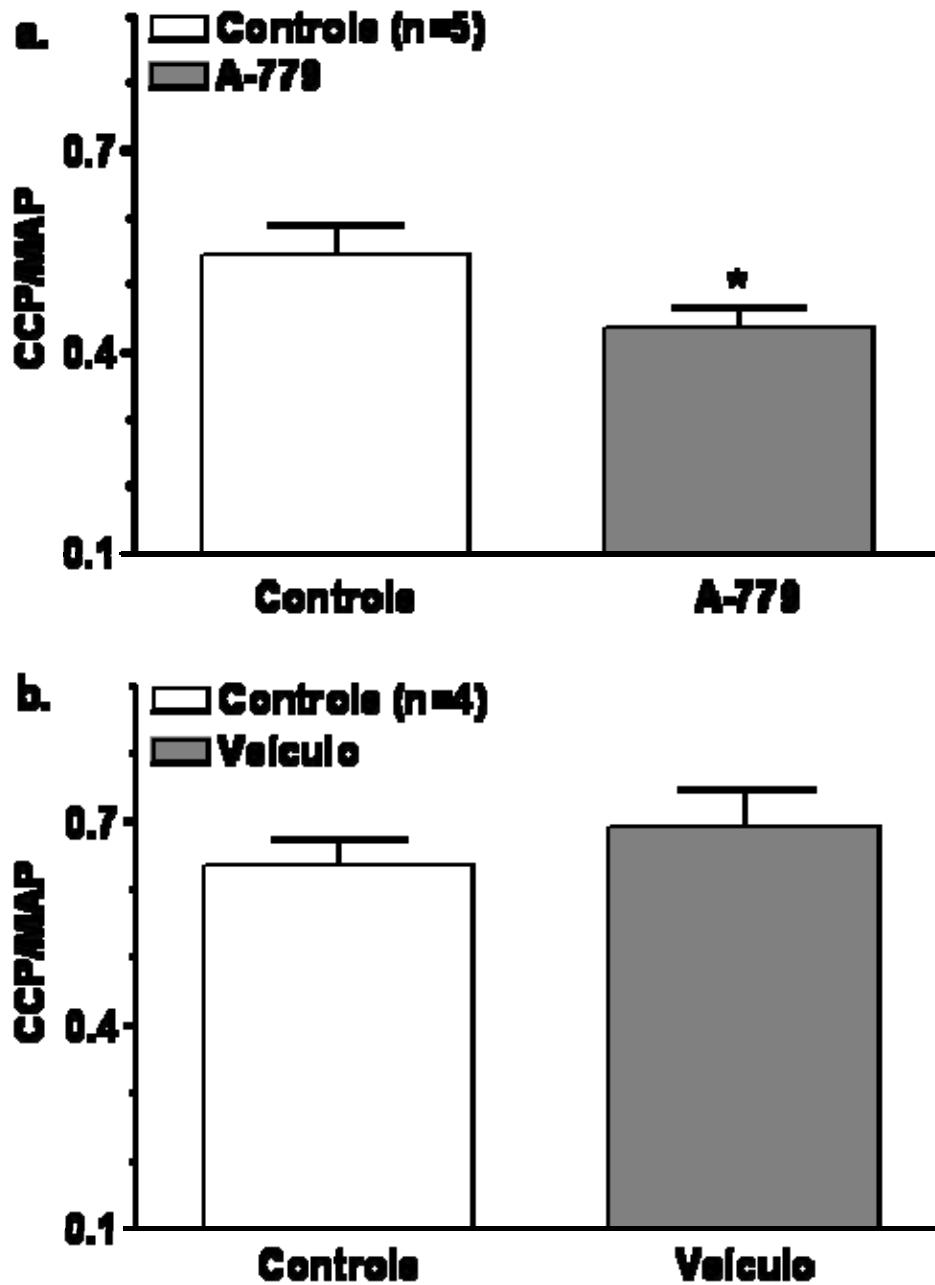


Gráfico 5 - Efeito do A-779 na resposta erétil induzida por estimulação elétrica sub-máxima do GPM. Após uma estimulação controle, o A-779 foi administrado pela via intracavernosa. Aguardado um período adicional de 3 min, a estimulação foi repetida. * $p < 0.05$ (teste *t*).

4.2.5 – Papel do NO no efeito potencializador da ereção peniana induzido pela Ang-(1-7)

Para determinar se o efeito potencializador da função erétil induzido pela Ang-(1-7) é dependente da liberação de NO, foram realizados experimentos adicionais utilizando-se um inibidor inespecífico de sintase de NO (NOS), o L-NAME. A administração de L-NAME dentro do corpo cavernoso de ratos não alterou os valores basais de CCP e MAP. Entretanto, como esperado (19), o tratamento com L-NAME atenuou significativamente o aumento da razão CCP/MAP induzido por estímulo sub-máximo do GPM (média \pm E.P.M. Contr.: 0.57 ± 0.06 versus L-NAME: 0.38 ± 0.05 ; $P < 0.05$, $n=6$). O efeito atenuador da resposta erétil induzido pela inibição da NOS não foi revertido pela Ang-(1-7), sugerindo que o NO é um importante mediador de seu efeito potencializador neste modelo experimental (Gráfico 6).

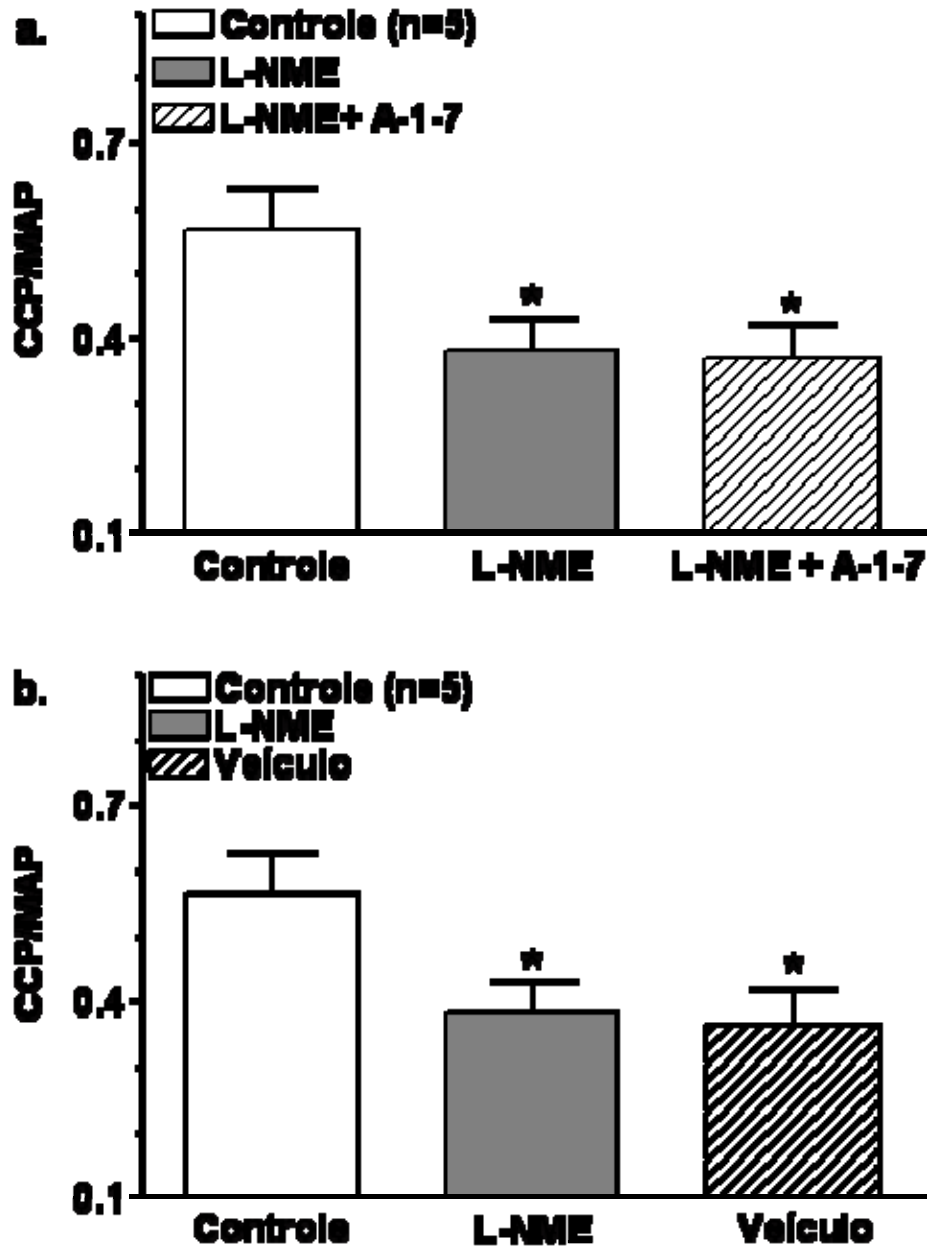


Gráfico 6 – Efeito do NO na resposta potencializadora da função erétil induzida pela Ang-(1-7). Após uma estimulação sub-máxima controle, o L-NAME (200 µg/Kg) foi administrado pela via intracavernosa. Aguardado um período adicional de 10 min, a estimulação foi repetida. Posteriormente, a Ang(1-7) (a) ou veículo (b) foram infundidos dentro do corpo cavernoso, e 5 min após a estimulação foi repetida. * $p < 0.05$ (teste *t* de Student).

4.2.6 – O composto AVE 0991 imita os efeitos da Ang-(1-7), potencializando o aumento da pressão intracavernosa induzido por estimulação ganglionar

Para determinar o efeito facilitador da ereção induzido pela ativação do receptor Mas, foi utilizado como ferramenta farmacológica o composto AVE 0991, recentemente descrito como sendo um ligante não peptídico para o receptor Mas (87).

O composto AVE potencializou, de maneira dose-dependente, o aumento da pressão intracavernosa induzido por estimulação ganglionar (Gráfico 7). De modo esperado, o efeito facilitador da ereção induzido pelo AVE foi completamente bloqueado pelo A-779 (Gráfico 8) e pelo L-NAME (gráfico 9), sugerindo que este efeito é mediado pelo receptor Mas, e dependente da liberação de NO assim como observado usando-se Ang-(1-7).

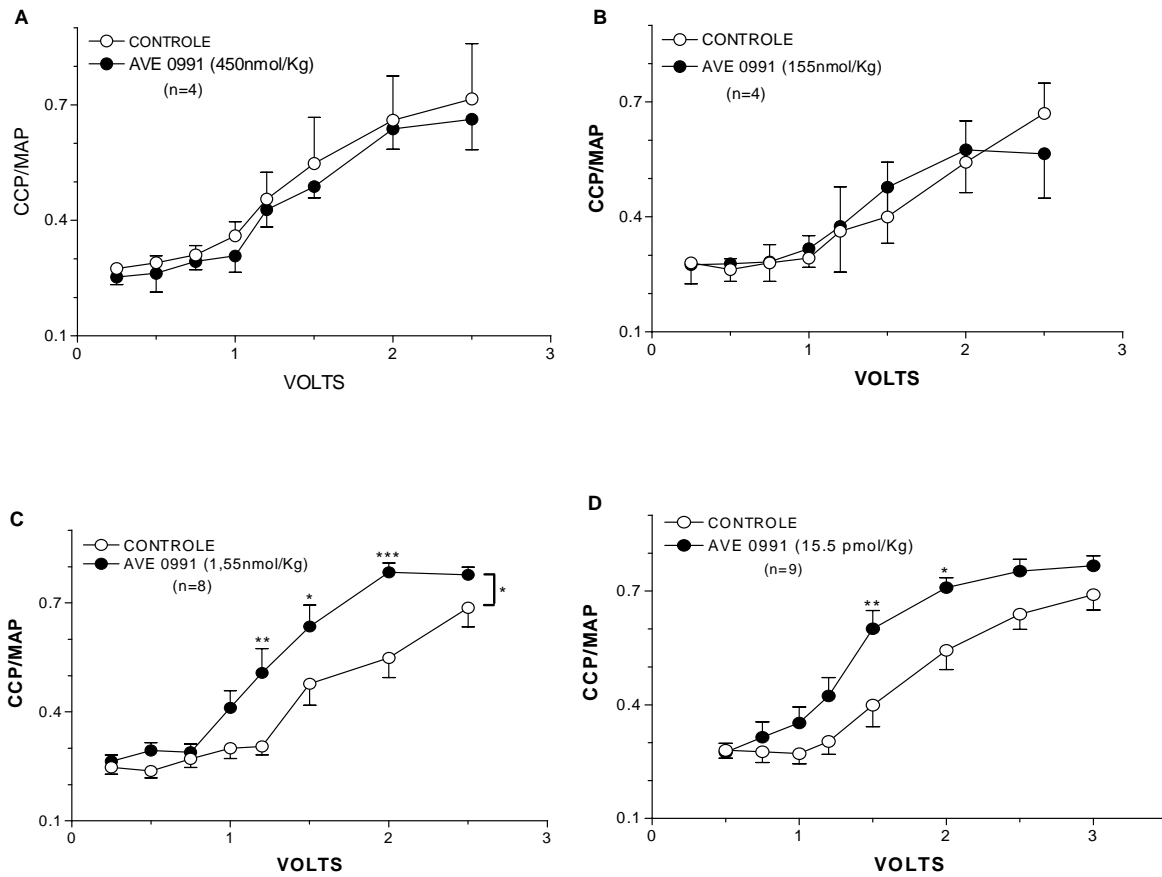


Gráfico 7 – Efeito dose-dependente do AVE 0991 na resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos. Efeito da estimulação elétrica do GPM com medidas feitas antes (o) e 3 minutos após (●) a administração intracavernosa de AVE. Cada ponto representa a média \pm EPM. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (two-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

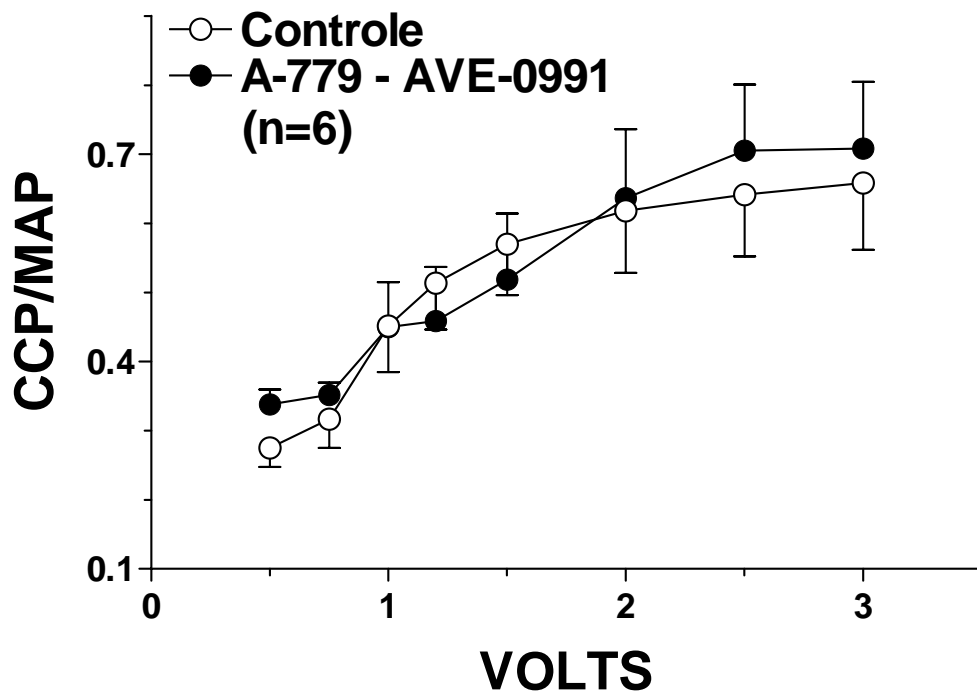


Gráfico 8 – Efeito do A-779 sobre a ação potencializadora da função erétil induzido pelo AVE 0991. Efeito da estimulação elétrica do GPM com medidas feitas antes (o) e 3 minutos após (●) o início da co-administração intracavernosa de AVE e A-779 (15.5 e 155.0 pmol/Kg/min, respectivamente). Cada ponto representa a média \pm EPM.

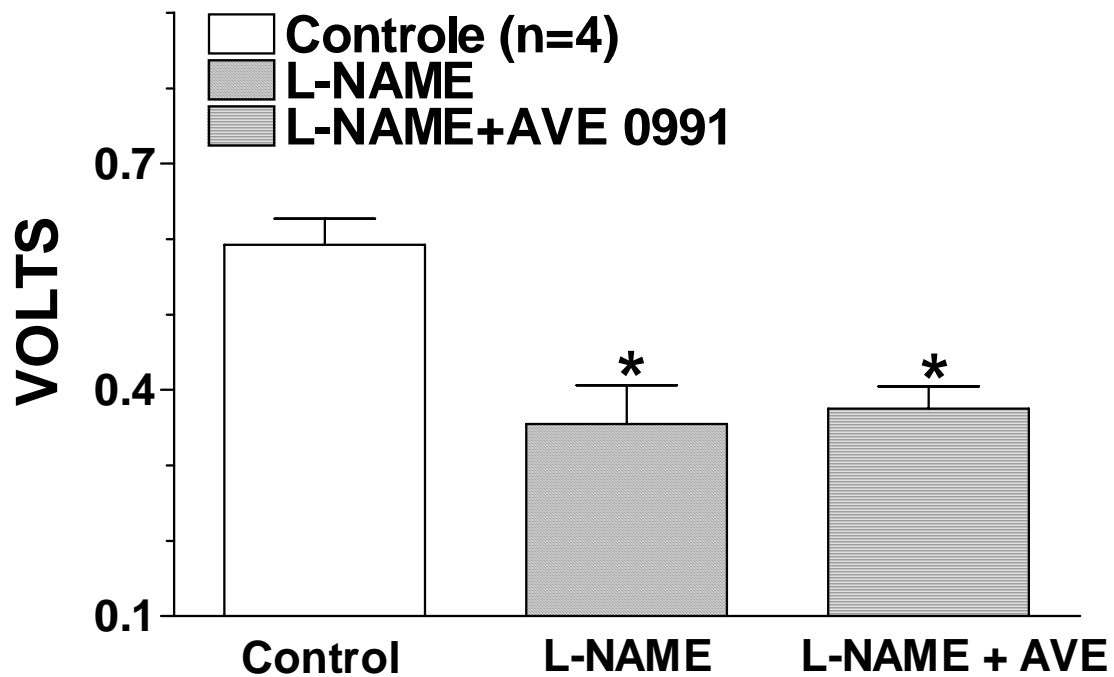


Gráfico 9 – Efeito do NO na resposta potencializadora da função erétil induzida pelo AVE 0991. Após uma estimulação sub-máxima controle, o L-NAME (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) foi administrado pela via intracavernosa. Aguardado um período adicional de 10 min, a estimulação foi repetida. Posteriormente, o AVE foi administrado dentro do corpo cavernoso, e 5 min após a estimulação foi repetida. * $p < 0.05$ (teste t de Student).

4.3 - Estudo da liberação de NO induzido pela Ang-(1-7) em tecido cavernosal de humano, rato e camundongo $Mas^{+/+}$ e $Mas^{-/-}$

Para demonstrar que a Ang-(1-7) induz liberação intracavernosa de NO, foi utilizado um marcador específico de NO [4-amino-5 metilamino-2', 7'-difluorofluoroceína diacetato (DAF-FM)] (57). Como pode ser observado, a Ang-(1-7) induziu uma liberação substancial de NO dentro dos corpos cavernosos de humanos com (H-ED) e sem (H-WED) disfunção erétil (Imagem 4 a-d), rato (Imagem 5 a-b) e camundongos WT (Imagem 6 a-b). Em contrapartida, esta liberação de NO induzida pela Ang-(1-7) encontra-se abolida em camundongos que sofreram deleção do *Mas* (Imagem 6 c-d). A estimulação elétrica do GPM com estímulo sub-máximo induziu liberação intracavernosa de NO em ratos, que foi potencializada de maneira importante pela Ang-(1-7) (Imagem 5 c-d). Estes dados demonstram que o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) é devido à direta estimulação da liberação de NO induzida por este heptapeptídeo.

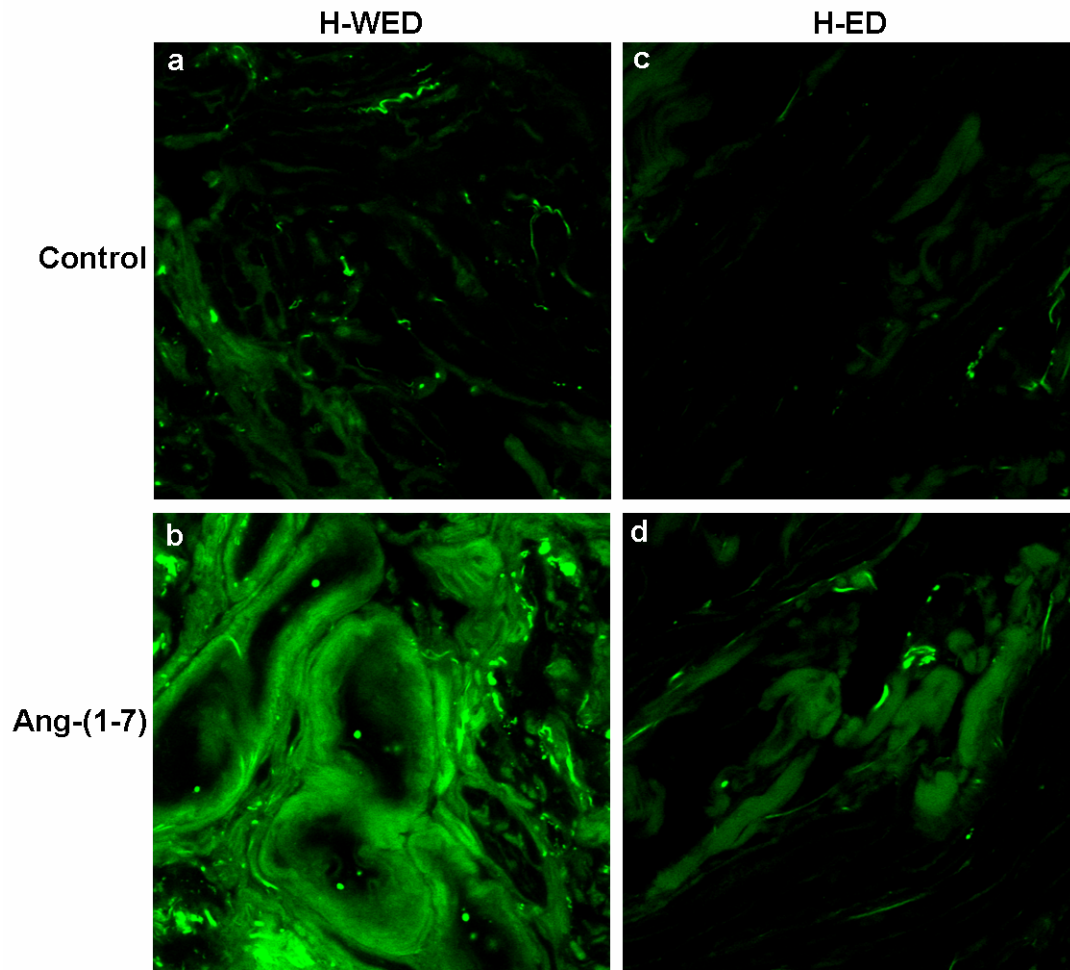


Imagem 4 – Liberação de NO em corpo cavernoso de humanos induzida pela Ang-(1-7). A Ang-(1-7) estimula a liberação de NO em tecido cavernosal de humano com **(a-b)** e sem **(c-d)** disfunção erétil. **H-WED**, corpo cavernoso de humano sem disfunção erétil; **H-ED**, corpo cavernoso de humano com disfunção erétil.

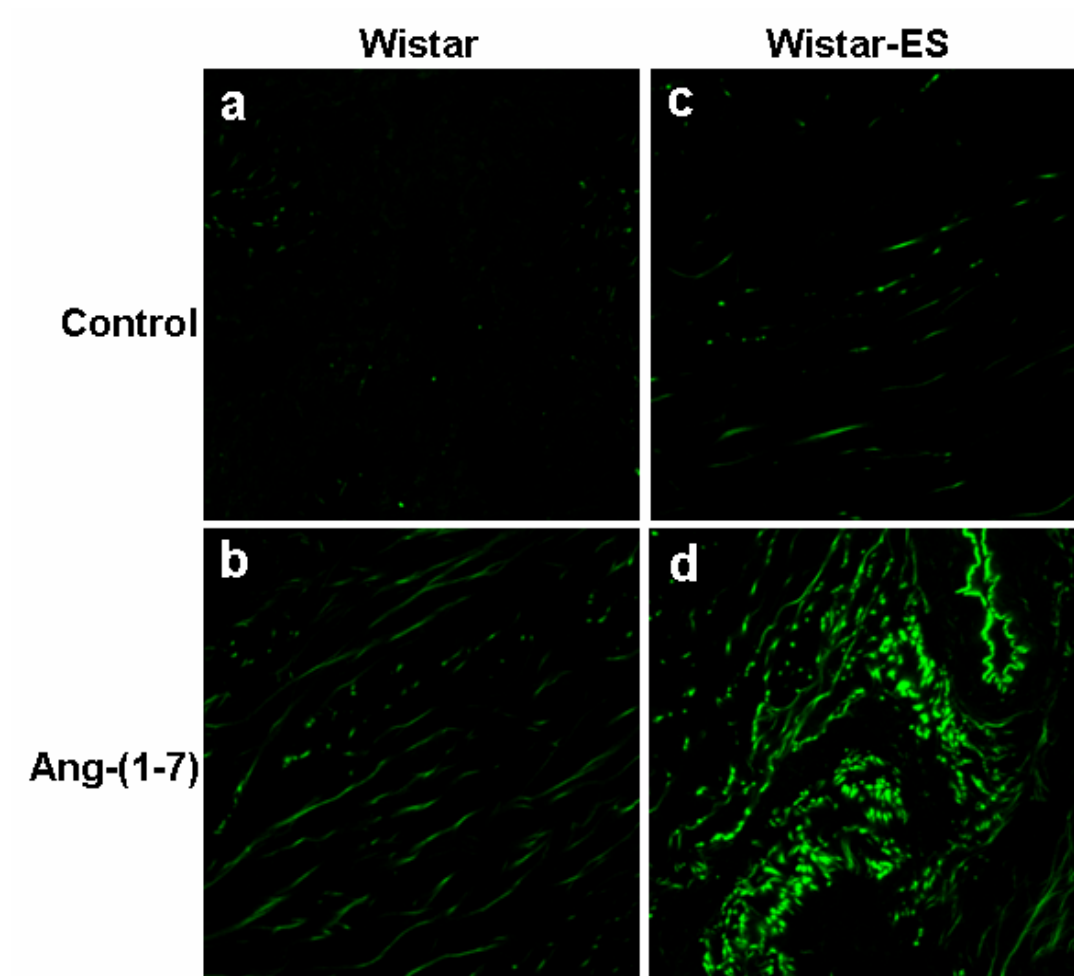


Imagem 5 – Liberação de NO em corpo cavernoso de rato induzida pela Ang-(1-7). A Ang-(1-7) estimula a liberação de NO em corpo cavernoso de ratos não estimulados (**a-b**). A estimulação do GPM com estímulo sub-máximo induziu liberação de NO, a qual foi potencializada pela Ang-(1-7) (**c-d**). **ES**, estimulação elétrica.

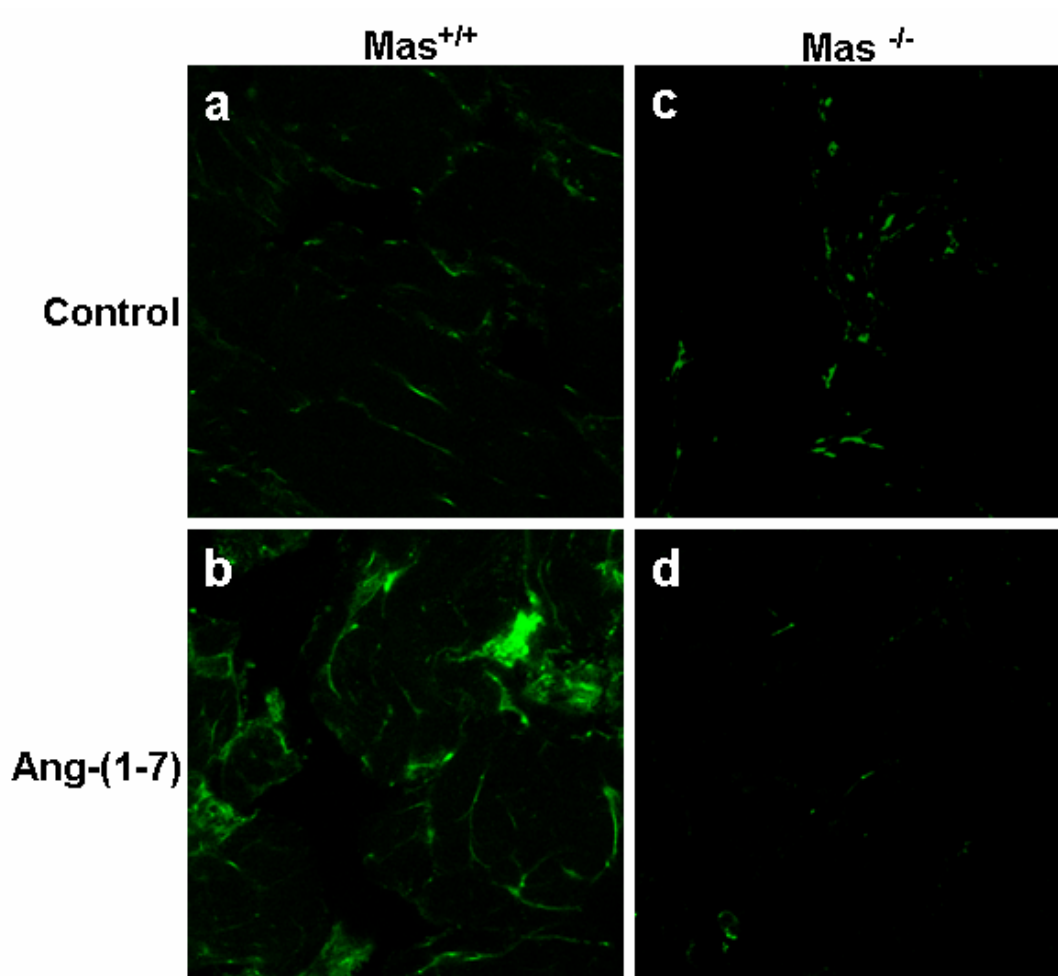


Imagem 6 – Liberação de NO em corpo cavernoso de camundongos induzida pela Ang-(1-7). A Ang-(1-7) estimula a liberação de NO em tecido cavernosal de camundongos WT (a-b) a qual encontra-se abolida em camundongos knockout para o receptor Mas (c-d). **Mas^{+/+}**, camundongos wild type; **Mas^{-/-}**, camundongos que sofreram deleção do gen que codifica a proteína Mas.

4.4 – Efeito da deleção do *Mas* na função erétil de camundongos anestesiados

Para testar a relevância fisiológica do receptor *Mas* na função erétil, foi realizado um protocolo experimental utilizando camundongos *Mas*^{-/-}. Como mostrado no gráfico 10 (a-b), a estimulação elétrica do GPM de camundongos *Mas*^{-/-} induziu um aumento da razão CCP/MAP que foi significativamente atenuada em comparação ao observado em camundongos *Mas*^{+/+}. Uma vez que a disfunção erétil destes animais pode ser subestimada pela existência de estoque de compostos nitrosos, foi confeccionada uma segunda seqüência estimulatória 10 minutos após a primeira seqüência ter sido realizada. Como pode ser observado no gráfico 10 b, a disfunção erétil tornou-se ainda mais evidente com uma segunda série de estimulação.

Para avaliarmos possíveis alterações no conteúdo de tecido fibroso em corpo cavernoso de camundongo *Mas*^{-/-} em relação ao *Mas*^{+/+}, fatias de tecido cavernosal destes animais foram coradas com tricrômio de Gomori. Como observado na imagem 10 b, a deleção do *Mas* levou a um aumento considerável no conteúdo de tecido fibroso nos corpos cavernosos penianos de animais *Mas*^{-/-}, estatisticamente maior em relação aos animais *Mas*^{+/+} (Imagem 7), o que provavelmente contribui para o comprometimento da função erétil destes animais.

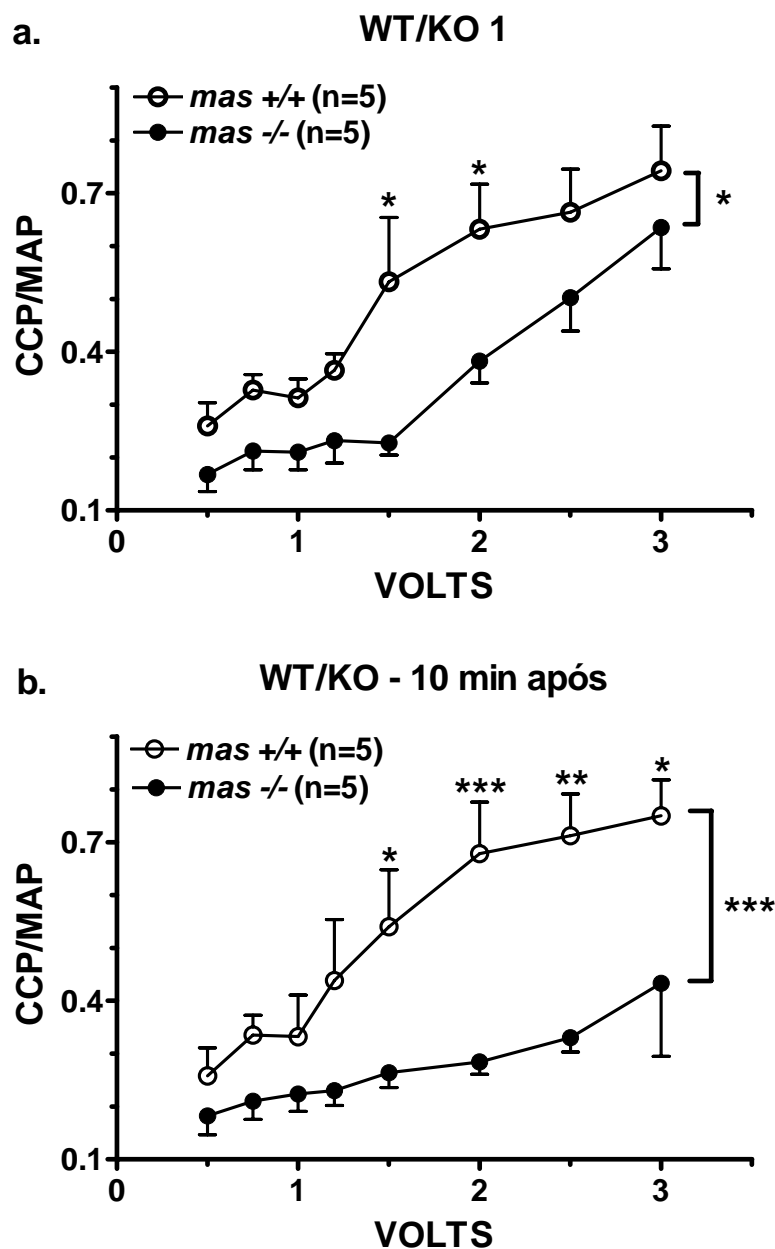


Gráfico 10 – Efeito da deleção do *Mas* na função erétil de camundongos. A estimulação elétrica ganglionar induziu um aumento voltagem-dependente da CCP/MAP que foi significativamente atenuada em animais *Mas*^{-/-} em relação aos *Mas*^{+/+} (a). Esta diferença é ainda mais evidente em uma segunda seqüência estimulatória realizada 10 min após a primeira (b). Cada ponto representa a média ± EPM. Diferença significativa em relação ao controle **p*<0.05, ***p*<0.01 e ****p*<0.001 (two-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

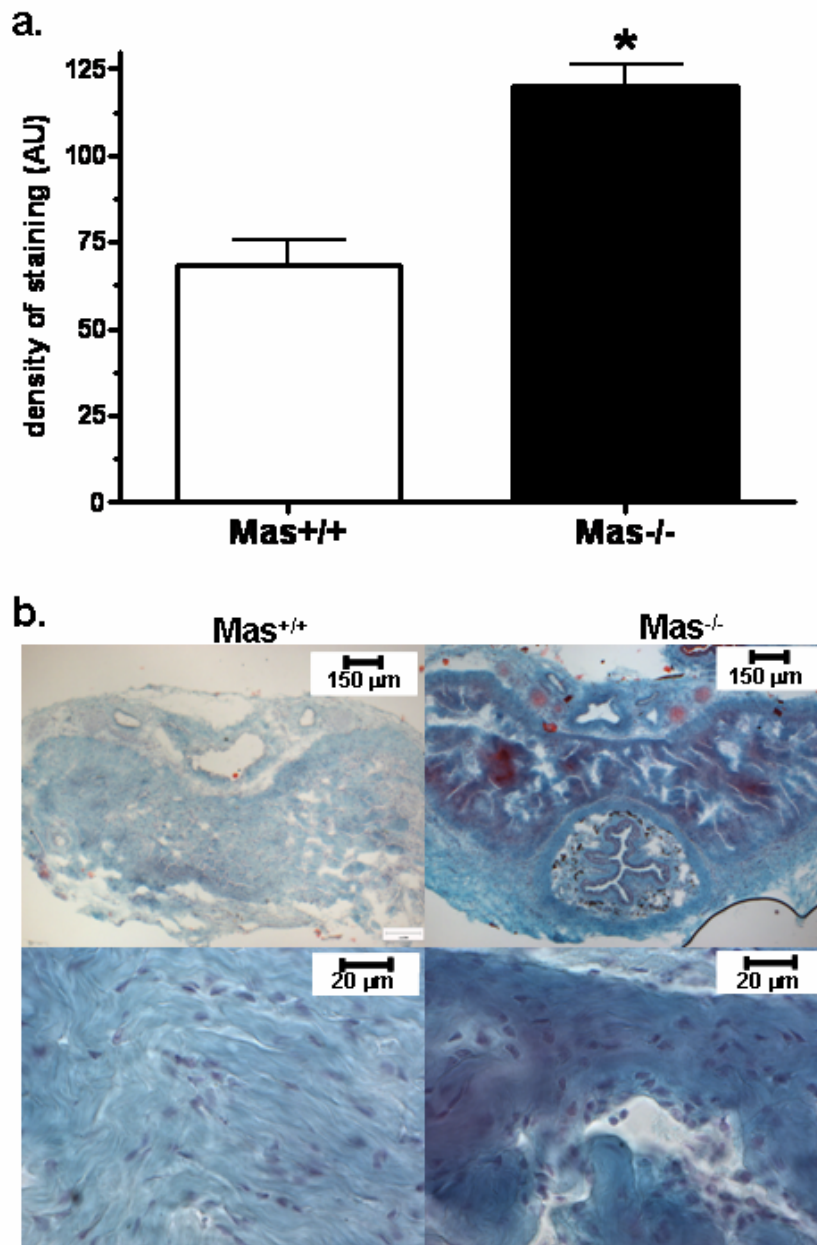


Imagem 7 – Aumento no conteúdo de tecido fibroso produzido pela deleção do *Mas*. **a.** Corpos cavernosos de camundongos Mas^{-/-} corados com tricrômio de Gomori mostraram um aumento de tecido fibroso comparado com os animais Mas^{+/+}, indicando conteúdo de fibras colágenas aumentado. **b.** Imagens representativas de corpo cavernoso de camundongos Mas^{-/-} e Mas^{+/+} corados com tricrômio de Gomori (4x – imagens superiores; 40x – imagens inferiores). Os resultados são expressos como média ± E.P.M., n=4. Teste t não pareado seguido pelo teste de Mann Whitney. *p<0.05 comparados aos camundongos Mas^{+/+} (AU, unidades arbitrárias).

4.5 – Efeito da administração intracavernosa de Ang-(1-7) em animais hipertensos DOCA-sal

Com o objetivo de testar se a Ang-(1-7) é capaz de reverter a disfunção erétil, seu efeito foi determinado em ratos hipertensos DOCA-sal (179 ± 4 mmHg vs. 116 ± 2 mmHg; $P < 0.01$), os quais apresentam disfunção erétil severa (17) e atividade suprimida do sistema renina-angiotensina (41, 113). Como esperado, os ratos hipertensos DOCA-sal apresentaram função erétil reduzida (2.5 V: $0,55 \pm 0,10$ vs. $0,30 \pm 0,06$; 3.0 V: $0,57 \pm 0,11$ vs. $0,33 \pm 0,09$, $n=8$ e 6 para Sham e DOCA, respectivamente). A administração local de Ang-(1-7) potencializou o aumento da razão CCP/MAP tanto em animais Sham-operados (Gráfico 11a) quanto em animais DOCA-sal (Gráfico 11b), normalizando a função erétil destes animais. Estes dados sugerem que o efeito potencializador da função erétil induzido pela Ang-(1-7) se deve a uma ação direta deste heptapeptídeo em seu receptor Mas, e não por inibir as ações da Ang II via receptor AT_1 .

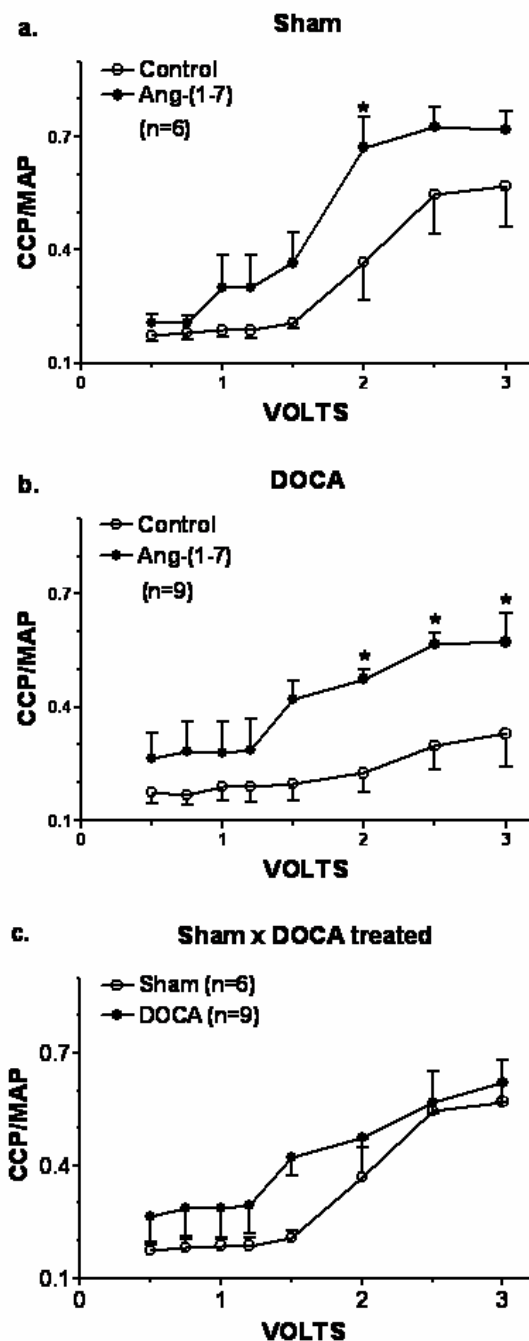


Gráfico 11 – Efeito da estimulação elétrica do GPM com medidas feitas antes (o) e após (●) a administração intracavernosa de Ang-(1-7) em animais Sham-operados (a) e DOCA-sal (b). Efeito da Ang-(1-7) na CCP/MAP de animais DOCA-sal (●) em relação à curva controle de animais Sham (o) (c). Cada ponto representa a média ± EPM. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$ (two-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

5. DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos têm sido dedicados a descreverem o papel do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) em diversos órgãos, agindo à distância e funcionando como um sistema hormonal circulante, ou localmente (ação parácrina e autócrina), uma vez que as enzimas e peptídeos os quais constituem tal sistema têm sido demonstrados em outros órgãos, além dos já classicamente descritos (33). Além disso, a complexidade do SRA fica ainda mais evidente a partir da demonstração de novos e importantes componentes além do octapeptídeo Angiotensina II (Ang II), o qual era tido como única substância biologicamente ativa, e seu receptor AT1 (97).

Tem sido descritos inúmeros receptores e enzimas que participam da via formadora e degradadora do SRA. A clonagem do DNA para o receptor AT2 da Ang II (51), a descrição da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que converte a Ang I em Ang-(1-9) (23) e forma Ang-(1-7) diretamente a partir da Ang II, e a demonstração de que o receptor Mas, outrora considerado um receptor órfão, tem como ligante endógeno a Ang-(1-7), contribuíram para alterar, definitivamente, a visão clássica do SRA, introduzindo novos conceitos com relação ao papel deste sistema em diversos sítios de ação no organismo. Peptídeos como a Ang III, Ang IV e, principalmente, a Ang-(1-7), são agora alvos de inúmeros estudos que objetivam descrever melhor suas ações (33).

Uma vez que drogas que impedem a ação ou formação da Ang II, classicamente usadas no tratamento da hipertensão, têm sido relacionadas com o favorecimento da ereção peniana, efeitos estes atribuídos ao fato de essas drogas aumentarem os níveis de Ang-(1-7), o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do eixo constituído pela Ang-(1-7) e seu receptor Mas na função erétil. Por

meio de análise imunológica, (1) foi demonstrada a presença e exata localização celular do receptor Mas no corpo cavernoso de humano e rato. Além disso, por meio de experimentos com animais anestesiados (2) foi encontrado que a administração intracavernosa de Ang-(1-7) estimula a função erétil de maneira dependente de óxido nítrico (NO), (3) processo este mediado pelo receptor Mas. (4) A dependência de NO neste processo se deve ao fato de a Ang-(1-7) estimular diretamente a liberação deste radical livre. A relevância fisiológica do eixo Ang-(1-7)-Mas foi evidenciada utilizando-se animais com deleção do gen que codifica a proteína Mas. Foi observado que (5) animais knockout para o *mas* (Mas-KO) apresentam disfunção erétil (6) acompanhada de fibrose peniana. Além disso, (7) a Ang-(1-7) reverteu completamente a disfunção erétil de animais hipertensos DOCA-sal.

O corpo cavernoso produz e secreta quantidades significativas de Ang II (7), principalmente na fase de detumescência peniana (54). Embora não tenham sido feitas dosagens específicas para outros peptídeos, Kifort e cols. (1997) demonstraram que a Ang-(1-7), além de outros peptídeos do SRA, também são liberados intracavernosamente. Tal estudo não examinou o papel destes peptídeos com relação à função erétil, podendo-se inferir que os mesmos são apenas produtos da via metabólica da Ang II. Entretanto, de maneira interessante os dados do nosso estudo demonstraram que a Ang-(1-7) desempenha um papel importante na função erétil, facilitando a resposta erétil induzida por estimulação elétrica do gânglio pélvico maior, demonstrando que seu papel vai além de um mero metabólito presente no corpo cavernoso.

Como esperado, o efeito potencializador da função erétil induzido pela Ang-(1-7) foi completamente abolido pelo bloqueio específico do receptor Mas. O protooncogen Mas foi pela vez detectado pela análise de sua atividade tumorigênica “in vivo” (47). Em mamíferos este gen é expresso principalmente no testículo e em áreas centrais distintas, incluindo hipocampo e amígdala (119), mas também pode ser detectado nos rins (95) e coração (1, 32, 96), entretanto em níveis menores. Esse gene codifica uma proteína com sete domínios transmembrana, seguidos por um segmento hidrofóbico em forma de α -hélice, com alta similaridade com o receptor de substância K, sugerindo que o mesmo é responsável por codificar um ligante de angiotensinas, provavelmente para a Ang II (46). Entretanto, a partir da síntese de um antagonista que bloqueia especificamente as ações da Ang-(1-7) (95), a descrição de que a Ang-(1-7) é um ligante para o receptor Mas (98), associado ao fato de que o bloqueio deste receptor não altera as ações da Ang II, como por exemplo, influxo de cálcio (112), indicam que o Mas é o receptor para a Ang-(1-7).

Em nosso estudo, foi observado que o efeito facilitador da função erétil induzido pela Ang-(1-7) foi completamente abolido pela co-administração de A-779, um antagonista específico da Ang-(1-7), sugerindo que tal atividade é mediado pelo receptor Mas, o que corrobora com o inúmeros achados já publicados (44, 87, 98, 112). Os dados de imunolocalização do Mas demonstram que este receptor apresenta uma distribuição difusa por todo o tecido peniano de rato e corpo cavernoso de humano. Mais precisamente, tal receptor localiza-se em células musculares lisas de corpo cavernoso de rato e humano, bem como em

células musculares lisas e endoteliais de arteríola de ratos. Como não foi utilizada nenhuma marcação específica com o intuito de diferenciar os tipos celulares que constituem o corpo cavernoso, não é possível sugerir, com estes dados, que o receptor Mas também está localizado em fibroblasto.

Walther e cols. (2005) demonstraram que a co-expressão dos receptores AT1 e Mas em células CHO-K1 reduzia a elevação da concentração de cálcio intracelular e a síntese de trifosfato de inositol, ambos induzidos pela Ang II. Tal efeito se deve ao fato de esses receptores interagirem-se de maneira a formar complexos oligoméricos, onde o receptor Mas modula as ações do AT1 (59). Além disso, foi descrito que, em concentrações micromolares, a Ang-(1-7) reduz a ligação específica da [¹²⁵I]Ang II em cultura de células musculares lisas de aorta de ratos (21). Nossos dados não são suficientes para excluir a possibilidade de a Ang-(1-7), ou seu receptor Mas, inibirem as ações da Ang II ou de seu receptor AT1 no corpo cavernoso, como descrito em outros modelos experimentais (63, 67). Entretanto, os resultados do nosso estudo sugerem inicialmente que a ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) é fundamental para o efeito facilitador da ereção peniana induzido por este heptapeptídeo.

Uma vez que a administração intracavernosa de Ang-(1-7) promoveu um efeito pró-erétil, era necessário então averiguar o papel deste heptapeptídeo, em níveis basais, bem como de seu receptor, na função erétil. Para isso, o A-779 à dose de 155 pmol/Kg foi infundido pela via intracavernosa. Foi observado que o bloqueio do Mas reduziu, de maneira significativa, o aumento da pressão intracavernosa induzido por uma voltagem em que o máximo valor da razão

CCP/MAP foi obtido, sugerindo que a Ang-(1-7), liberada endogenamente, participa do processo de vasodilatação responsável pela ereção peniana.

O mecanismo de ação envolvido no processo vasorelaxante desencadeado pela Ang-(1-7) depende do leito vascular em questão entre animais de mesma espécie ou entre espécies distintas. Na circulação de antebraço de humanos, por exemplo, a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7) é independente do NO (99). Em contrapartida, em arteríola aferente de coelho (91), leito mesentérico e quarto posterior de felino (81), esta vasodilatação é dependente de NO, mas independe da liberação de produtos da ciclooxigenase (COX). Além disso, foi demonstrado que em células de aorta de bovinos a Ang-(1-7) estimula a liberação de NO e superóxido (116). Os resultados do nosso estudo demonstraram que a inibição da NOS pelo L-NAME reduziu a resposta erétil induzida por estimulação elétrica do GPM numa voltagem em que a resposta induzida era inferior à máxima, corroborando com achados prévios (19). Neste modelo experimental, quando o gânglio pélvico maior foi estimulado com uma voltagem máxima, a resposta erétil não era alterada pelo L-NAME (dados não mostrados). Isto sugere, provavelmente, que neste nível estimulatório, outros mediadores além do NO (VIP e ACh, por exemplo) são liberados, e promovem relaxamento da musculatura lisa presente nos vasos penianos e no estroma do corpo cavernoso, suficientes para que a ereção aconteça. O efeito atenuante causado pela inibição da NOS na CCP/MAP induzida por estimulação ganglionar submáxima não foi revertido pela Ang-(1-7), sugerindo que seu efeito potencializador da função erétil é dependente da atividade da óxido nítrico sintase (NOS). A presença do receptor Mas nas

células endoteliais provavelmente está associada à ativação da eNOS como demonstrado por nosso grupo (dados não publicados). Neste estudo, foi observado que a Ang-(1-7) induz a fosforilação da eNOS em células CHO transfectadas com o Mas no sítio Ser¹¹⁷⁹.

Para avaliar se o efeito facilitador da ereção peniana induzido pela Ang-(1-7) é devido ao fato de este peptídeo estimular diretamente a liberação de NO, um marcador específico para esta espécie reativa de oxigênio, o DAF-FM diacetato, foi utilizado. O DAF-FM diacetato é uma substância fluorescente que se liga especificamente ao NO, e que atravessa a membrana celular com facilidade, devido à sua alta lipossolubilidade. Uma vez no interior da célula, o DAF-FM diacetato é esterificado por esterases intracelulares, e convertido a DAF-FM. O coeficiente de partição óleo/água deste composto não é suficiente para que ele atravesse a membrana celular, ficando aprisionado no interior da célula. Na presença de oxigênio (O₂), o DAF-FM reage como o NO, tornando-o 100 vezes mais fluorescente (58, 110). Utilizando esta técnica de detecção do NO, nós observamos que a Ang-(1-7) estimula a liberação de NO em corpo cavernoso de humano com e sem disfunção erétil, camundongos tipo selvagem (wild type, WT) e ratos anestesiados. A estimulação submáxima do gânglio pélvico maior induz uma liberação de NO dentro do corpo cavernoso de ratos anestesiados a qual foi substancialmente potencializada pela Ang-(1-7). Foi observado ainda que a liberação de NO induzida pela Ang-(1-7) está completamente abolida em corpo cavernoso de animais Mas-KO, corroborando nossos dados onde o efeito facilitador da função erétil induzido pela Ang-(1-7) foi bloqueado pelo A-779,

sugerindo novamente que as ações deste peptídeo em corpo cavernoso é mediado pelo receptor Mas. Juntos, estes achados demonstram que o efeito pró-erétil da Ang-(1-7) é devido a uma direta estimulação da liberação de NO, talvez por iduzir diretamente a fosforilação da eNOS, como demonstrado por Sampaio e cols. (2006) em endotélio humano e em células CHO transfectadas com Mas. Nossos dados confirmam ainda que a liberação de NO promovida pela Ang-(1-7) é devido à sua ligação ao Mas, uma vez que tal efeito está abolido em animais Mas-KO.

Sabe-se que grande parte do NO liberado durante a ereção é proveniente da nNOS (sintase de NO neuronal) por meio da estimulação dos nervos não adrenérgicos-não colinérgicos. É controversa a discussão em relação ao papel da nNOS e da eNOS na ereção peniana. Cashen e cols. (2002) observaram que camundongos deficientes para nNOS apresentam função erétil reduzida em resposta à estimulação elétrica do gânglio pélvico maior. O mesmo resultado não foi encontrado em camundongos deficientes para eNOS, sugerindo uma importância relativamente maior da nNOS em relação à eNOS na função erétil de camundongos (14). Em contrapartida, Burnett e cols. (1996) encontraram que tanto a ereção peniana de ratos anestesiados quanto a função do tecido erétil isolado são mantidos em camundongos deficientes para nNOS. Além disso estes animais apresentaram nível aumentado de eNOS no endotélio da vasculatura peniana bem como no endotélio sinusoidal do corpo cavernoso (43). Recentemente, foi demonstrado também que camundongos deficientes para eNOS apresentam função erétil normal. Neste trabalho foi encontrado que tanto os

animais deficientes para eNOS quanto os deficientes para nNOS apresentam função erétil normal quando submetidos à estimulação elétrica do gânglio pélvico maior. Tal achado foi associado à linhagem de camundongo utilizada no estudo: camundongos deficientes para nNOS desenvolvidos pela deleção do éxon 2 (43). De fato, foram identificadas formas residuais de nNOS, denominadas nNOS β e nNOS λ em camundongos faltando o éxon 2 (102). Diante do exposto, o papel exato da nNOS e da eNOS na vasculatura peniana não é muito bem esclarecido, sendo necessário trabalhos adicionais para o melhor entendimento deste fato. Contudo, parece que o NO proveniente da nNOS tenha importância maior no início da ereção, enquanto que o NO proveniente da eNOS seria o principal responsável pela manutenção da ereção (43) (43).

Algumas proteínas sinalizadoras incluindo proteína serina-treonina quinase, proteína tirosina quinase e fatores trocadores que regulam proteínas G, apresentam domínios que se ligam especificamente a fosfoinosítídeos trifosforilados. A enzima PI3K (fosfoinosítídeo 3 quinase), um heterodímero que apresenta uma subunidade regulatória (p85) e outra catalítica (p110), converte o lipídio ligado à membrana plasmática fosfoinosítídeo -4,5- bifosfato [PI(4,5)P₂] em fosfoinosítídeo -3,4,5- trifosfato [PI(3,4,5)P₃]. Proteínas sinalizadoras como a proteína serina-treonina quinase (Akt), também denominada proteína quinase B (PKB), acumula-se próximo à PI3K por se ligar completamente ao PI(3,4,5)P₃ (12, 103). Por conseguinte, a PI3K fosforila e estimula a subunidade catalítica da Akt, sendo esta a proteína responsável pela fosforilação de diversas outras proteínas, inclusive a NOS (34). Dimmler e cols. (1999) demonstraram que a estimulação da

via PI3K/Akt pelo estresse de cisalhamento (shear stress) resulta em fosforilação da eNOS aumentando, conseqüentemente, a atividade desta enzima independentemente da concentração de cálcio, embora uma baixa concentração deste íon seja essencial para a atividade enzimática da NOS (27). Dados não publicados em nosso laboratório mostram que a Ang-(1-7) induz liberação de NO por estimular a fosforilação da eNOS no aminoácido Serina 1179, ativando tal enzima. Este processo acontece de maneira independente do aumento da concentração de cálcio, e se dá pela ativação da via PI3 quinase/Akt. Nossos dados não confirmam a participação desta via no processo de estimulação da liberação de NO induzido pela Ang-(1-7), entretanto talvez seja este o mecanismo pelo qual a Ang-(1-7) realiza suas ações.

Para comprovar os efeitos sobre a função erétil em virtude da estimulação do receptor Mas, foi utilizado como ferramenta farmacológica para isso o composto AVE 0991, o qual imita as ações da Ang-(1-7). Foram avaliadas as ações deste composto quando administrado pela via intracavernosa em ratos anestesiados. Os resultados mostram que este composto promove potencialização da razão CCP/MAP induzida pela estimulação elétrica do GPM nas doses de 1.55 nmol/Kg e 15.5 pmol/Kg. Doses maiores foram testadas (150 e 450 nmol/Kg), entretanto o mesmo efeito não foi observado, caracterizando a ação deste composto como sendo dose-dependente. O efeito potencializador do AVE 0991 foi completamente abolido pela administração simultânea ou prévia de A-779 e L-NAME, respectivamente, sugerindo uma provável estimulação do receptor Mas sensível à Ang-(1-7), e dependência do NO.

Wiemer e cols. (2002) utilizando células endoteliais de aorta de bovino mostraram que o AVE 0991 induziu a liberação de NO e O⁻ (ânion superóxido), com um pico máximo de liberação alcançado 20 e 30 segundos, respectivamente, após a exposição das células à droga. Neste mesmo trabalho foi observado que a liberação de NO induzida pelo AVE foi reduzida (≈50% de inibição) pelo [D-Ala⁷]-Ang-(1-7), um antagonista do receptor para Ang-(1-7) (116). Santos e cols. (2003) demonstraram que a ligação de ¹²⁵I-Ang-(1-7) em células CHO transfectadas com o receptor Mas não foi alterada pelo CV 11974, antagonista de receptor AT₁, nem pelo PD123319, antagonista de receptor AT₂, excluindo a ligação da Ang-(1-7) aos respectivos receptores. Corroborando este achado, Pinheiro e cols. (2004), usando estudo de ligação de radioligantes e estudos funcionais em camundongos knockout e transgênicos para o receptor Mas, demonstraram que o AVE é um agonista para o Mas, mimetizando os efeitos da Ang-(1-7). Foi observado que o AVE produziu uma significativa redução do volume urinário, associado com um aumento da osmolaridade urinária de animais C57BL/6 submetidos a sobrecarga hídrica. Este efeito foi bloqueado pelo A-779 e não foi observado nos animais knockout para o Mas. Além disso, o AVE deslocou a ligação específica de ¹²⁵I-Ang-(1-7) em tiras de rim de camundongos C57BL/6, enquanto nenhum efeito foi observado na ligação de ¹²⁵I-Angiotenina II e ¹²⁵I-Angiotenina IV (87). Em nosso estudo, o efeito potencializador da função erétil observado pelo AVE foi completamente bloqueado pelo A-779, sugerindo a ligação desses compostos a um receptor específico, sensível à Ang-(1-7). Entretanto, não foi avaliada a ação do mesmo na presença de antagonistas para o receptor AT₂, o que impede

descartar a possibilidade deste receptor estar envolvido nas ações do AVE 0991, apesar de o A-779 bloquear completamente seu efeito pró-erétil.

O remodelamento vascular está associado a diversas patologias como hipertensão, diabetes, aterosclerose e hipercolesterolemia, bem como em situações fisiológicas relacionadas ao processo de envelhecimento. Nestas condições parece haver alterações no balanço entre os fatores contráteis e relaxantes, resultando em mudanças circulatórias e estruturais inclusive nos tecidos penianos, culminando com insuficiência arterial e defeito no relaxamento muscular (42). Tais alterações resultam em espessamento da camada média com concomitante redução do lúmen arteríolar, com impacto deletério na função erétil. As ações mitogênicas da Ang II podem apresentar um importante papel na proliferação vascular, uma vez que a inibição de sua formação ou atividade atenua, por exemplo, a formação neointimal após injúria provocada por balão em artéria de ratos (89). Hale e cols. (2001) mostraram que o Enalapril, um inibidor de enzima conversora de angiotensina (ACE), e não a Hidralazina, promoveu uma regressão da estrutura vascular peniana em aproximadamente 12%, bem como uma redução da resistência vascular, ou seja, o efeito antiproliferativo observado foi decorrente da redução das ações da Ang II e não pelo fato de se reduzir a pressão arterial, uma vez que o mesmo efeito não foi observado com a administração de um agente antidiurético (40). Embora o papel da Ang II na patogênese da disfunção erétil relacionada com a idade não esteja ainda completamente elucidado, acredita-se que ela seja importante neste processo. Park et al. (2005) demonstrou que animais com 18 meses de idade (aged rats)

apresentaram resposta erétil reduzida à apomorfina em relação aos animais com 3 meses de idade (young rats), e que o losartan (antagonista de receptor AT₁) melhorou esta resposta. Além disso, foi observado que animais com 18 meses de idade apresentam expressão reduzida de eNOS em aproximadamente 71% em relação ao controle jovem, o que foi restaurado após 4 semanas de tratamento com o losartan (84). Diversos trabalhos têm demonstrado as ações antiproliferativas e antitrombóticas da Ang-(1-7) em contraposição às ações da Ang II (61, 108, 111). Sendo assim, a Ang-(1-7) poderia, além de potencializar a resposta erétil, antagonizar as ações proliferativas e hipertróficas da Ang II no leito vascular peniano, evitando, assim, os eventos vasculares associados a determinadas patologias ou decorrentes do envelhecimento, e com isso facilitar o fluxo sanguíneo em direção ao pênis.

De fato foi descrito que a Ang-(1-7) apresenta atividade anti-proliferativa e anti-hipertrófica, creditadas a sua ligação ao Mas. Iwata e cols. (2005) demonstraram que a incorporação de [³H]-Prolina e [³H]-Leucina por fibroblastos cardíacos estimulados pela Ang II foi inibido pela Ang-(1-7). Este fato talvez sugira que a Ang-(1-7) seja um antagonista de receptor AT₁. Entretanto, os estudos de ligação mostraram que a ligação específica de ¹²⁵Ang-(1-7) não foi alterada pela Ang II. Em contrapartida, tal ligação foi deslocada pelo A-779, sugerindo que o efeito anti-fibrótico da Ang-(1-7) é mediado pelo Mas (44). Tallant e cols. (2005) demonstraram que a Ang-(1-7) inibe o crescimento de miócitos cardíacos pela ativação do Mas. Foi observado que a Ang-(1-7) reduziu a incorporação de leucina marcada radioativamente, efeito este inibido pelo [D-Ala⁷]-Ang-(1-7), mas não pelo

Losartan ou PD 123319, antagonistas de receptores AT1 e AT2, respectivamente. A atividade antifibrótica da Ang-(1-7) fica ainda mais evidente a partir da observação de que camundongos Mas-KO apresentam maior expressão cardíaca de colágenos tipo I, III e fibronectina, o que interfere na funcionalidade cardíaca destes animais evidenciada pelo exame ecocardiográfico e experimentos com coração isolado “in vitro”(96).

Em nosso estudo, a atividade antifibrótica do eixo Ang-(1-7)/Mas foi demonstrada mais uma vez, em vista da observação de que animais Mas-KO apresentam conteúdo de tecido fibroso significativamente aumentado em relação aos animais WT, fato este que pode ter como conseqüência a disfunção erétil, ou colaborar para que a função erétil destes animais seja prejudicada.

Para avaliar as conseqüências da deleção do *mas* sobre a função erétil, foram realizados experimentos utilizando animais Mas-KO anestesiados, a partir da estimulação elétrica ganglionar. Foi observado que animais Mas-KO apresentaram um aumento da razão CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar significativamente menor que animais WT, demonstrando que a deleção genética do Mas resulta em disfunção erétil. Uma vez que a disfunção erétil destes animais pode ser subestimada pela presença de estoques de compostos nitrosos, foi realizada uma segunda seqüência estimulatória 10 minutos após a realização da primeira, demonstrando que a função erétil destes animais fica ainda mais comprometida numa segunda tentativa de estimular a ereção. Estes dados, associados à observação de que animais Mas-KO apresentam fibrose peniana,

sugerem que o eixo Ang-(1-7)/Mas é essencial para o processo de ereção peniana.

Com o intuito de averiguar se a Ang-(1-7) apresenta potencial terapêutico para o tratamento da disfunção erétil, foi avaliado seu efeito em animais hipertensos DOCA-sal, que sabidamente apresentam função erétil comprometida. Concordando com dados já publicados (17), nossos resultados mostraram que animais hipertensos DOCA-sal apresentam disfunção erétil severa. De maneira importante, foi observado que a Ang-(1-7) reverteu completamente o comprometimento na função erétil destes animais, sugerindo que a Ang-(1-7) apresenta um efeito terapêutico para o tratamento da disfunção erétil.

Em indivíduos com hipertensão sensível a sal, um aumento na dieta deste insumo aumenta a pressão sanguínea. Fatores como retenção de fluídos pelos rins bem como um aumento da excitação simpática iniciada centralmente podem estar envolvidos. Animais hipertensos DOCA-sal além de serem induzidos a uma dieta rica em sal, são submetidos à administração de mineralocorticóide, resultando em inúmeras alterações que incluem aumento da liberação de vasopressina (25) e na atividade simpática (79), mas em contrapartida, apresenta baixa atividade do SRA (41, 113). Isto posto, nossos dados demonstrando que a Ang-(1-7) reverteu completamente a disfunção erétil de animais hipertensos DOCA-sal, sugerem que, além de sua potencialidade terapêutica para o tratamento de tal patologia, sua atividade facilitadora da ereção peniana não se deve ao fato de ela antagonizar as ações da Ang II, mas está relacionada,

provavelmente, ao seu efeito estimulador da síntese de NO por meio de ativação da eNOS (Fig. 13).

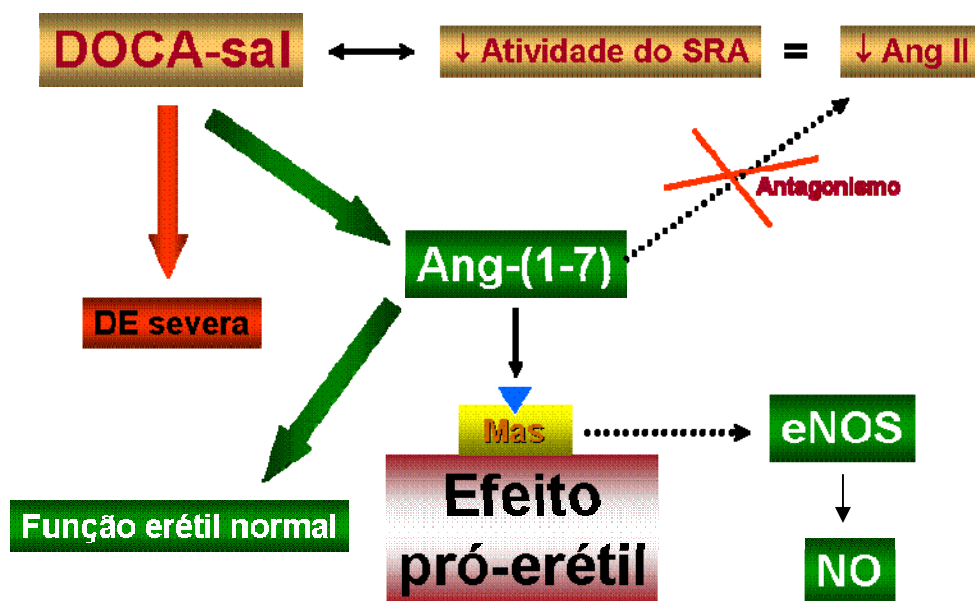


Fig. 13 – Esquema simplificado do mecanismo facilitador da ereção peniana induzido pela Ang-(1-7) em animais hipertensos DOCA-sal.

A Ang II tem sido associada com a fase de detumescência peniana (7), e drogas que reduzem sua formação ou sua ação, tais como os inibidores ECA (iECA) ou antagonistas de receptor AT1, tem sido descritos como facilitadores da ereção peniana. O Enalapril, mas não a hidralazina, induz um remodelamento estrutural da vasculatura peniana e melhora o influxo sanguíneo em direção aos corpos cavernosos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sugerindo que tal efeito está associado à inibição da ECA, e não simplesmente pela redução da pressão arterial (40). De maneira semelhante, foi observado que o Captopril

melhora a função erétil de animais idosos (28). Considerando que tanto os iECA quanto os antagonistas de receptor AT1 aumentam os níveis plasmáticos e teciduais de Ang-(1-7) (36), nós hipotetizamos que o efeito benéfico de se bloquear as ações da Ang II sobre a função erétil é mediado, principalmente, pela Ang-(1-7). Corroborando com tal hipótese, nossos dados evidenciam um novo papel dual do SRA na função erétil: um pró-detumescente mediado pelo eixo Ang II/AT1, e um outro pró-erétil mediado pelo eixo Ang-(1-7)/Mas. Sendo assim, nossos dados fornecem fortes evidências de que o eixo Ang-(1-7)/Mas apresenta um papel chave na função erétil, bem como um potencial terapêutico para o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas para o tratamento da disfunção erétil.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo foram:

- O receptor Mas está localizado em células musculares lisas de corpo cavernoso de humanos e ratos, bem como em células endoteliais e musculares lisas de arteríola de ratos;
- Ang-(1-7) potencializou o aumento da razão CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar;
- Infusão intracavernosa de A-779 atenuou o aumento da razão CCP/MAP induzido por estimulação do GPM, e aboliu o efeito potencializador induzido pela Ang-(1-7);
- O tratamento com L-NAME atenuou significativamente o aumento da razão CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar, e este efeito não foi revertido pela Ang-(1-7);
- Ang-(1-7) induziu uma liberação substancial de NO em corpo cavernoso de humano, rato e camundongos WT;
- A liberação de NO induzido pela Ang-(1-7) foi completamente abolida em camundongos Mas-knockout.
- A estimulação elétrica ganglionar induziu liberação de NO, que foi substancialmente potencializada pela Ang-(1-7);
- A estimulação ganglionar induziu um aumento de CCP/MAP em animais Mas^{-/-} significativamente menor em relação aos animais Mas^{+/+}. Essa diferença fica mais evidente em uma segunda seqüência estimulatória realizada 10 min após a primeira;

- Animais Mas^{-/-} apresentam maior conteúdo de tecido fibroso em relação aos animais Mas^{+/+}. Provavelmente este fato está associado à DE apresentada pelos animais Mas^{-/-};
- A Ang-(1-7) potencializou o aumento da CCP/MAP induzido por estimulação ganglionar em animais Sham-operados e hipertensos DOCA-sal;
- A severa DE apresentada por animais hipertensos DOCA-sal foi revertida pelo tratamento com Ang-(1-7).

Os resultados acima mencionados nos permitem concluir que:

- O eixo Ang-(1-7)/Mas é extremamente importante para a função erétil;
- Este eixo apresenta potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da DE;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alenina N, Baranova T, Smirnow E, Bader M, Lippoldt A, Patkin E, and Walther T.** Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. *J Histochem Cytochem* 50: 691-696, 2002.
2. **Andersson KE.** Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *J Urol* 170: S6-13; discussion S13-14, 2003.
3. **Andersson KE.** Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* 53: 417-450, 2001.
4. **Andersson KE and Wagner G.** Physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75: 191-236, 1995.
5. **Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, and Naylor AM.** Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol* 159: 2164-2171, 1998.
6. **Bayorh MA, Eatman D, Walton M, Socci RR, Thierry-Palmer M, and Emmett N.** 1A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides* 23: 57-64, 2002.
7. **Becker AJ, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Machtens S, Scheller F, Knapp WH, Hartmann U, and Jonas U.** Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology* 57: 193-198, 2001.

8. **Benter IF, Diz DI, and Ferrario CM.** Pressor and reflex sensitivity is altered in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin-(1-7). *Hypertension* 26: 1138-1144, 1995.
9. **Bitran D and Hull EM.** Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 11: 365-389, 1987.
10. **Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, and Hellstrom WJ.** Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl* 24: S17-37, 2003.
11. **Brosnihan KB, Li P, and Ferrario CM.** Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27: 523-528, 1996.
12. **Cantley LC.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657, 2002.
13. **Cartledge JJ, Minhas S, Eardley I, and Morrison JF.** Endothelial and neuronal-derived nitric oxide mediated relaxation of corpus cavernosal smooth muscle in a rat, in vitro, model of erectile function. *Int J Impot Res* 12: 213-221, 2000.
14. **Cashen DE, MacIntyre DE, and Martin WJ.** Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 136: 693-700, 2002.
15. **Chansel D, Vandermeersch S, Oko A, Curat C, and Ardaillou R.** Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 414: 165-175, 2001.

16. **Chappell MC, Gomez MN, Pirro NT, and Ferrario CM.** Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 35: 348-352, 2000.
17. **Chitaley K, Webb RC, Dorrance AM, and Mills TM.** Decreased penile erection in DOCA-salt and stroke prone-spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res* 13 Suppl 5: S16-20, 2001.
18. **Chitaley K, Webb RC, and Mills TM.** RhoA/Rho-kinase: a novel player in the regulation of penile erection. *Int J Impot Res* 13: 67-72, 2001.
19. **Chitaley K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, and Mills TM.** Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med* 7: 119-122, 2001.
20. **Clark JT, Smith ER, and Davidson JM.** Evidence for the modulation of sexual behavior by alpha-adrenoceptors in male rats. *Neuroendocrinology* 41: 36-43, 1985.
21. **Clark MA, Diz DI, and Tallant EA.** Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 37: 1141-1146, 2001.
22. **Cohen G, Kim M, and Ogwu V.** A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods* 67: 53-56, 1996.
23. **Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM,**

Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, and Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822-828, 2002.

24. **Dail WG, Barba V, Leyba L, and Galindo R.** Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res* 282: 109-116, 1995.

25. **de Champlain J, Bouvier M, and Drolet G.** Abnormal regulation of the sympathoadrenal system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1605-1614, 1987.

26. **De Nicola L, Blantz RC, and Gabbai FB.** Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 89: 1248-1256, 1992.

27. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.

28. **Dorrance AM, Lewis RW, and Mills TM.** Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res* 14: 494-497, 2002.

29. **Dusing R.** Sexual dysfunction in male patients with hypertension: influence of antihypertensive drugs. *Drugs* 65: 773-786, 2005.

30. **Escrig A, Gonzalez-Mora JL, and Mas M.** Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J Physiol* 516 (Pt 1): 261-269, 1999.

31. **Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, and McKinlay JB.** Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 151: 54-61, 1994.
32. **Ferrario CM.** Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 47: 515-521, 2006.
33. **Fleming I.** Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res* 98: 887-896, 2006.
34. **Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, and Sessa WC.** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601, 1999.
35. **Galindo R, Barba V, and Dail WG.** The sensory branch of the pudendal nerve is the major route for adrenergic innervation of the penis in the rat. *Anat Rec* 247: 479-485, 1997.
36. **Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, and Tallant EA.** Distinct Roles for Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) in the Regulation of Angiotensin Converting Enzyme 2 in Rat Astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005.
37. **Goazigo AR, Iturrioz X, Fassot C, Claperon C, Roques BP, and Llorens-Cortes C.** Role of angiotensin III in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 7: 128-134, 2005.
38. **Gonzalez-Cadavid NF, Burnett AL, Magee TR, Zeller CB, Vernet D, Smith N, Gitter J, and Rajfer J.** Expression of penile neuronal nitric oxide

synthase variants in the rat and mouse penile nerves. *Biol Reprod* 63: 704-714, 2000.

39. **Gorelik G, Carbini LA, and Scicli AG.** Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 403-410, 1998.

40. **Hale TM, Okabe H, Heaton JP, and Adams MA.** Antihypertensive drugs induce structural remodeling of the penile vasculature. *J Urol* 166: 739-745, 2001.

41. **Hamlyn JM and Blaustein MP.** Sodium chloride, extracellular fluid volume, and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 251: F563-575, 1986.

42. **Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, Fassler R, and Andersson KE.** Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2349-2354, 2000.

43. **Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, Snyder SH, and Burnett AL.** Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4061-4066, 2002.

44. **Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, and Greenberg BH.** Angiotensin-(1-7) Binds to Specific Receptors on Cardiac Fibroblasts to Initiate Anti-fibrotic and Anti-Trophic Effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005.

45. **Iyer SN, Ferrario CM, and Chappell MC.** Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 31: 356-361, 1998.
46. **Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, and Hanley MR.** The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335: 437-440, 1988.
47. **Jackson TR and Hanley MR.** Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibits mas/angiotensin receptor-stimulated inositol phosphate production and intracellular Ca²⁺ elevation in the 401L-C3 neuronal cell line. *FEBS Lett* 251: 27-30, 1989.
48. **Janssen BJ, Leenders PJ, and Smits JF.** Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R215-225, 2000.
49. **Jarow JP, Burnett AL, and Geringer AM.** Clinical efficacy of sildenafil citrate based on etiology and response to prior treatment. *J Urol* 162: 722-725, 1999.
50. **Juenemann KP, Lue TF, Fournier GR, Jr., and Tanagho EA.** Hemodynamics of papaverine- and phentolamine-induced penile erection. *J Urol* 136: 158-161, 1986.
51. **Kabayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, and Inagami T.** Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268: 24543-24546, 1993.

52. **Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, and Sato K.** Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49: 157-230, 1997.
53. **Keaton AK, White CR, and Berecek KH.** Captopril treatment and its withdrawal prevents impairment of endothelium-dependent responses in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 20: 847-866, 1998.
54. **Kifor I, Williams GH, Vickers MA, Sullivan MP, Jodbert P, and Dluhy RG.** Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol* 157: 1920-1925, 1997.
55. **Kim YC, Kim JH, Davies MG, Hagen PO, and Carson CC, 3rd.** Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostanoids in the rabbit corpus cavernosum. *J Urol* 153: 807-810, 1995.
56. **Kitazawa T, Masuo M, and Somlyo AP.** G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9307-9310, 1991.
57. **Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, and Nagano T.** Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: 2446-2453, 1998.
58. **Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, and Nagano T.** Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl* 38: 3209-3212, 1999.

59. **Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, and Walther T.** G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111: 1806-1813, 2005.
60. **Kubin M, Wagner G, and Fugl-Meyer AR.** Epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 15: 63-71, 2003.
61. **Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, and Buczko W.** Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 40: 774-779, 2002.
62. **le Tran Y and Forster C.** Angiotensin-(1-7) and the rat aorta: modulation by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 676-682, 1997.
63. **Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, and Santos RA.** The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 274-279, 2005.
64. **Lochard N, Thibault G, Silversides DW, Touyz RM, and Reudelhuber TL.** Chronic production of angiotensin IV in the brain leads to hypertension that is reversible with an angiotensin II AT1 receptor antagonist. *Circ Res* 94: 1451-1457, 2004.

65. **Lundberg JM.** Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 48: 113-178, 1996.
66. **Maeda N, Matsuoka N, and Yamaguchi I.** Role of the dopaminergic, serotonergic and cholinergic link in the expression of penile erection in rats. *Jpn J Pharmacol* 66: 59-66, 1994.
67. **Mahon JM, Carr RD, Nicol AK, and Henderson IW.** Angiotensin(1-7) is an antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. *J Hypertens* 12: 1377-1381, 1994.
68. **McAuley IW, Kim NN, Min K, Goldstein I, and Traish AM.** Intracavernosal sildenafil facilitates penile erection independent of the nitric oxide pathway. *J Androl* 22: 623-628, 2001.
69. **McCullough AR.** An update on the PDE-5 inhibitors (PDE-5i). *J Androl* 24: S52-58, 2003.
70. **Melis MR, Succu S, Spano MS, and Argiolas A.** Morphine injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus prevents noncontact penile erections and impairs copulation: involvement of nitric oxide. *Eur J Neurosci* 11: 1857-1864, 1999.
71. **Mills TM, Lewis RW, and Stopper VS.** Androgenic maintenance of inflow and veno-occlusion during erection in the rat. *Biol Reprod* 59: 1413-1418, 1998.
72. **Mills TM, Lewis RW, Wingard CJ, Chitale K, and Webb RC.** Inhibition of tonic contraction--a novel way to approach erectile dysfunction. *J Androl* 23: S5-9, 2002.

73. **Mills TM, Stopper VS, and Wiedmeier VT.** Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 51: 234-238, 1994.
74. **Mizusawa H, Hedlund P, Hakansson A, Alm P, and Andersson KE.** Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 132: 1333-1341, 2001.
75. **Moreira ED, Jr., Lbo CF, Diament A, Nicolosi A, and Glasser DB.** Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. *Urology* 61: 431-436, 2003.
76. **Moriguchi A, Tallant EA, Matsumura K, Reilly TM, Walton H, Ganten D, and Ferrario CM.** Opposing actions of angiotensin-(1-7) and angiotensin II in the brain of transgenic hypertensive rats. *Hypertension* 25: 1260-1265, 1995.
77. **Nakamura S, Averill DB, Chappell MC, Diz DI, Brosnihan KB, and Ferrario CM.** Angiotensin receptors contribute to blood pressure homeostasis in salt-depleted SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R164-173, 2003.
78. **Nicolosi A, Moreira ED, Jr., Shirai M, Bin Mohd Tambi MI, and Glasser DB.** Epidemiology of erectile dysfunction in four countries: cross-national study of the prevalence and correlates of erectile dysfunction. *Urology* 61: 201-206, 2003.
79. **O'Donoghuy TL and Brooks VL.** Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels. *Hypertension* 47: 680-685, 2006.

80. **Okamura T, Ayajiki K, and Toda N.** Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol* 274: H1075-1081, 1998.
81. **Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, Weaver JP, Khosla MC, and Kadowitz PJ.** Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *Eur J Pharmacol* 234: 35-42, 1993.
82. **Padma-Nathan H, Hellstrom WJ, Kaiser FE, Labasky RF, Lue TF, Nolten WE, Norwood PC, Peterson CA, Shabsigh R, and Tam PY.** Treatment of men with erectile dysfunction with transurethral alprostadil. Medicated Urethral System for Erection (MUSE) Study Group. *N Engl J Med* 336: 1-7, 1997.
83. **Paredes RG, Contreras JL, and Agmo A.** Serotonin and sexual behavior in the male rabbit. *J Neural Transm* 107: 767-777, 2000.
84. **Park JK, Kim SZ, Kim SH, Park YK, and Cho KW.** Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J Urol* 158: 653-658, 1997.
85. **Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson PB, and Persson AE.** AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int* 66: 1949-1958, 2004.
86. **Peterson CA, Bennett AH, Hellstrom WJ, Kaiser FE, Morley JE, Nemo KJ, Padma-Nathan H, Place VA, Prendergast JJ, Tam PY, Tanagho EA, Todd LK, Varady JC, and Gesundheit N.** Erectile response to transurethral alprostadil,

prazosin and alprostadil-prazosin combinations. *J Urol* 159: 1523-1527; discussion 1527-1528, 1998.

87. **Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M, Bleich M, and Santos RA.** Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 44: 490-496, 2004.

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

89. **Prescott MF, Webb RL, and Reidy MA.** Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT1 receptor antagonist. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol* 139: 1291-1296, 1991.

90. **Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, and Mills TM.** Androgenic regulation of NO availability in rat penile erection. *J Androl* 18: 110-115, 1997.

91. **Ren Y, Garvin JL, and Carretero OA.** Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 39: 799-802, 2002.

92. **Rosaria Melis M, Spano MS, Succu S, and Argiolas A.** Activation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus reduces apomorphine-, N-methyl-D-aspartic acid- and oxytocin-induced penile erection and yawning in male rats. *Neurosci Lett* 281: 127-130, 2000.

93. **Rosen RC and Kostis JB.** Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. *Am J Cardiol* 92: 9M-18M, 2003.
94. **Santos RA, Campagnole-Santos MJ, and Andrade SP.** Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 91: 45-62, 2000.
95. **Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues AR, and Gropen Junior C.** Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 35: 293-298, 1994.
96. **Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, Bader M, Alenina N, Kitten GT, and Ferreira AJ.** Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 47: 996-1002, 2006.
97. **Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, and Campagnole-Santos MJ.** Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1019-1031, 2005.
98. **Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, and Walther T.** Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8258-8263, 2003.

99. **Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, and Oshima T.** Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension* 38: 90-94, 2001.
100. **Sato Y, Christ GJ, Horita H, Adachi H, Suzuki N, and Tsukamoto T.** The effects of alterations in nitric oxide levels in the paraventricular nucleus on copulatory behavior and reflexive erections in male rats. *J Urol* 162: 2182-2185, 1999.
101. **Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, and Ferrario CM.** Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4095-4098, 1988.
102. **Silvagno F, Xia H, and Bredt DS.** Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 271: 11204-11208, 1996.
103. **Simoncini T, Rabkin E, and Liao JK.** Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 198-203, 2003.
104. **Siraki AG, Pourahmad J, Chan TS, Khan S, and O'Brien PJ.** Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 32: 2-10, 2002.
105. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-236, 1994.

106. **Somlyo AP and Somlyo AV.** Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2: 177-185, 2000.
107. **Steers WD.** Viagra--after one year. *Urology* 54: 12-17, 1999.
108. **Strawn WB, Ferrario CM, and Tallant EA.** Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension* 33: 207-211, 1999.
109. **Succu S, Spano MS, Melis MR, and Argiolas A.** Different effects of omega-conotoxin on penile erection, yawning and paraventricular nitric oxide in male rats. *Eur J Pharmacol* 359: 19-26, 1998.
110. **Suzuki N, Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Hirata Y, and Nagano T.** Orthogonality of calcium concentration and ability of 4,5-diaminofluorescein to detect NO. *J Biol Chem* 277: 47-49, 2002.
111. **Tallant EA, Diz DI, and Ferrario CM.** State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension* 34: 950-957, 1999.
112. **Tallant EA, Ferrario CM, and Gallagher PE.** Angiotensin-(1-7) Inhibits Growth of Cardiac Myocytes Through Activation of the mas Receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005.
113. **Ueno Y, Mohara O, Brosnihan KB, and Ferrario CM.** Characteristics of hormonal and neurogenic mechanisms of deoxycorticosterone-induced hypertension. *Hypertension* 11: 1172-1177, 1988.

114. **Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, and Bader M.** Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 273: 11867-11873, 1998.
115. **Welches WR, Brosnihan KB, and Ferrario CM.** A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* 52: 1461-1480, 1993.
116. **Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, and Heitsch H.** AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 40: 847-852, 2002.
117. **Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, and Skottner A.** New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res* 42: 393-420, 2000.
118. **Yanagimoto M, Honda K, Goto Y, and Negoro H.** Afferents originating from the dorsal penile nerve excite oxytocin cells in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 733: 292-296, 1996.
119. **Young D, O'Neill K, Jessell T, and Wigler M.** Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5339-5342, 1988.