

**ADRIANO FREGONESI**

Este exemplar corresponde a versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia do Médico, **ADRIANO FREGONESI, RA:840024**.  
Campinas, 26 de junho de 2002.

  
Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Júnior - Orientador

---

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO RELAXAMENTO DA  
MUSCULATURA LISA DO CORPO CAVERNOSO HUMANO  
ISOLADO INDUZIDO POR CININAS**

---

**Tese de Doutorado**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. NELSON RODRIGUES NETTO JR.**  
**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RONILSON MORENO**

**UNICAMP  
2002**

12.000.400.469

**ADRIANO FREGONESI**

---

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO RELAXAMENTO DA  
MUSCULATURA LISA DO CORPO CAVERNOSO HUMANO  
ISOLADO INDUZIDO POR CININAS**

---

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia, área de Cirurgia

**ORIENTADOR: Prof. Dr. NELSON RODRIGUES NETTO JR.  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RONILSON MORENO**

**UNICAMP  
2002**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	F881c
V	EX
TOMBO BC/	56716
PROC.	16/117/04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	19/01/2004
Nº CPD	

CM00192981-B

BIBID. 309598

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

F881c

Fregonesi, Adriano

Caracterização farmacológica do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano isolado induzido por cininas / Adriano Fregonesi. Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Nelson Rodrigues Netto Júnior, Ronilson Moreno

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ereção Peniana 2. Músculo Liso 3. Cininas I. Nelson Rodrigues Netto Júnior. II. Ronilson Moreno. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

---

## Banca examinadora da Tese Doutorado

---

---

Orientador: Prof. Dr. NELSON RODRIGUES NETTO JÚNIOR

---


---

### Membros:

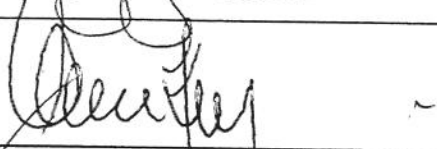
---

1- Nelson Rodrigues Netto Jr

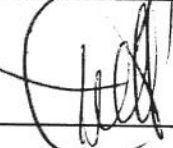
2- 

3- 

4- 

5- 

6- 

7- 

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 26/06/2002

---



## **Dedico esta tese...**

Aos meus pais, Maria Luiza e Marino  
pelo amor e dedicação

Aos meus irmãos, Mônica, Rogério, Ricardo e Giovani,  
pelo carinho e união

Aos doadores de órgãos para transplante e suas famílias,  
Pelo altruísmo e amor ao próximo

# Agradecimentos

---

- Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Neto Jr., orientador, amigo e conselheiro. Principal incentivador para o meu desenvolvimento científico.
- Ao Prof. Dr. Ronilson Moreno, orientador e uma das principais pessoas na concretização do elo entre o Departamento de Farmacologia, Disciplina de Urologia e organização para procura de órgãos da Unicamp.
- Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela confiança que depositou na união do Departamento de Farmacologia e a Disciplina de Urologia para que trabalhos como este pudessem se tornar realidade.
- Ao Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira e Prof. Edson Antunes, mentores deste trabalho.
- À enfermeira Lucia Maria Rocha de Oliveira, pela ajuda inestimável na elaboração desta tese.
- À Sra. Sueli Chaves, pelo carinho, atenção e presteza dedicada na correção das normas desta tese.
- À Sra. Isabel, pela revisão ortográfica.
- Ao Sr. Alexandre da Silva e Maria do Rosário Zullo, pela organização e editoração deste trabalho.
- À LIBBS FARMACÊUTICA LTDA, autorizando a utilização das Figuras 4 e 6.

# Sumário

---

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução.....	15
1.1. Epidemiologia .....	15
1.2. Anatomia Peniana .....	18
1.2.1. Morfometria.....	18
1.2.2. Sistema Arterial .....	20
1.2.3. Sistema Venoso.....	22
1.2.4. Histologia .....	22
1.2.5. Sistema Linfático .....	23
1.2.6. Inervação .....	23
1.3. Hemodinâmica da Ereção.....	26
1.4. Mecanismos moleculares na regulação da contratilidade da musculatura lisa do corpo cavernoso .....	28
1.4.1. Contração da musculatura .....	29
2. Objetivo.....	58
2.1. Objetivo .....	58
3. Sujeitos e Métodos .....	59
3.1. Drogas.....	62
3.2. Análise Estatística.....	62
4. Resultados .....	63
4.1. Efeito do antagonista do receptor de cinina B2 Hoe 140 .....	63
4.2. Envolvimento do óxido nítrico no relaxamento dos segmentos de corpos cavernosos mediado por cininas .....	65
5. Discussão .....	69
6. Conclusão.....	77
7. Referências Bibliográficas .....	78
8. Bibliografia de Normatizações .....	99

# **Símbolos, Siglas e Abreviaturas**

<b>ACE</b>	Enzima Conversora de Angiotensina
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AMPc</b>	Adenosina Monosfato Cíclico
<b>AT1</b>	Receptor de Angiotensina 1
<b>AT2</b>	Receptor de Angiotensina 2
<b>AT3</b>	Receptor de Angiotensina 3
<b>AT4</b>	Receptor de Angiotensina 4
<b>B<sub>2</sub></b>	Receptor de Bradicinina B2
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Íon Cálcio
<b>CCH</b>	Corpo Cavernoso Humano
<b>CGKI</b>	Proteína quinase GI
<b>CGKII</b>	Proteína quinase GII
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>DE</b>	Disfunção Erétil
<b>ECA</b>	Enzima Conversora de Angiotensina

<b>EDRF</b>	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
<b>ET</b>	Endotelina
<b>ET1</b>	Receptor de Endotelina 1
<b>ET2</b>	Receptor de Endotelina 2
<b>ET3</b>	Receptor de Endotelina 3
<b>FRDE</b>	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
<b>G</b>	Proteína G
<b>GMPc</b>	Guanosina Monofosfato Cíclico
<b>GTN</b>	Gliceril Trinitrato
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato
<b>HCC</b>	Corpo Cavernoso Humano
<b>HK</b>	Cininogênio de Alto Peso Molecular
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzida
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol Trifosfato
<b>K II</b>	ACE – Cininase II – Enzima Conversora de Angiotensina
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon Potássio
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>L-BK</b>	Lys - Bradicinina
<b>L-NAME</b>	N <sup>w</sup> - Nitro – L-Arginina Metil Éster
<b>LK</b>	Cininogênio de Baixo Peso Molecular
<b>Lys-Bk</b>	Lys-Bradicinina
<b>M1</b>	Receptor Muscarínico 1
<b>M2</b>	Receptor Muscarínico 2
<b>M3</b>	Receptor Muscarínico 3

<b>M4</b>	Receptor Muscarínico 4
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>ML-BK</b>	Met-Lys- bradicinina
<b>Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup></b>	Íon Sódio/ Íon Cálcio
<b>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup></b>	Íon Sódio/ Íon Hidrogênio
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b>	Íon Sódio/ Íon Potássio
<b>NANC</b>	Não-Adrenérgico e Não-Colinérgico
<b>nNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>ODQ</b>	1H – [1,2,4] oxadiazolo [4,3,-alquinoxalin –1–one]
<b>PD3</b>	Fosfodiesterase 3
<b>PD5A</b>	Fosfodiesterase 5A
<b>PD5A1</b>	Fosfodiesterase 5A1
<b>PD5A2</b>	Fosfodiesterase 5A2
<b>PD5A3</b>	Fosfodiesterase 5A3
<b>PGRC</b>	Polipeptídeo Gene-Relacionado de Calcitonina
<b>PKA</b>	Proteína cinase A
<b>Pro-Phe</b>	Prolina-Fenilalanina
<b>RNA</b>	Ácido Ribocucleico
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>VIP</b>	Polipeptídeo Vasointestinal

# Resumo

---

**Objetivo:** Caracterizar o subtipo de receptor para cinina envolvido no relaxamento de corpo cavernoso humano induzido por bradicinina (BK), Lys-bradicinina (Lys-BK), Met-Lys-bradicinina (Met-Lys-BK) e des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (des-Arg<sup>9</sup>-BK) e investigar se o relaxamento do corpo cavernoso humano induzido por cininas é devido à estimulação de nervos não-adrenérgicos e não colinérgicos que suprem o tecido cavernoso. **Material e Métodos:** Tecido cavernoso humano proveniente de doadores cadáveres de múltiplos órgãos para transplante foram retirados e imediatamente colocados em solução de krebs e mantido à 4°C até a utilização (nunca excedendo 24 horas após a remoção). O tecido foi cortado em fragmentos de aproximadamente 2cm, colocados em suspensão em sistema de cascata e superfundidos com solução de krebs oxigenada e morna a cinco litros por minuto. Após equilíbrio do fragmento em cascata por aproximadamente 90 minutos, noradrenalina (3µmol/L) foi infundida para indução de contração submáxima dos fragmentos de corpo cavernoso humano (CCH). A liberação de produtos da ciclooxigenase foi prevenida pela infusão de indometacina (6µmol/L). Os fragmentos de CCH foram calibrados injetando em *bolus* o nitrovasodilatador

gliceril trinitrato (GTN) e a sensibilidade dos tecidos foi ajustada eletronicamente. Os agonistas (cininas, histamina e acetilcolina) foram injetados como simples bolus (acima de 100µL) e o relaxamento dos fragmentos de CCH foram expressos como uma percentagem de relaxamento submáximo induzido por GTN.

**Resultados:** Bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina relaxaram de maneira significativa os fragmentos de CCH; em base molar, não houve diferença estatisticamente significativa entre os graus de relaxamento induzido por estes peptídeos. O agonista de receptor B1 de cininas des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina não teve efeito sobre os fragmentos de CCH. A infusão do antagonista de receptor B2 de cininas HOE 140 (50mmol/L) aboliu o relaxamento induzido pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina sem afetar aqueles induzidos por acetilcolina e histamina. A infusão do inibidor de óxido nítrico sintase Nw-nitro-L-Arginina metil éster aumentou os tónus dos fragmentos de CCH e reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido por BK (74%), Lys-BK (90%), Met-Lys-BK (87%) e acetilcolina (89%) sem afetar aqueles induzidos por GTN. A infusão subsequente de L-arginina (300µmol/L) reverteu parcialmente a hipertonicidade e restaurou significativamente ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido por BK, Lys-BK e Met-Lys-BK. Os resultados foram similares com o inibidor de guanilato ciclase 1H-[1,2,4] oxadiolo [4,3,-alquinoxalin-1-one] que reduziu em mais de 95% ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido por BK, Lys-BK, Met-Lys-BK, acetilcolina e GTN. A infusão do bloqueador de canal de sódio tetrodotoxina não teve efeito significativo no relaxamento dos fragmentos de CCH induzidos por BK, GTN e acetilcolina. Conclusão: Este estudo demonstra claramente a existência funcional de receptores de cininas B<sub>2</sub> em tecido erétil de corpo cavernoso humano e que,



quando ativados, liberam óxido nítrico, Relaxando a musculatura lisa destes tecidos. Como a tetrodotoxina não conseguiu afetar o relaxamento induzido por cininas dos segmentos de corpo cavernoso humano, é provável que estes peptídeos liberem óxido nítrico do endotélio dos sinusóides, e não de neurônios que inervam o tecido cavernoso. Embora as calicreínas teciduais e seus produtos tenham sido encontrados no sistema reprodutor masculino, a importância fisiopatológica da sua presença nestes tecidos não está totalmente elucidada.

# Summary

---

**Objective:** To characterize the kinin receptor subtype involved in the relaxation of human isolated corpus cavernosum (HCC) induced by bradykinin (BK). Lys-bradykinin (Lys-BK), Met-Lys-bradykinin (Met-Lys-BK) and des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin (des-Arg<sup>9</sup>-BK), and to investigate whether the kinin-induced relaxation of HCC results from the stimulation of nonadrenergic, noncholinergic (NANC) neurons supplying the cavernosal tissue. **Materials and Methods:** Excised HCC tissues were immediately placed in Krebs solution and kept at 4°C until use (never >24 hours after removal). HCC was cut in strips of ~ 2 centimetres, suspended in a cascade system and superfused with oxygenated and warmed Krebs solution at 5 mL/minute. After equilibration for ~ 90 minutes, noradrenaline (3µmol/L) was infused to induce a submaximal contraction of the HCC strips. The release of cyclo-oxygenase products was prevented by infusing indomethacin (6µmol/L). HCC strips were calibrated by injecting a single bolus of the nitrovasodilator glyceryl trinitrate (GTN) and the sensitivity of the tissues adjusted electronically to be similar. The agonists (kinins, histamine and acetylcholine) were injected as a single bolus (up to 100µL) and the relaxation of HCC expressed as a percentage of the submaximal relaxation induced by GTN. **Results:** Bradykinin, Lys-BK and

Met-Lys-BK significantly relaxed the HCC tissues; on a molar basis, there was no statistical difference among the degrees of relaxation induced by these peptides. The B<sub>1</sub> kinin receptor agonist des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin had no effect on the HCC. The infusion of the B<sub>2</sub> kinin receptor antagonist Hoe 140 (50nmol/L) virtually abolished the relaxation induced by BK, Lys-BK and Met-Lys-BK without affecting those induced by acetylcholine and histamine. The infusion of the nitric oxide synthase inhibitor N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine methyl ester increased the tone of the HCC tissues and significantly reduced ( $p < 0.01$ ) the relaxation induced by BK (74%), Lys-BK (90%), Met-Lys-BK (87%) and acetylcholine (89%) without affecting those induced by GTN. The subsequent infusion of L-arginine (300  $\mu$ mol/L) partially reversed the increased tone and significantly ( $P < 0.01$ ) restored the relaxation induced by Bk, Lys-BK and Met-Lys-BK. The results were similar with the novel guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-1-one which reduced by  $> 95\%$  ( $p > 0.01$ ) the relaxation induced by BK, Lys-BK, Met-Lys-BK, acetylcholine and GTN. The infusion of the sodium-channel blocker tetrodotoxin had no significant effect on the BK-, GTN- and acetylcholine-induced relaxation of HCC. **Conclusion:** This study clearly showed the existence of functional B<sub>2</sub> kinin receptors in human erectile tissues that when activated lead to the release of NO and hence relaxation of the HCC tissues. As tetrodotoxin failed to affect the kinin-induced relaxation of HCC strips, it is likely that these peptides release NO from the endothelium of sinuoidal capillaries rather than from neuronal sources supplying the cavernosal tissue. Although tissue kallikreins and their components have been found in the male reproductive system, the physiopathological importance of these findings has yet to be elucidated.

# 1. Introdução

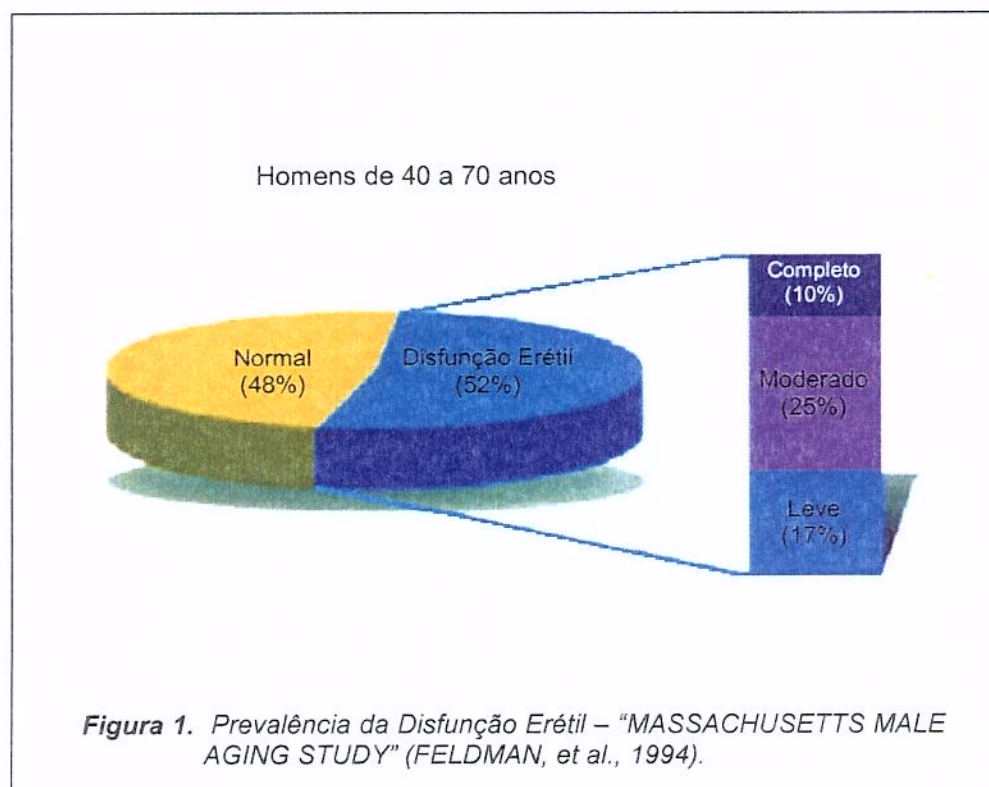
---

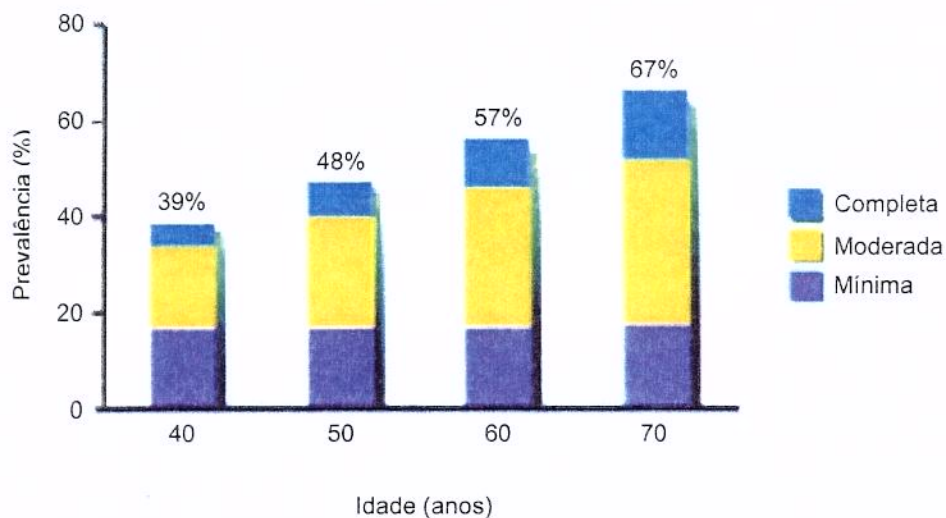
## 1.1. Epidemiologia

Disfunção erétil (DE) que é a incapacidade permanente de obter e/ou manter ereção rígida suficiente para uma atividade sexual satisfatória (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH [NIH] CONSENSUS CONFERENCE ON IMPOTENCE, 1993), deve substituir o termo impotência devido ao caráter pejorativo do último.

Nos Estados Unidos da América, especificamente na cidade de Boston, o primeiro estudo epidemiológico multidisciplinar para avaliação da incidência e prevalência da impotência e seus fatores de risco baseado na comunidade e com amostras randomizadas foi realizado pelo Male Massachussets Aging Study. O primeiro trabalho publicado deste estudo que envolveu 1.290 homens com parceiras fixas, com idades variando de 40 a 70 anos de idade, demonstrou que a prevalência de impotência foi de 52% (mínima - 17,2%; moderada - 25,2%; completa- 9,6%) (Figura 1). Extrapolando estes números para a população norte-americana, estimou-se que cerca de 18 milhões de homens eram impotentes naquele país. Também verificou-se que a probabilidade de impotência completa em

indivíduos com 40 e 70 anos aumentava de 5,1% para 15% e de 17% para 34% quando a impotência era considerada complexa e moderada, respectivamente. A probabilidade de impotência mínima não se modificou, ou seja, 17% para os dois grupos (Figura 2). Os fatores de risco que estavam associados com impotência neste estudo foram diabetes, hipertensão arterial, doença cardíaca, doença ulcerosa não tratada, artrites, medicamentos cardiovasculares (incluído os medicamentos anti-hipertensivos), hábito de fumar, agentes hipoglicemiantes e depressão (FELDMAN et al., 1994).

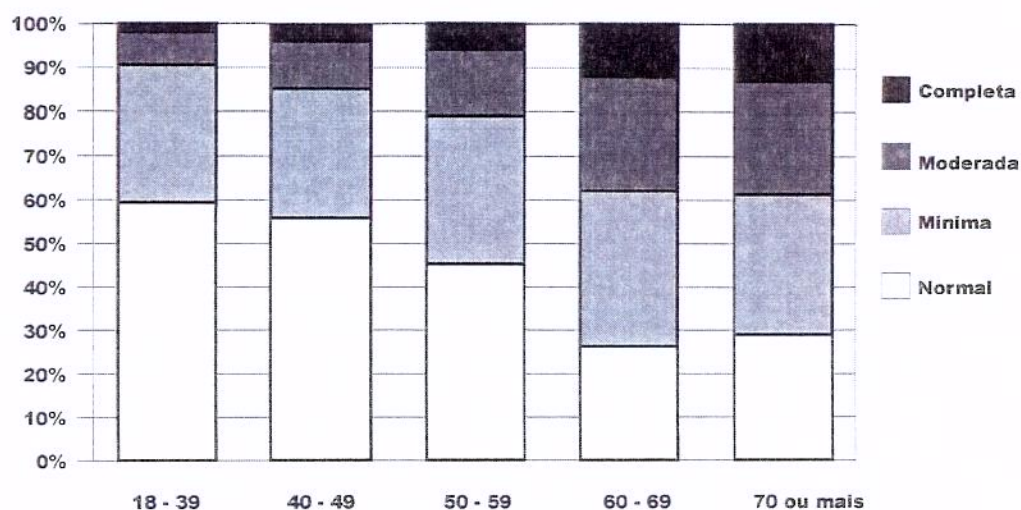




**Figura 2:** Associação entre idades e prevalência de disfunção erétil  
MASSACHUSETTS MALE AGING STUDY (FELDMAN et al., 1994).

MOREIRA et al. (2001), avaliando 1.286 homens, com idade acima dos 18 anos, de nove cidades de grande porte no Brasil, verificaram que 46,2% dos entrevistados apresentavam algum grau de disfunção erétil (DE): 31,5% DE mínima, 12,1% moderada e 2,6% completa. A prevalência de DE completa aumentou dez vezes (de 1% para 11%) entre indivíduos com idades abaixo de 40 anos e indivíduos com idades superiores aos 70 anos (Figura 3).





**Figura 3.** Grupos de idade (anos). Prevalência e severidade da disfunção erétil por idade no Brasil (n=1170) - (MOREIRA Jr. et al., 2001)

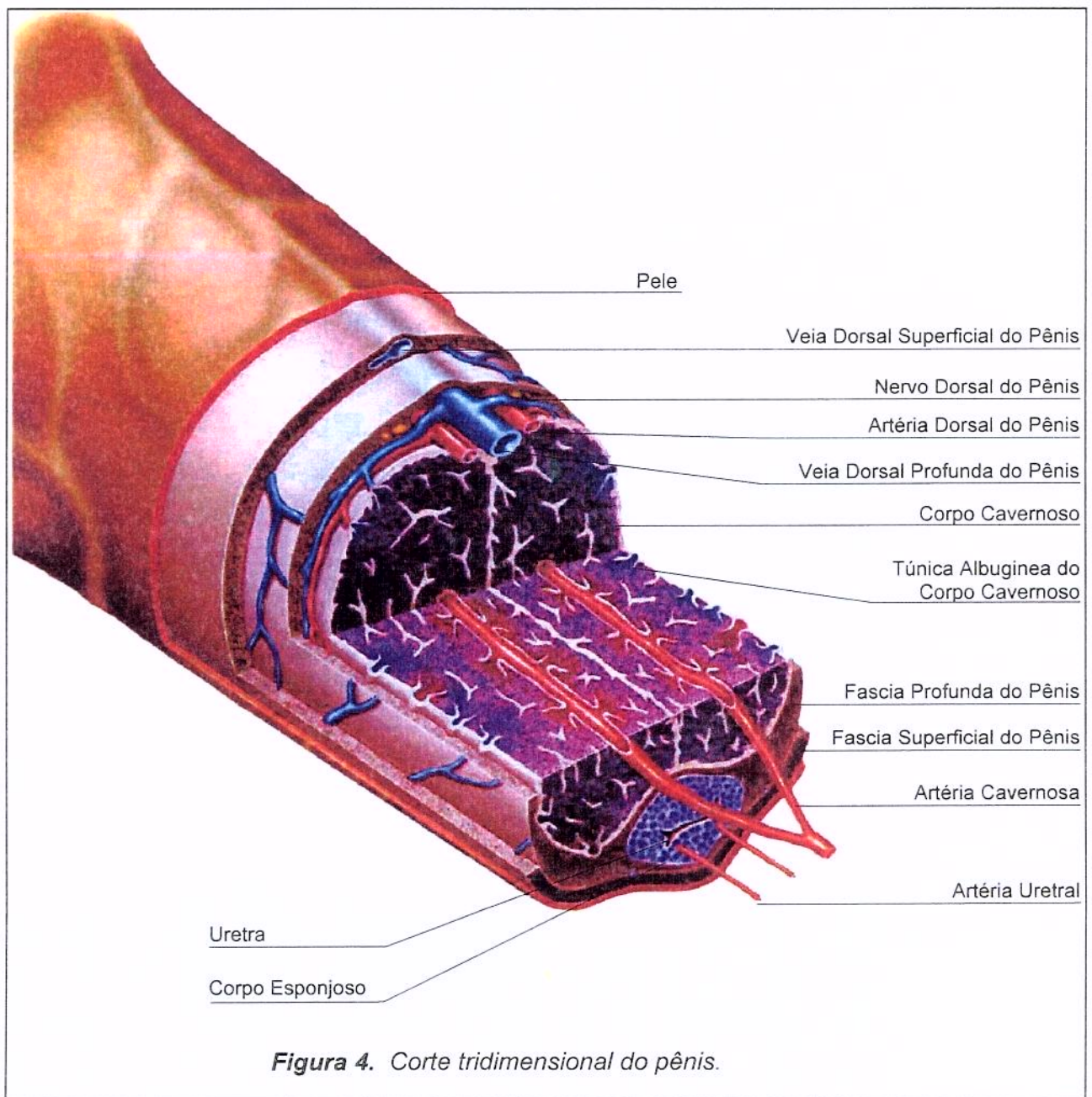
## 1.2. Anatomia Peniana

### 1.2.1. Morfometria

O pênis é uma estrutura cilíndrica que tem um comprimento de 8,8cm, quando flácido; 12,4cm quando esticado e 12,9cm quando em ereção, sendo que nem a idade do homem nem o tamanho do pênis flácido podem prever o comprimento do pênis ereto (WESSELLS, LUE, McANINCH, 1996). Outro estudo observou que o comprimento pode variar de 10cm a 20cm e a espessura de 3cm a 5cm quando ereto (SCHONFIELD, 1943).

ROS, TELOKEN, SOGARI (1994), examinando 150 homens de Porto Alegre, RS, potentes e que não tinham como queixa o tamanho peniano, constataram uma variação do tamanho do pênis em ereção de 9 a 19cm, com uma média de 14,5cm. A circunferência média proximal foi de 11,92cm e a circunferência média distal foi de 11,05cm.

O pênis apresenta três estruturas cilíndricas: dois corpos cavernosos pareados e um corpo esponjoso. Os corpos cavernosos são as principais estruturas envolvidas na ereção. Estão interligados através de um septo de tecido conjuntivo denso, que faz parte da túnica albugínea. Os septos são perfurados, permitindo a comunicação entre os corpos cavernosos (Figura 4) (SAENZ DE TEJADA et al., 1999).

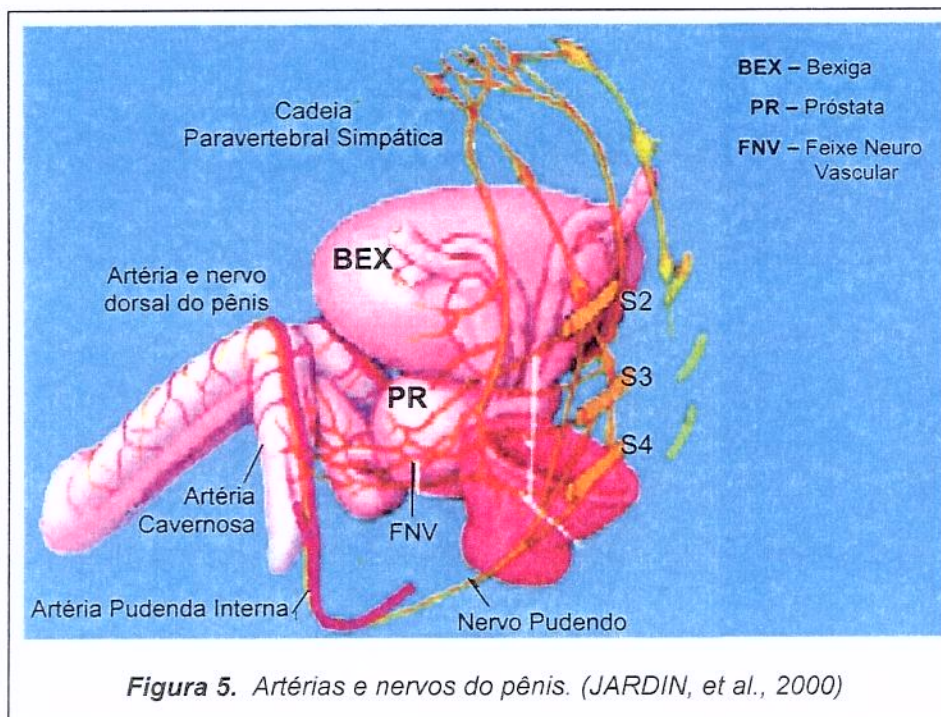




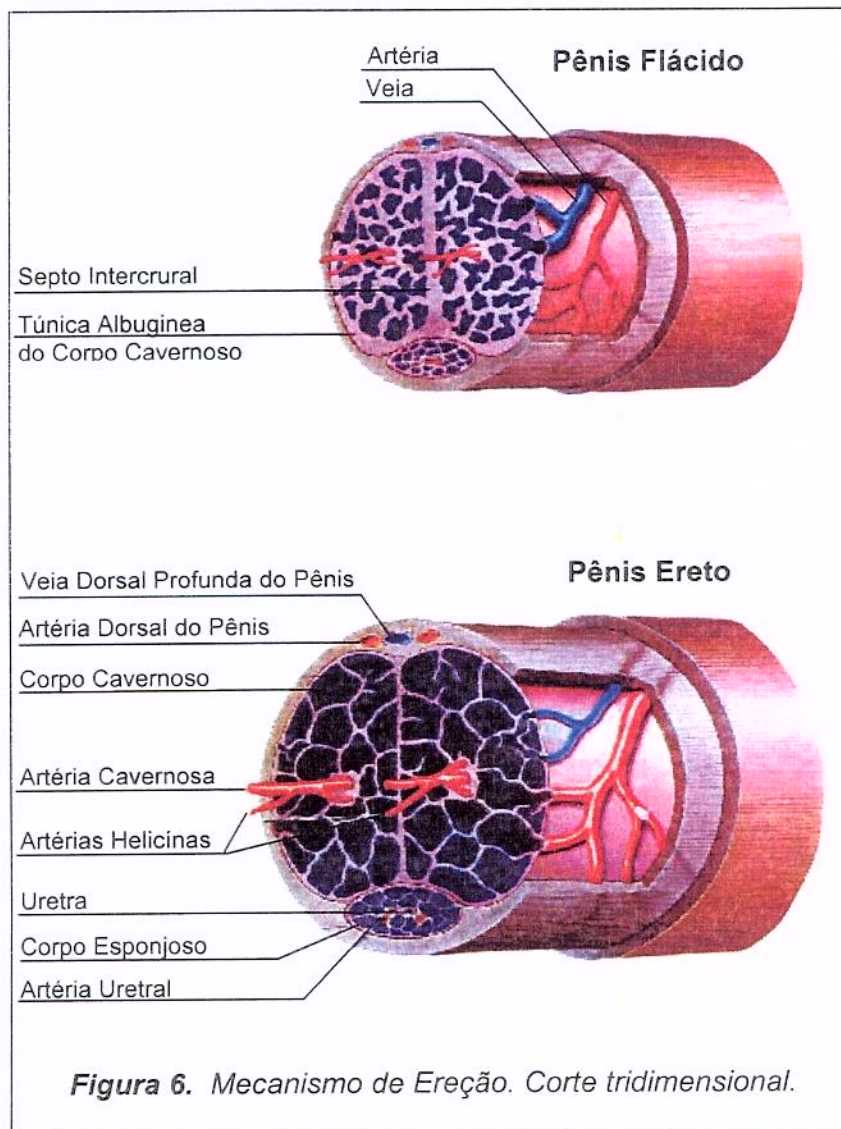
O corpo esponjoso também é uma estrutura cilíndrica que contém a uretra e está localizado logo abaixo dos dois corpos cavernosos (ANDERSSON & WAGNER, 1995).

### 1.2.2. Sistema Arterial

O pênis é irrigado primariamente pela artéria hipogástrica. Um dos seus ramos, a artéria pudenda interna, divide-se em artéria bulbo uretral, dorsal do pênis e cavernosa. As artérias bulbouretrais irrigam a uretra e a glândula. As artérias dorsais do pênis correm sobre os dois corpos cavernosos, as 1 e 11 horas, juntamente com os nervos dorsais e a (s) veia (s) profunda (s) do pênis e irrigam estruturas superficiais como a pele e também enviam ramos para o corpo cavernoso através de artérias perfurantes (SHETTY & FARAH, 1999).(Figura 5).



As artérias cavernosas são o eixo central dos corpos cavernosos. Deste eixo, saem milhares de pequenas artérias de resistência chamadas helicinas, nome devido a sua emergência das artérias cavernosas como formando uma hélice. Estas artérias, por sua vez, nutrem as trabéculas e desembocam nos espaços sinusóides (NITARAHA & LUE, 1999) (Figura 6).



### **1.2.3. Sistema Venoso**

O sistema venoso ocorre em três níveis: superficial, intermediário e profundo. O sistema superficial, que tem conexões com o sistema profundo, drena o sangue da pele peniana para a veia safena e veias pudendas externas. O sistema intermediário consiste das veias dorsais profundas e veias circunflexas. O sistema profundo é a drenagem do sangue das trabéculas e espaços sinusoidais para o sistema de vênulas subtunicais que coalescem para formarem as veias emissárias logo abaixo da túnica albugínea. As veias emissárias, por sua vez, perfuram a túnica albugínea e desembocam nas veias circunflexas (ABOSEIF & TANAGHO, 1999).

### **1.2.4. Histologia**

Histologicamente, os corpos cavernosos são leitos vasculares únicos, compostos por estruturas sinusoidais cujo interstício, entre um sinusóide e outro, é composto pelas trabéculas. Estes espaços sinusoidais são irrigados pelas artérias helicinas, quando o pênis está ereto, e drenam para as vênulas subtunicais. O pO<sub>2</sub> do sangue destes espaços é de 20-40mmHg, quando o pênis está flácido, e entre 90 e 100mmHg, quando o pênis está em ereção (KIM et al., 1993).

As trabéculas são compostas por musculatura lisa (40%-50%), tecido conjuntivo (45-50%), fibroblastos, nervos e endotélio, dos espaços sinusoidais (WESPES et al., 1991).

A túnica albugínea é uma estrutura composta por tecido conjuntivo denso com duas camadas principais, uma externa com fibras colágenas longitudinais e outra interna com fibras colágenas circulares que revestem os dois corpos cavernosos e compõe o septo. Pela sua composição, apresentam elasticidade muito limitada e têm papel importante no mecanismo de veno-oclusão para a manutenção da ereção (MONCADA IRIBARREN & SAENZ DE TEJADA, 1997).

#### **1.2.5. Sistema Linfático**

A linfa da pele do pênis e a do prepúcio drenam para o plexo pré-sinfiseal, onde este se divide em direito e esquerdo, juntando a estes os linfáticos do escroto e do períneo. Estes linfáticos correm junto com as veias pudendas externas até terminarem nos linfonodos inguinais superficiais. A linfa da glândula e uretra anterior drenam para os linfonodos inguinais profundos e pré-sinfiseais. Ocasionalmente, drenam para os linfonodos ilíacos externos (SHETTY & FARAH, 1999). No entanto, a drenagem linfática da uretra posterior se faz para os linfonodos ilíacos internos (DEVINE & ANGERMEIER, 1994).

#### **1.2.6. Inervação**

O pênis apresenta três tipos de inervação: simpático toracolombar, parassimpático sacral e somático sacral. O centro simpático está localizado na zona cinzenta intermediolateral entre o décimo segmento espinhal torácico e o segundo segmento espinhal lombar. As fibras pós-ganglionares advindas dos plexos

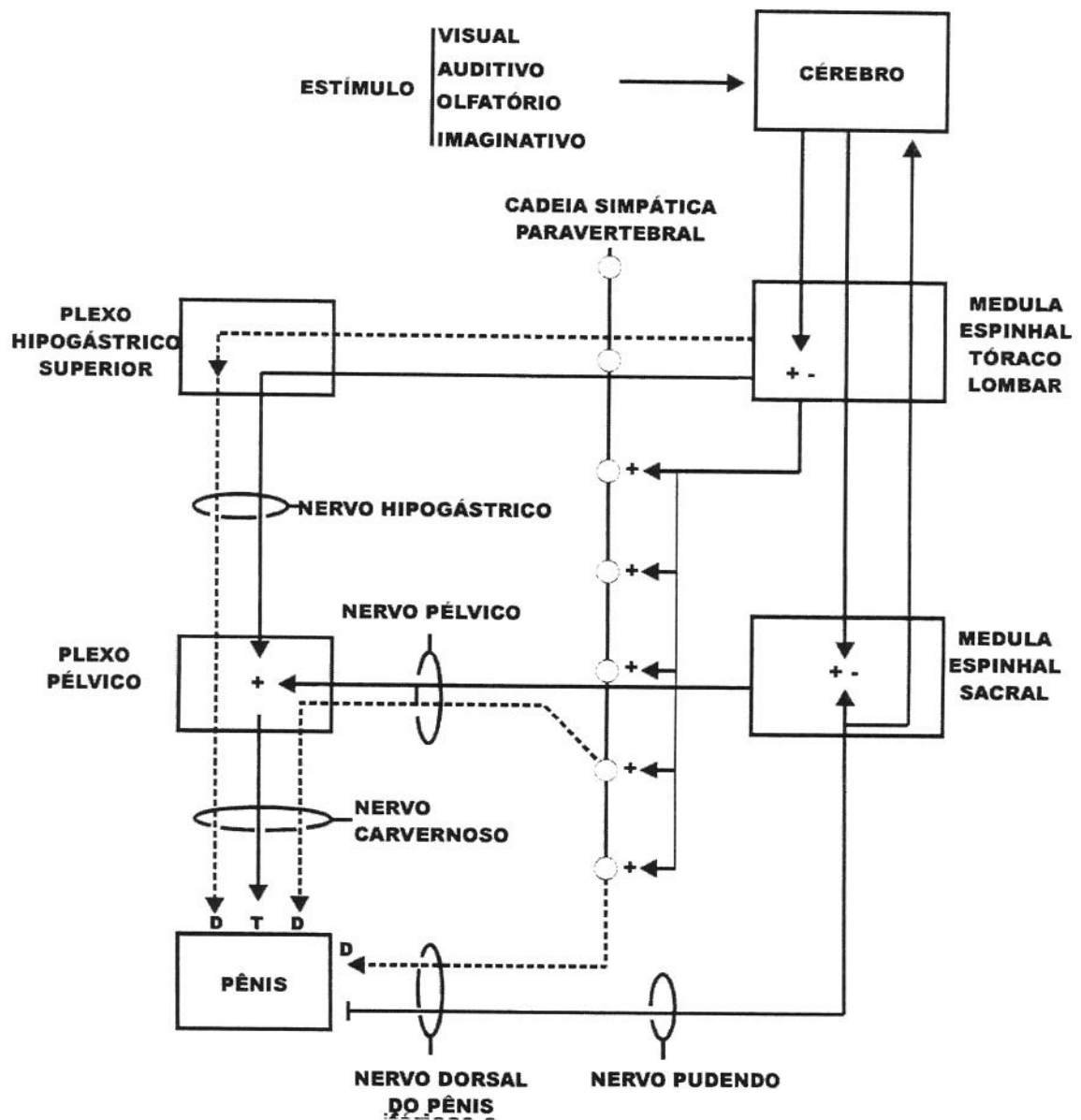


hipogástrico superior, pélvico e da cadeia ganglionar paravertebral juntam-se para formar o nervo cavernoso.

O centro parassimpático sacral fica localizado na substância cinzenta intermediolateral do segundo ao quarto segmento espinhal sacral. As fibras pré-ganglionares sacrais constituem o nervo pélvico que chega ao plexo pélvico. Do plexo pélvico saem as fibras pós-ganglionares parassimpáticas, que também vão constituir o nervo cavernoso.

Os nervos cavernosos, direito e esquerdo, contendo fibras pós-ganglionares simpáticas e parassimpáticas, deixam a pelve passando pósterolateralmente a próstata e entram nos corpos cavernosos anteriormente, à 1 e 11 horas, logo após terem passado pela uretra membranosa (MONCADA IRIBARREN & SAENZ DE TEJADA, 1997). O conhecimento da anatomia dos nervos cavernosos tem facilitado na sua preservação para a manutenção da potência em pacientes submetidos à prostatectomia radical (WALSH & DONKER, 1982; LUE et al., 1984) (figura 7).

A inervação somática se faz através do nervo pudendo, que compreende fibras eferentes motoras que inervam os músculos isquiocavernosos e bulbocavernosos, assim como fibras aferentes sensitivas provenientes do pênis e da pele do períneo. O nervo dorsal do pênis é um dos ramos do nervo pudendo. Terminais nervosos proprioceptivos e sensitivos da superfície da túnica albugínea e terminais nervosos da pele e glândula peniana compõem o nervo dorsal do pênis (AMARENCO & CASANOVA, 1991).



**Figura 7.** Vias Neurais Periféricas e Centrais no controle da ereção peniana (De Groat & Steers, 1988).  
D - Detumescência – T: Tumescência  
+ - Estímulo - Bloqueio

### 1.3. Hemodinâmica da Ereção

O processo de ereção e detumescência foi dividido em diferentes fases (ABOSEIF & LUE, 1988; ANDERSSON & WAGNER, 1995).

- *Fase 0 é o estado de flacidez peniana.* Durante este estado, as artérias cavernosas e a musculatura lisa cavernosa estão contraídas, sob a influência, principalmente, do sistema nervoso simpático. O fluxo sanguíneo pelas artérias cavernosas é mínimo e mantido por motivos nutricionais. O fluxo pelas vênulas subtunicais e veias emissárias é livre, sem nenhum obstáculo. Eletromiografia neste estado demonstra contratilidade da musculatura lisa (WAGNER, GERSTENBERG, LEVIN, 1989).
- *Fase 1 é a fase latente ou de enchimento.* Após estimulação sexual, o sistema nervoso parassimpático aumenta a sua atividade, aumentando o fluxo sanguíneo pelas artérias pudendas internas e cavernosas. A resistência no corpo cavernoso diminui devido ao relaxamento das artérias helicinas e musculatura lisa das trabéculas. O pênis aumenta em comprimento. A pressão intracavernosa não aumenta, assim como a pressão sanguínea sistêmica.
- *Fase 2 é a fase de tumescência.* O fluxo sanguíneo em homens jovens aumenta de 25 a 60 vezes comparado ao estado de flacidez. A pressão intracavernosa aumenta rapidamente. A complacência do

corpo cavernoso aumenta significativamente devido ao relaxamento da musculatura lisa trabecular. O pênis aumenta de comprimento e diâmetro. No final desta fase, o fluxo sanguíneo arterial diminui.

- *Fase 3 é a fase de ereção plena.* O corpo cavernoso aumenta o seu diâmetro devido ao acúmulo de sangue e comprime as vênulas subtúnicas contra a túnica albugínea, reduzindo o retorno venoso. A pressão intracavernosa fica 10 a 20mmHg abaixo da pressão sanguínea sistólica.
- *Fase 4 é a fase de ereção rígida ou esquelética.* A pressão intracavernosa está bem acima da pressão sanguínea sistólica, consequência da contração da musculatura ísquiocavernosa e bulbocavernosa. Não existe fluxo pelas artérias cavernosas durante esta fase.
- *Fase 5 é a fase de transição.* Aumenta a atividade do sistema nervoso simpático, aumentando, assim, a contratilidade da musculatura lisa das artérias e das trabéculas. O fluxo arterial é reduzido, no entanto o mecanismo veno-oclusivo ainda está ativo.
- *Fase 6 é a fase inicial da detumescência.* Existe um moderado declínio da pressão intracavernosa, as vênulas subtúnicas aumentam o fluxo.
- *Fase 7 é a fase de detumescência rápida.* A pressão intracavernosa declina rapidamente, o mecanismo de veno-oclusão está desativado e o pênis retorna ao estado de flacidez.



#### **1.4. Mecanismos moleculares na regulação da contratilidade da musculatura lisa do corpo cavernoso**

A contração e o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso (artérias e trabéculas) dependem de vários fatores que, coordenados, podem levar a ereção ou a detumescência: nível adequado de agonistas (neurotransmissores, hormônios e substâncias derivadas do endotélio), expressão adequada de receptores nas células ou estruturas alvo, integridade dos mecanismos de transdução, homeostase do íon cálcio, interação das proteínas contráteis e uma efetiva comunicação intercelular (*gap junctions*) (SAENZ DE TEJADA, 2000).

As diferentes estruturas do pênis recebem inervação simpática, parassimpática e não adrenérgica e não-colinérgica (NANC). Os nervos NANC contêm não somente neuropeptídeos, mas também transmissores e enzimas moduladoras ou geradoras de transmissores, como é o caso das óxido nítrico sintases e das hemooxigenases (SAENZ DE TEJADA, 2000).

Transmissores NANC podem ser encontrados em nervos colinérgicos e adrenérgicos, portanto sendo difícil caracterizar as populações de nervos baseado em seus transmissores (LUNDBERG, 1996). Assim sendo, um importante grupo de nervos no corpo cavernoso contém acetilcolina (Ach), mas também NOS, polipeptídeo vasointestinal (VIP) e neuropeptídeo Y ( HEDLUND et al.; 2000).

O endotélio dos vasos também apresenta função importante no mecanismo de relaxamento e contração da musculatura lisa, liberando poderosos vasodilatadores como é o caso da prostaciclina (MONCADA et al., 1976), fator

relaxador derivado do endotélio (FRDE) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980), e também metabolizando substâncias vasoativas, como as catecolaminas, angiotensina, bradicinina e prostaglandinas (VANE, 1969).

#### **1.4.1. Contração da musculatura**

- **Noradrenalina**

A noradrenalina, também conhecida como norepinefrina, é sintetizada a partir da tirosina através de uma sequência de etapas envolvendo enzimas e co-fatores. A noradrenalina é o neurotransmissor das fibras simpáticas pós-ganglionares (LEFKOWITZ, HOFFMAN, TAYLOR, 1996).

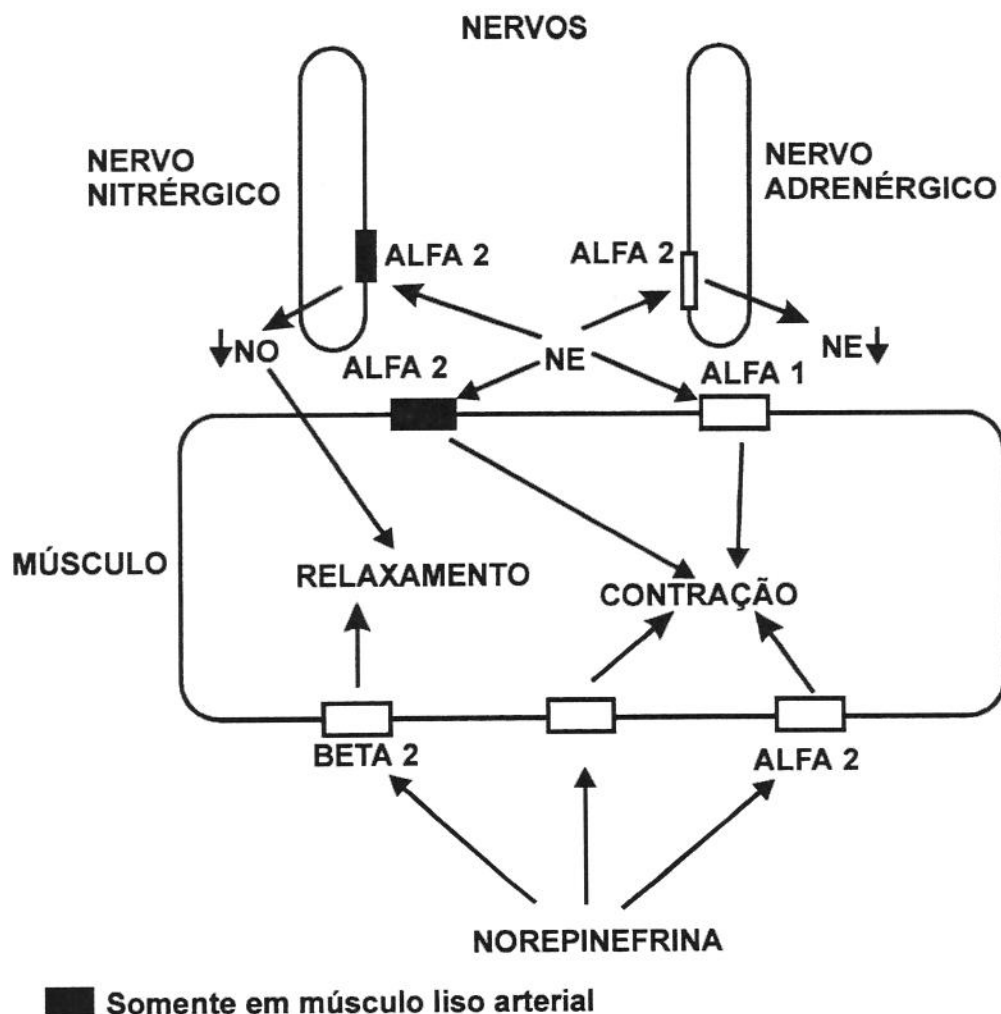
O corpo cavernoso recebe uma inervação simpática muito rica. É aceito que o estado de flacidez peniano é mantido principalmente pela tonicidade simpática. A noradrenalina liberada estimula receptores alfa das artérias penianas (cavernosa e helicinas) e trabéculas, contraindo a musculatura (ANDERSSON & WAGNER, 1995).

Existem no corpo cavernoso receptores alfa e beta, com predomínio dos primeiros. Para cada receptor beta existem dez receptores alfa (LEVIN & WEIN, 1980). Os andrógenos devem regular a responsividade dos receptores alfa. REILLY, STOPPER, MILLS, (1997), comparando ratos normais com ratos castrados, verificaram que os ratos castrados apresentavam reatividade aumentada quando os receptores alfa 1 eram estimulados.

Tanto receptores alfa 1 quanto alfa 2 foram demonstrados em corpo cavernoso humano, no entanto com predominância dos receptores alfa 1 (GOEPEL et al., 1999).

Todos os subtipos de receptores alfa 1 foram demonstrados em corpo cavernoso humano. TRAISH et al. (1995a), demonstraram que existe predominância dos receptores alfa 1A e alfa 1D, no entanto, GOEPEL et al. (1999), demonstraram um predomínio de alfa 1A, alfa 1B e alfa 2A.

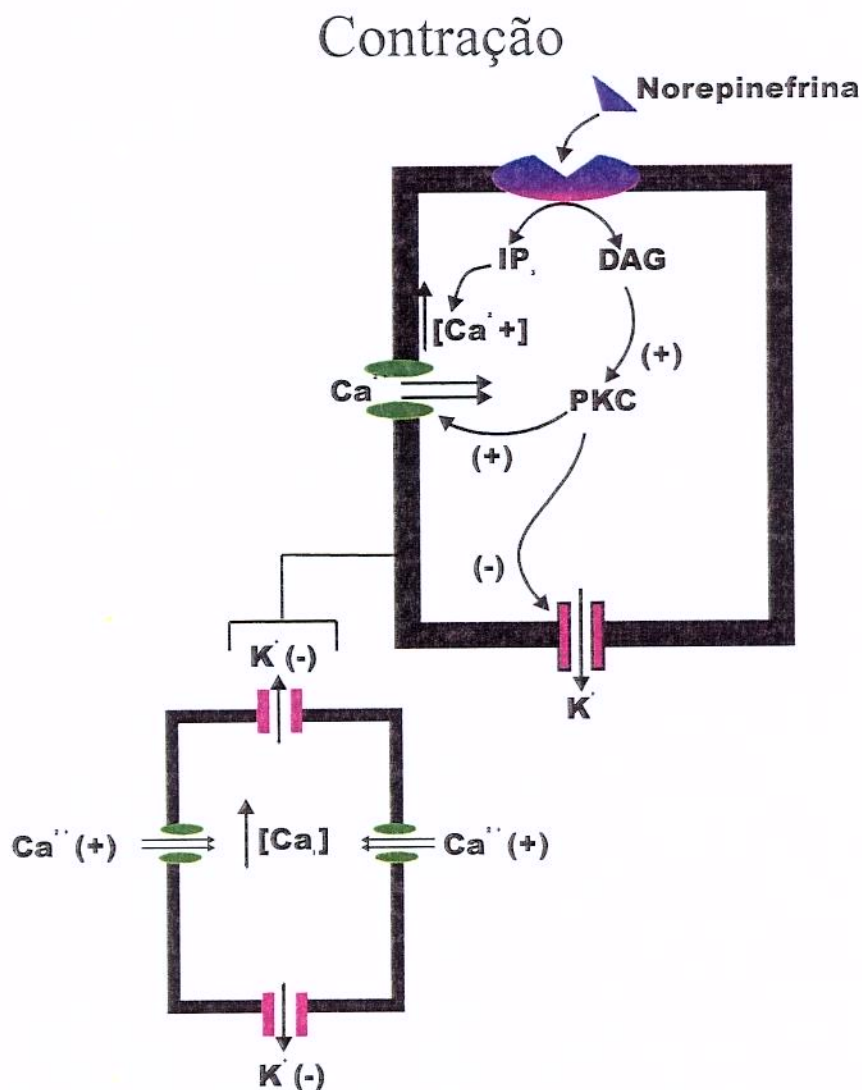
TRAISH et al. (1997) comprovaram expressão de RNAm para alfa 2A, alfa 2B e alfa 2C em todo o corpo cavernoso humano. Não se sabe, até o momento, se os receptores alfa 2 são importantes para a regulação do tônus da musculatura lisa do corpo cavernoso. Receptores alfa 2 pré-juncionais modulam a liberação de noradrenalina dos nervos simpáticos do corpo cavernoso (MOLDERINGS et al., 1989). Todavia, estimulação de receptores alfa 2 pré-juncionais de artérias penianas de resistência de cavalos inibem a liberação de transmissores não-adrenérgicos e não-colinérgicos (SIMONSEN et al., 1997) (figura 8).



**Figura 8.** Receptores adrenérgicos e mecanismo de relaxamento e contração da musculatura lisa do corpo cavernoso (JARDIN, et al., 2000)

O mecanismo de transdução intracelular, quando os receptores alfa são estimulados, se faz através do metabolismo do fosfatidil inositol pela enzima fosfolipase C, produzindo o inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG). O inositol trifosfato, por sua vez, agindo no receptor para  $IP_3$  na membrana do

retículo sarcoplasmático, libera o cálcio para o citoplasma, aumentando a concentração deste íon. O DAG estimula a proteína cinase C que, por sua vez, aumenta o efluxo de cálcio pelos canais de cálcio e diminui a saída de potássio pelos canais de potássio (SAENZ DE TEJADA, 2000) (Figura 9).



**Figura 9.** Mecanismo de contração da musculatura lisa do corpo cavernoso induzido por norepinefrina JARDIN, et al., 2000).

- **Endotelinas**

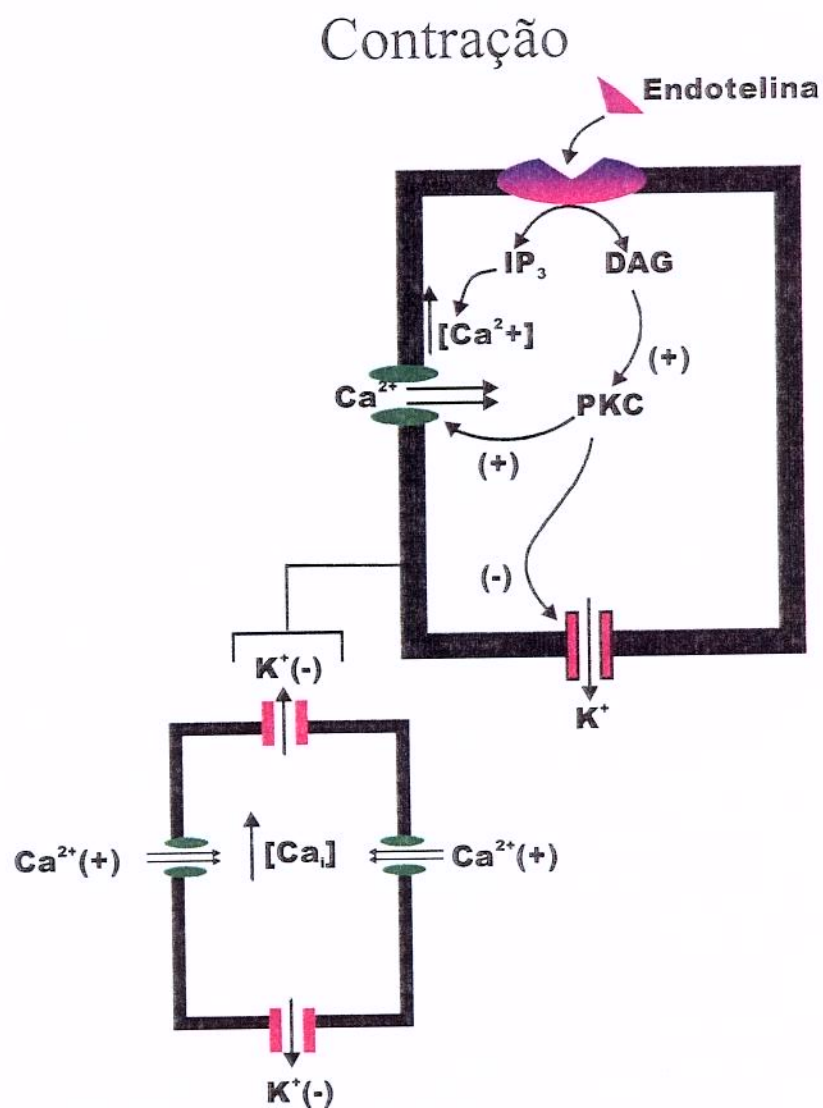
As endotelinas são uma família de três peptídeos que foram descobertos em 1988 (YANAGISAWA et al., 1988), a saber: endotelina 1 (ET1), endotelina 2 (ET2) e endotelina 3 (ET3). Elas foram demonstradas em corpo cavernoso humano e acredita-se na contribuição destes peptídeos na manutenção do tônus da musculatura lisa dos corpos cavernosos. ET1 é um potente vasoconstritor sintetizado pelo endotélio lacunar e possivelmente pela musculatura lisa trabecular (HOLMQUIST, ANDERSSON, HEDLUND, 1990; SAENZ DE TEJADA, 1990). A endotelina 1 é um constritor mais potente que as endotelinas 2 e 3 (SAENZ DE TEJADA, 1991).

Dois tipos de receptores, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, são responsáveis pela ação das endotelinas na musculatura lisa. O receptor ET<sub>A</sub> é o principal mediador das endotelinas, contraindo a musculatura lisa, e o receptor ET<sub>B</sub>, está presente principalmente no endotélio, mediando uma resposta vasodilatadora endotélio-dependente (ARI et al., 1996).

Também foi demonstrado que a endotelina 1 potencializa os efeitos vasoconstritores da noradrenalina (GONDRE & CHRIST, 1998).

O mecanismo de transdução intracelular para ambos os receptores se faz através da ativação da fosfolipase C mediada por uma proteína G, levando a hidrólise do fosfatidilinositol e formação de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), com liberação de cálcio do interior do retículo sarcoplasmático para o

sarcoplasma e também através da ativação da proteína quinase C (PKC) (HOLMQUIST et al., 1990; HOLMQUIST et al., 1992) (Figura 10).



**Figura 10.** Mecanismo de contração da musculatura lisa do corpo cavernoso induzido por endotelina JARDIN, et al., 2000).

- **Angiotensina**

O sistema renina angiotensina é de extrema importância na regulação da pressão arterial a longo e curto prazo. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação arterial renal pelas células justaglomerulares granulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes, a medida que entram nos glomérulos. Fatores que reduzem a pressão arterial, como as reduções no volume sanguíneo (dieta hipossódica, diuréticos, perda sanguínea, insuficiência cardíaca congestiva, etc.) ou reduções na resistência periférica total (por exemplo, uso de vasodilatadores), ativam a liberação de renina (JACKSON & GARRISON, 1996).

A renina atua sobre o angiotensinogênio para catalisar a formação do decapeptídeo angiotensina I. Este decapeptídeo é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), uma cininase II, produzindo o octapeptídeo angiotensina II (JACKSON & GARRISON, 1996).

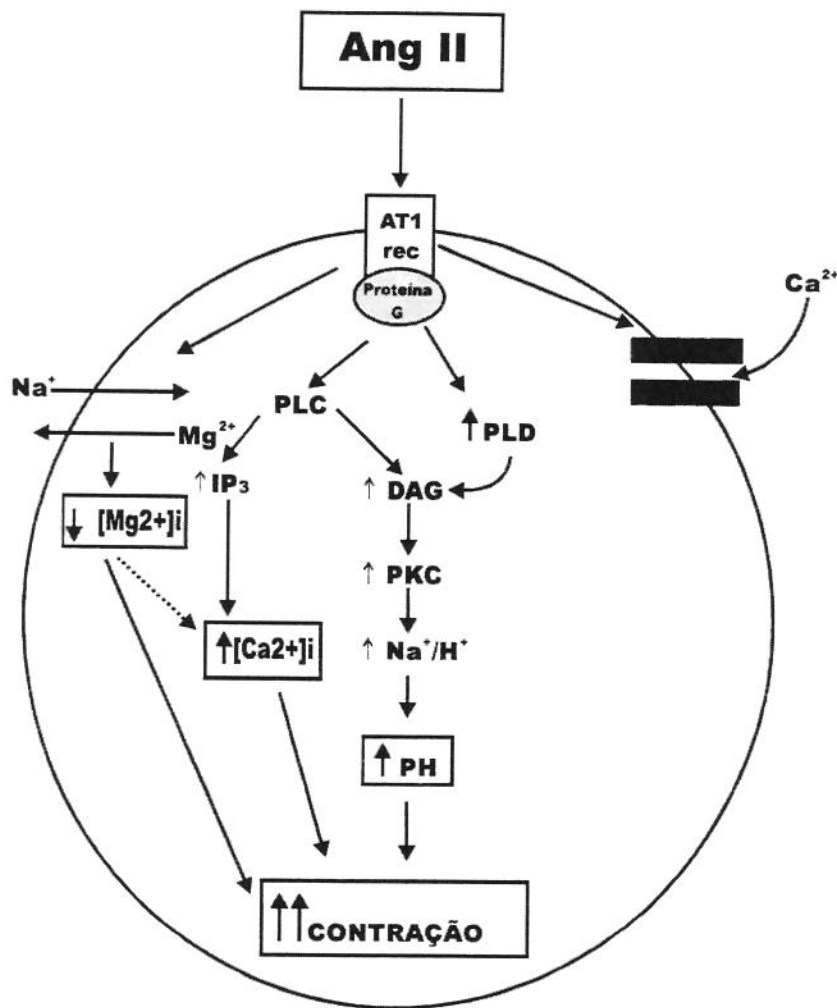
Os efeitos da angiotensina II são exercidos através de receptores específicos na superfície celular. Existem dois subtipos de receptores da angiotensina, AT1 e AT2, que já foram clonados e caracterizados farmacologicamente (MURPHY et al., 1991), mas existem outros dois receptores não totalmente caracterizados, do ponto-de-vista farmacológico: AT3 e AT4 (CHAKI & INAGAMI, 1992; SWANSON et al., 1992). Até o momento, todos os efeitos farmacológicos da angiotensina II parecem ser mediados pelo receptor AT1, não tendo sido definido o papel funcional do AT2.



Os receptores AT1, quando ativados pela angiotensina II, levam à ativação da fosfolipase C, mediada por uma proteína G. A fosfolipase C, por sua vez, hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato para gerar o inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se a receptores nos canais que liberam  $\text{Ca}^{++}$  nos seus depósitos intracelulares (retículo sarcoplasmático), liberando o íon no sarcoplasma. O diacilglicerol por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, também ativa o sistema de troca  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Todos estes eventos resultam no aumento do cálcio iônico intracelular estimulando a interação actina-miosina e a contração da musculatura lisa (figura 11).

O corpo cavernoso humano produz e secreta quantidade relevante de angiotensina II. Injeção intracavernosa de angiotensina II em cães causou contração e terminou ereções em cães anestesiados. Contudo, quando administrado losartan (antagonista do receptor AT1), houve relaxamento da musculatura lisa e ereção (KIFOR et al., 1997).

BECKER et al. (2001) demonstraram que os níveis plasmáticos de angiotensina II em corpo cavernoso de humanos aumentaram de  $21,8 \pm 4,6$  pg/ml no estado de flacidez para  $27,9 \pm 10$  pg/ml no estado de detumescência. No plasma periférico, os níveis de angiotensina II foram de  $17,2 \pm 6,2$  pg/ml para  $19,5 \pm 6,5$  pg/ml nos estágios penianos respectivos. Assim, os níveis de angiotensina II no sangue cavernoso foram 30% maiores que no sangue periférico retirados da veia cubital, sugerindo um papel importante da angiotensina na contração da musculatura lisa do corpo cavernoso durante o período de detumescência peniana.



**Figura 11.** Mecanismo de ação da angiotensina II na contração da musculatura lisa. ANG II: Angiotensina II - AT<sub>1</sub>REC: Receptor de Angiotensina - PLD: Fosfolipase D PLC: Fosfolipase C - DAG: Diacilglicerol - PKC: Proteína Quinase C IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato (TOUZ & SCHIFFRIN, 2000).

#### 1.4.2. Relaxamento da Musculatura Lisa do Corpo Cavernoso

- **AcetilColina (Ach)**

A acetilcolina é o produto da acetilação da colina com a acetil coenzima A catalisado pela enzima acetiltransferase. A localização imunocitoquímica desta

enzima é de muito valor na identificação de axônios colinérgicos (BROWN & TAYLOR, 1996). A degradação da acetilcolina se faz através da ação da acetilcolinesterase (TAYLOR, 1996). O corpo cavernoso humano e de vários animais é rico em nervos contendo acetilcolinesterase (ANDERSSON & WAGNER, 1995).

Existem basicamente dois tipos de receptores para a acetil colina: os nicotínicos e os muscarínicos. Os receptores nicotínicos estão ligados a canais iônicos e sua ativação causa um aumento rápido da permeabilidade de sódio e cálcio. Os receptores muscarínicos pertencem à classe de receptores acoplados a proteína G (BROWN & TAYLOR, 1996).

Cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) foram detectados através de clonagem, sendo que quatro subtipos foram identificados em corpo cavernoso humano. O receptor na musculatura lisa seria o M2 e no endotélio o M3 (TRAISH et al., 1995b).

COSTA et al. (1993) calcularam que o número de sítios que se ligavam à acetilcolina na musculatura lisa do corpo cavernoso era de 45.000, 15 vezes menor que o número de receptores alfa-adrenérgicos. Nestas células, o carbachol (agonista muscarínico com pouca susceptibilidade a acetilcolinesterase) produz contração. Isso significa que o relaxamento induzido pela acetilcolina na musculatura lisa se faz indiretamente, ou inibindo a liberação de um fator de constrição (noradrenalina, por exemplo) e / ou através da liberação de um fator de relaxamento (óxido nítrico, por exemplo).

TRIGO ROCHA et al. (1993), estudando a neurofarmacologia da ereção em cães anestesiados, observaram que injeção de atropina intracavernosa reduzia claramente a pressão intracavernosa. A injeção de acetilcolina no interior dos corpos cavernosos aumentou de 65% a 100% a pressão intracavernosa, quando comparada àquela após estimulação elétrica dos nervos pélvicos. Estes dois achados sugerem um efeito relaxante da acetilcolina. Quando ela era administrada após o uso de CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]1-propanosulfato), um detergente que destrói o endotélio vascular e lacunar, não se observava aumento da pressão intracavernosa, comprovando assim, que a ação da acetilcolina é dependente da integridade do endotélio. O fato de que ocorre ereção após estimulação do nervo pélvico, mesmo após a destruição do endotélio por CHAPS, implica que a liberação de neurotransmissores responsáveis pela ereção é apenas parcialmente endotélio-dependente e que os terminais nervosos e a musculatura também podem liberar neurotransmissores.

É importante frisar que a atividade parassimpática não necessariamente se resume à ação da acetilcolina. Outros transmissores podem ser liberados de nervos colinérgicos (LUNDBERG, 1996). A atividade parassimpática pode causar tumescência ou ereção, inibindo a liberação de noradrenalina através da estimulação de receptores muscarínicos em terminais nervosos adrenérgicos (KLINGE & SJOSTRAND, 1977) ou pela liberação de óxido nítrico e peptídeos vasodilatadores de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos e do endotélio (ANDERSSON & WAGNER, 1995).

- **Óxido Nítrico (NO)**

Em 1980, FURCHGOTT & ZAWADZKI evidenciaram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina era dependente da presença do endotélio vascular e que este efeito era mediado por um fator humoral lábil, mais tarde conhecido como fator de relaxamento endotélio-dependente (EDRF). Subseqüentemente, o EDRF foi comprovado em outras preparações vasculares como veias e artérias, também verificando-se que este fator era liberado em resposta a várias substâncias, como por exemplo nucleotídeos de adenina, trombina, substância p e bradicinina. Outros estímulos, tais como hipóxia, aumento de fluxo e estimulação elétrica, também causam relaxamento vascular endotélio-dependente *in vitro*. Outros agentes, no entanto, tais como nitrovasodilatadores, fator natriurético atrial, agonistas beta-adrenérgicos e prostaciclina induzem relaxamento vascular por um mecanismo endotélio-independente (MONCADA, PALMER, HIGGS, 1991).

Vários estudos foram realizados para caracterizar o fator de relaxamento endotélio-dependente. FURCHGOTT sugeriu em 1988 que EDRF poderia ser o óxido nítrico (MONCADA et al., 1991). IGNARRO et al. (1988), também especularam que EDRF poderia ser o NO ou uma substância relacionada com o NO.

Uma comparação detalhada das ações biológicas do EDRF e NO em tecido vascular (PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1987) e em plaquetas (RADOMSKI, PALMER, MONCADA, 1987) mostraram que os dois componentes eram indistinguíveis (MONCADA, RADOMSKI, PALMER, 1988).

Atualmente, admite-se que o EDRF seja o NO ou então uma substância estritamente relacionada ao NO (SAENZ DE TEJADA, 2000).

O óxido nítrico é um radical livre (a molécula tem um elétron em excesso) altamente reativo e quimicamente instável (SAENZ DE TEJADA, 2000). É sintetizado a partir do aminoácido L-arginina através da ação enzimática da óxido nítrico sintase, produzindo quantidades equimolares de NO e citrulina (BUSH, GONZALEZ, IGNARRO, 1992).

A primeira demonstração de que a ereção peniana era mediada pelo óxido nítrico liberado de nervos não-adrenérgicos e não-colinérgicos foi publicada em 1990 (IGNARRO et al., 1990). Estes pesquisadores, estimularam eletricamente segmentos de corpo cavernoso de coelhos na presença de guanetidina (bloqueador adrenérgico) e atropina (bloqueador de receptores muscarínicos). O relaxamento do corpo cavernoso de coelho induzido por estímulo elétrico aumentou os níveis de nitritos e  $\text{GMP}_c$ . Inferiu-se que este aumento devia-se à síntese de óxido nítrico que estimulava guanilato ciclase.

Nesse mesmo trabalho, observou-se que havia um bloqueio do relaxamento da musculatura do corpo cavernoso na presença de inibidores da óxido-nítrico-sintase,  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina (L-NOARG) ou  $\text{N}^G$ -amino-L-arginina (L-NMMA) e que este bloqueio era revertido por um excesso de L-arginina (substrato do NO), provando que a atividade da NOS era necessária em todo este processo de relaxamento da musculatura lisa. Observou-se também que havia inibição do relaxamento da musculatura na presença de oxihemoglobina (consumidor de

NO) ou azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase). Demonstrou-se ainda a independência da via da ciclooxigenase e seus produtos, devido ao bloqueio desta enzima pela indometacina.

PICKARD, POWELL, ZAR (1991), usando corpo cavernoso humano obtido de pacientes submetidos a cirurgias penianas, observaram que o relaxamento da musculatura lisa tratada com guanetidina, evocado por estímulo elétrico, eram resistentes a infusão de atropina e sensíveis à tetrodotoxina (bloqueador de canais de sódio), indicando que a origem deste relaxamento provinha do estímulo de um nervo não-adrenérgico e não- colinérgico. Demonstrou também que este relaxamento era atenuado, dose-dependente, por inibidores da óxido nítrico sintase, L-nitroarginina (L-NOARG), mas não pela D-nitro arginina. O efeito inibitório da L-NOARG foi antagonizado pela L-arginina, mas não pela D-arginina. A infusão de azul de metileno causou uma inibição/concentração dependente do relaxamento da musculatura lisa induzido por estímulo elétrico, concluindo que o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso humano é mediado pelo óxido nítrico ou por uma substância relacionada com o NO.

### **- Isoformas de Óxido Nítrico Sintase (NOS)**

Óxido nítrico sintase é a enzima que caracteriza a produção de óxido nítrico a partir da L-Arginina. São conhecidas duas categorias de NOS: enzimas constitutivas, reguladas por íons cálcio e calmodulina e, enzimas induzidas, ligadas à calmodulina, porém independentes de cálcio. A NOS induzida (iNOS ou NOS II) é solúvel e sua expressão é induzida por citocinas e endotoxinas.



Existem dois tipos de NOS constitutiva: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A nNOS, também chamada de NOS I, é solúvel e, portanto, está no citoplasma, e principalmente nos nervos periféricos, centrais e em ilhotas pancreáticas. A eNOS, também chamada NOS III, é particulada, ou seja, está presente na membrana plasmática da célula, principalmente em células endoteliais e células epiteliais renais (FORSTERMANN et al., 1989; BREDT & SNYDER, 1990; MITCHELL et al., 1991; POLLOCK et al., 1991).

Tanto o endotélio quanto as terminações nervosas no corpo cavernoso podem produzir NO, sendo que, tanto a NOS endotelial quanto a NOS neuronal devem estar envolvidas no mecanismo da ereção. Ratos que perderam a nNOS têm ereções e respondem com ereção com a eletroestimulação de nervos cavernosos (BURNETT et al., 1996). Corpos cavernosos isolados de ratos normais e ratos com deleção da nNOS demonstraram respostas similares à estimulação elétrica.

Acredita-se que a eNOS é essencial para a ereção, não somente em ratos que não apresentam a nNOS, mas também em ratos normais. A eNOS está presente no músculo liso do corpo cavernoso e pode ser uma fonte importante de NO junto com a nNOS. Revelou-se que ratos com mutação do gene que expressa a nNOS são capazes de expressar um RNA-mensageiro de nNOS que pode ser a fonte de NO em ratos mutantes para nNOS (ELIASSON et al., 1997).

Em cultura de células de corpo cavernoso de humanos, RAJASEKARAN et al. (1998), encontraram a expressão do RNA-mensageiro tanto da eNOS

quanto da NOS induzida, no entanto o papel fisiológico da NOS induzida não está ainda determinada (SAENZ DE TEJADA, 2000).

Na análise de frações subcelulares de células endoteliais em cultura, verificou-se que 95% da atividade enzimática da NOS estava diretamente correlacionada à fração particulada da enzima (fração ligada à membrana), contra apenas 5% de atividade na fração citosólica (FORSTERMANN et al., 1991). Para a sua atividade, a NOS endotelial requer cálcio/calmodulina, NADPH e 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (FORSTERMANN et al., 1991).

Castração de ratos e tratamento com o antiandrógeno flutamida reduzem a atividade da NOS constitutiva peniana ( CHAMNESS et al., 1995; LUGG et al., 1996; PENSON et al., 1996). A idade também parece diminuir a atividade da NOS: ratos jovens apresentam expressão de RNAm NOS maior e uma atividade da NOS também maior quando comparados com ratos idosos (GARBAN et al., 1995; CARRIER et al., 1997; DAHYIA et al., 1997).

Em humanos, a disfunção erétil em pacientes diabéticos pode estar relacionada à glicolização dos produtos finais da formação do NO (SEFTEL et al., 1997).

### **- Guanilato Ciclase**

Guanilato ciclase compreende uma família de enzimas que catalizam a conversão do guanilato trifosfato (GTP) em guanilato monofosfato cíclico (GMP<sub>c</sub>). Existem dois tipos de isoformas, a enzima ligada à membrana plasmática

(particulada) e a solúvel. Elas são reguladas por diversos agonistas extracelulares que incluem hormônios peptídicos, toxinas bacterianas e radicais livres (NO, por exemplo), assim como moléculas intracelulares, tais como o cálcio e nucleotídeos da adenosina (LUCAS et al, 2000).

Guanilato ciclase solúvel está em quase todas as células de mamíferos e media diversas funções fisiológicas, tais como inibição da agregação plaquetária, transdução do sinal neuronal, imunomodulação e relaxamento da musculatura lisa (COLLIER & VALLANCE, 1989).

KIM et al. (1998), demonstraram a produção de  $\text{GMP}_C$  por guanilato ciclase particulada no corpo cavernoso de ratos e de coelhos estimulada por alguns tipos de peptídeos natriuréticos. Porém, guanilato ciclase solúvel é provavelmente o receptor mais importante para o NO.

### **- Guanilato Monofosfato Cíclico ( $\text{GMP}_C$ )**

As respostas celulares de vários componentes endógenos e exógenos tais como autacóides, hormônios, neurotransmissores e algumas toxinas, são realizadas por guanilato monofosfato cíclico. O  $\text{GMP}_C$  é o produto da catalisação de guanilato ciclase sobre o GTP (LUCAS et al., 2000).

A acumulação de  $\text{GMP}_C$  no interior da célula desencadeia uma série de eventos que, em última análise, na célula muscular lisa, relaxa a musculatura. Três eventos principais devem ser considerados: a ação sobre os canais iônicos,

a ação sobre as proteínas quinases e a ação das fosfodiesterases na degradação do  $\text{GMP}_c$  (LUCAS et al., 2000).

Dois tipos diferentes de proteínas quinases GMP dependentes (cGK I e II) foram identificadas em mamíferos. Inativação da cGK I em ratos aboliu o relaxamento via NO/ $\text{GMP}_c$  tanto da musculatura lisa vascular quanto da musculatura lisa intestinal, e também inibiu a agregação plaquetária, causando hipertensão e distúrbios da hemostasia (PFEIFER et al., 1998). Corpos cavernosos de ratos com deficiência de cGK I têm muita dificuldade em relaxar a musculatura lisa em resposta à liberação de NO neuronal ou endotelial ou quando administrado exogenamente (HEDLUND et al, 2000a).

A cGK I é o maior mediador do relaxamento da musculatura lisa via NO/ $\text{GMP}_c$ . Sua ausência não pode ser compensada pela cascata de eventos desencadeada pelo adenilato monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) (ANDERSSON, 2001). A cGK II está ausente do sistema cardiovascular e é abundante no cérebro e intestino (UHLER, 1993).

Atualmente, sugere-se que a cGKI age como um modulador do cálcio intracelular. Embora a cGK I seja considerada o principal mediador dos efeitos do  $\text{GMP}_c$ , outras moléculas devem ser levadas em consideração, entre elas citar a proteína quinase A (PKA) (LUCAS et al., 2000).

O  $\text{GMP}_c$  media o relaxamento da musculatura lisa principalmente diminuindo a concentração de cálcio no interior da célula. Pode agir de quatro maneiras principais: reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{++}$ , aumentando o efluxo de  $\text{Ca}^{++}$ , promovendo

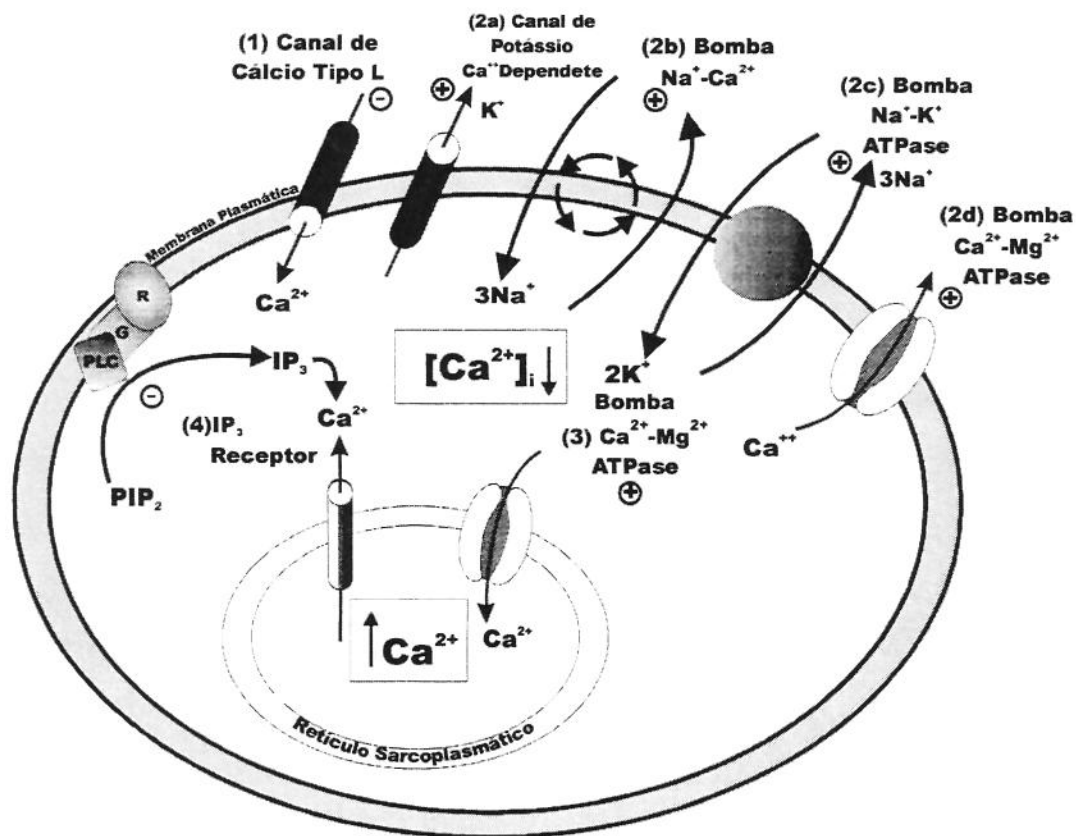
o sequestro de  $\text{Ca}^{++}$  para o interior do retículo sarcoplasmático e diminuindo a mobilização de  $\text{Ca}^{++}$  (LUCAS et al., 2000).

O GMPc reduz o cálcio intracelular, inibindo o influxo através dos canais de cálcio do tipo L, diminuindo a sua atividade e também indiretamente pela hiperpolarização da superfície da musculatura lisa através dos canais de  $\text{K}_{\text{Ce}^{++}}$ . Aumenta o efluxo de cálcio através da ativação da bomba de cálcio ATPase dependente e da bomba de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Esse GMPc pode produzir uma hiperpolarização da membrana plasmática através da ativação da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e de canais de  $\text{K}^+$ , aumentando, assim, a extrusão de cálcio para fora da célula pela bomba de troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Aumenta também o sequestro de cálcio pelo retículo sarcoplasmático através da ativação da bomba de cálcio ATPase presente na membrana do retículo sarcoplasmático. Diminui a mobilização de cálcio através da inibição do receptor de inositol trifosfato (IP3) na membrana do retículo sarcoplasmático (LUCAS et al., 2000) (Figura 12).

### **- Fosfodiesterases**

As fosfodiesterases catalisam a hidrólise dos segundos mensageiros AMPc e GMPc que estão envolvidos no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso. A superfamília das fosfodiesterases pode ser subdividida em pelo menos 11 famílias. Mais de 40 isoformas foram identificadas até agora (ANDERSSON, 2001).

No corpo cavernoso humano, pelo menos 13 isoenzimas foram identificadas. Fosfodiesterase 3 (PD3) e fosfodiesterase 5A (PD5A) parecem ser as mais importantes do ponto-de-vista-funcional (BOOLELL et al., 1996; BALLARD et al., 1998; BIVALACQUA et al., 1999; KUTHE et al., 2000; 2001). LIN et al. (2000) demonstraram a presença de três isoformas da fosfodiesterase 5 em corpo cavernoso humano. Duas dessas isoformas já haviam sido isoladas de outros tecidos que não o pênis, a PDE5A1 e a PDE5A2. A terceira isoforma, chamada PDE5A3, fica confinada a tecidos com musculatura lisa ou músculo cardíaco.



R : Receptor

G: Proteínas

PLC: Fosfolipase

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

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil inositol difosfato

**Figura 12.** Mecanismo de ação do GMP cíclico no Relaxamento da musculatura lisa (Lucas et al 2000).

## Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP)

O pênis humano apresenta nervos contendo VIP, de acordo com estudos imunohistoquímicos (CROWE et al., 1983). A maioria destes nervos também apresentam imunorreatividade para NOS. Parece que estes nervos que apresentam NOS e VIP são colinérgicos, visto que também contêm VACHT ("vesicular acetylcholine transporter"), que é um marcador específico para neurônios colinérgicos (HEDLUND, ALM, ANDERSSON, 1999).

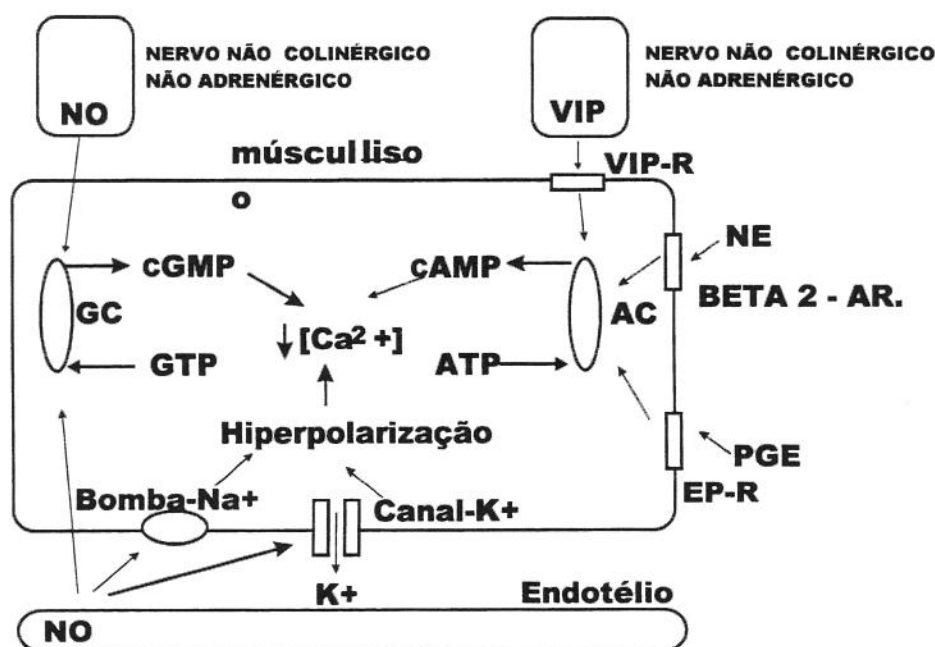
O VIP tem dois tipos de receptores (1 e 2) que estão ligados a uma proteína G na membrana plasmática acoplada a adenilato ciclase (McDONALD et al., 1998). Portanto, o mecanismo de ação do VIP se faz através da estimulação de adenilato ciclase, produzindo o AMPc, que por sua vez, ativa a proteína quinase AMPc-dependente (PKA) (HEDLUND et al., 1995 (Figura 13).

O VIP quando administrado a segmentos de corpo cavernoso humano, produz relaxamento. Quando administrado no interior do corpo cavernoso de homens potentes, não produz ereção (ANDERSSON, 2001b).

KIELY, BLOOM, WILLIAMS (1989) injetaram VIP, papaverina e uma associação destas drogas com a fentolamina no interior do corpo cavernoso de 12 homens impotentes e observaram que o VIP isoladamente não produziu ereção. Mas, quando associado com a papaverina, produziu rigidez peniana semelhante àquela da associação de papaverina e fentolamina.



É inegável que o VIP tem uma ação relaxante na musculatura lisa peniana *in vitro*, no entanto, o seu papel como neurotransmissor ainda não tenha sido esclarecido (ANDERSSON, 2000).



GC: Guanilato ciclase GTP: Guanagina trifosfato GMPc: Guanosina nanofosfoto cíclico  
 AMPc: Adenosina manofosfato cíclica ATP: Adenosina trifosfato AC: Adenilato ciclase  
 VIP: Polipeptídeo vasointestinal VIP-R: Receptor de VIP NE: Norepinefrina  
 PGE: Prostaglandina E GPR: Receptor de prostaglandina E

**Figura13.** Mecanismo de ação do polipeptídeo vaso intestinal no relaxamento da musculatura lisa (JARDIN et al., 2000).

- **Prostanóides**

Em 1930, dois ginecologistas, Kurzrok e Lieb, observaram que seguimentos de útero humano relaxavam ou contraíam quando expostos ao sêmen humano. Poucos anos mais tarde, Goldblatt, na Inglaterra e Von Euler, na Suécia, reportaram vasodilatação e contração da musculatura lisa desencadeada pelo líquido seminal. Von Euler identificou o material como sendo um ácido lipídico solúvel que ele nomeou prostaglandina (CAMPBELL & HALUSHKA, 1996).

A família das prostaglandinas, leucotrienos e produtos relacionados são chamados eicosanóides, porque são derivados de ácidos graxos poliinsaturados essenciais de 20 carbonos. O precursor natural dos eicosanóides é o ácido aracdônico que está ligado a fosfolípides aderidos à membrana plasmática e que são liberados pela ação da fosfolipase A2. Os eicosanóides existem em praticamente todos os tecidos e são moduladores ou mediadores de um número considerável de processos biológicos (PORST, 1996).

O ácido aracdônico pode ser metabolizado de duas maneiras: através da ciclooxigenase ou da lipooxigenase. Os produtos da catalização da ciclooxigenase são as prostaglandinas e os tromboxanos. Os produtos da catalização da lipooxigenase são os ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETEs) e os leucotrienos (CAMPBELL & HALUSHKA, 1996).

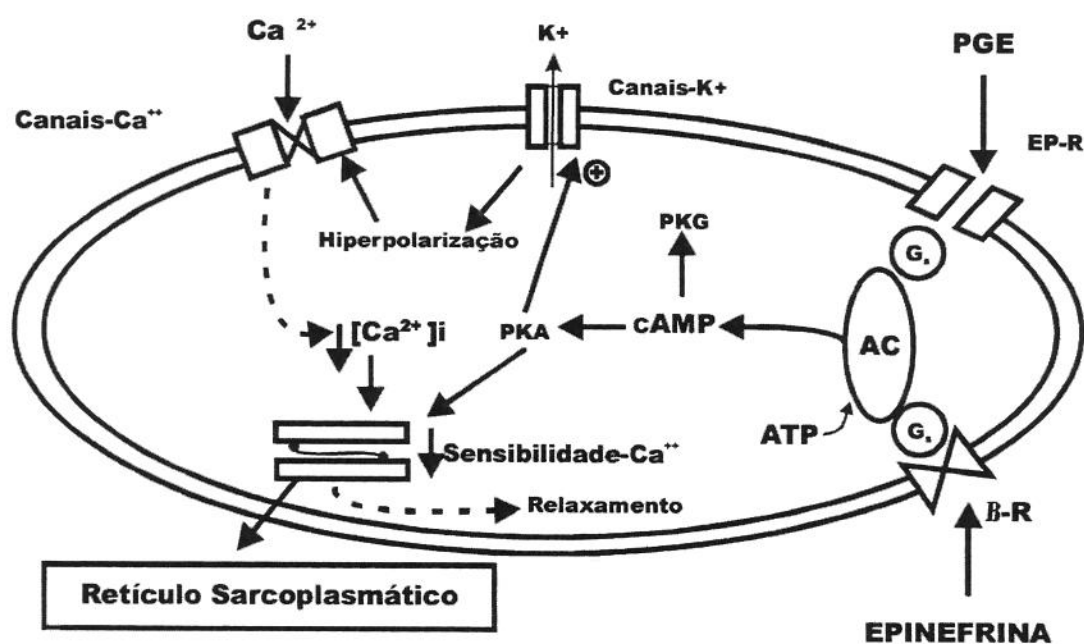
Antiinflamatórios não esteróides, como a aspirina e a indometacina, inibem a síntese de prostaglandinas (VANE, 1971). É conhecido hoje que esta inibição se faz através da inibição da ciclooxigenase (PIPER, 1984).

O corpo cavernoso humano tem a habilidade de sintetizar vários prostanóides (MINHAS, CARTLEDGE, EARDLEY, 2000). Os metabólitos da ciclooxigenase  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  e tromboxano  $A_2$  agem através de cinco grupos de receptores que mediam seus efeitos, a saber, receptor DP, EP, FP, IP e TP, respectivamente (MORELAND et al., 1999). Estes receptores estão acoplados à proteína G com diferentes sistemas de transdução (COLEMAN, SMITH, NARUMIYA, 1994; PIERCE et al., 1995; NARUMIYA, SUGIMOTO, USHIKUBI, 1999). Com relação aos receptores de prostaglandina E, existem quatro subtipos (EP1, EP2, EP3 e EP4) baseados em informações fisiológicas e de clonagem molecular (COLEMAN et al., 1994; TOH, ICHIKAWA, NARUMIYA, 1995).

Os prostanóides  $PGF_{2\alpha}$ , tromboxano  $A_2$  e  $PGI_2$  contraem a musculatura lisa do corpo cavernoso, assim como as prostaglandinas  $PGE_1$  e  $PGE_2$  relaxam a musculatura lisa, estimulando receptores EP2 e EP4 (PORST, 1996).

A prostaglandina  $E_1$ , ligando-se aos seus receptores EP2 e EP4, estimula adenilato ciclase, que catalisa a formação do AMP cíclico. Este estimula a proteína quinase A (PKA) e, em menor escala, a proteína quinase G (PKG). A PKA por sua vez, estimula os canais de potássio cálcio sensível, resultando em hiperpolarização da membrana plasmática. Com isso, ocorre uma diminuição do fluxo de cálcio através dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependente,

resultando em relaxamento da musculatura lisa (LEE et al., 1999). A PKG, especificamente a cGKI, fosforila a fosfolamban, uma proteína que normalmente inibe a bomba de  $\text{Ca}^{++}$  dentro da membrana do retículo sarcoplasmático. A bomba de  $\text{Ca}^{++}$  é então ativada e, conseqüentemente, mobiliza o cálcio do sarcoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático. O nível de cálcio citoplasmático diminui, trazendo relaxamento da musculatura lisa. As proteínas quinases também ativam as bombas de cálcio na membrana plasmática, aumentando o efluxo de cálcio para fora da célula (SOMLYO & SOMLYO, 1994; KARAKI et al., 1997) (Figura 14).



PGE: Prostaglandina E - EP-R: Receptor de PGE - PKA: Proteína quinina A  
 PKG: Proteína quinina G - AC: Adenil ciclase - G: Proteína G  
 BR: Receptor beta - ATP: Adenosina trifosfato - AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

**Figura 14.** Mecanismo de ação da prostaglandina no relaxamento da musculatura lisa. (JARDIN et al., 2000).

Segundo MOLDERINGS, MALINOWSKA, SCHLICKE (1992) a noradrenalina liberada no interior dos corpos cavernosos de humanos é modulada por receptores pré- sinápticos para prostaglandina E1 E2. Em estudos com corpo cavernoso de coelhos *in vitro*, ITALIANO, CALABRO, PAGANO (1994), verificaram que a PGE1 possui efeitos antiadrenérgicos através da inibição da liberação de noradrenalina. Portanto, a PGE1 exerce seus efeitos de relaxamento da musculatura lisa não somente através do efeito direto via AMPc, mas também inibe o sistema simpático.

- **Peptídeo Gene Relacionado da Calcitonina**

O peptídeo gene-relacionado da calcitonina é um peptídeo com 37 aminoácidos e é conhecido como um potente vasodilatador em uma variedade de vasos sangüíneos, nos quais acredita-se produzir um relaxamento da musculatura lisa endotélio-dependente (CROSSMAN et al., 1987; ALMEGARD & ANDERSSON, 1993). STIEF et al. (1990) demonstraram o peptídeo gene-relacionado da calcitonina em nervos de corpo cavernoso humano. Em humanos, STIEF et al. (1991) mostraram que o PGRC aplicado no interior dos corpos cavernosos aumentou o fluxo das artérias penianas e provocou um relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos. No entanto, não se sabe ainda se este peptídeo tem um papel na fisiologia da ereção.

Adrenomedulina é um peptídeo vasodilatador isolado de células de feocromocitoma humano. Consiste de 52 aminoácidos e tem similaridades

estruturais com o PGRC. Atribui-se que a adrenomedulina tenha um papel regulador da pressão arterial sistêmica

(KITAMURA et al., 1993). CHAMPION et al. (1997) relataram que adrenomedulina injetada no interior de corpos cavernosos de gatos aumentou a pressão intracavernosa e o comprimento peniano. Ainda assim, não sabemos ainda o papel deste peptídeo na fisiologia da ereção.

### **1.5. Cininogênios, calicreínas e cininas**

Por meio de uma ação enzimática, as calicreínas liberam peptídeos vasoativos chamadas cininas de substratos endógenos chamados cininogênios (MULLER-ESTERL, 1989).

Em mamíferos, existem três tipos de cininogênios descritos: H-cininogênio (HK - uma forma de alto peso molecular encontrada no sangue), L-cininogênio (LK – forma de baixo peso molecular presente no sangue e em alguns tecidos) e o T-cininogênio que somente ocorre em ratos (OKAMOTO & GREENBAUM, 1983).

Enzimas que possuem a propriedade de liberar cininas de cininogênios são coletivamente chamadas cininogenases. Este termo genérico inclui enzimas tais como as calicreínas plasmáticas e teciduais, tripsina, plasmina e veneno de cobra (*Borthrops jararaca*). Calicreínas podem possuir funções únicas ou múltiplas em cada tipo celular, no entanto sua função principal é a liberação de cininas (BHOOLA, FIGUEROA, WORTHY, 1992).

Cininas são peptídeos vasoativos que influenciam uma série de processos biológicos. Bradicinina (BK), Lys-bradicinina (L-BK) e Met-Lys-bradicinina (ML-BK) são os nomes de algumas das principais cininas. ROCHA E SILVA, BERALDO, ROSENFELD (1949), incubando extrato de veneno de cobra (*Bothrops jararaca*) ou tripsina com plasma de cachorro, observaram que se formava uma substância que produzia uma contração lenta e retardada em íleo isolado de porquinho da Índia. Usando a nomenclatura grega, os autores chamaram esta substância de bradicinina (*brady* significando lento e *kinin* significando movimento) (BHOOLA et al., 1992).

As cininas são hipotensivas, aumentam a permeabilidade vascular, são potentes produtores de autacóides relacionados com a dor, contraem a musculatura da árvore broncopulmonar, intestino e útero e aumentam a motilidade espermática. Dois tipos de receptores são conhecidos (BK1 e BK2) que estão acoplados à proteína G (BHOOLA et al., 1992).

A bradicinina e seus análogos liberam óxido nítrico e/ou prostaciclina de células endoteliais (DE NUCCI et al., 1988; DE NUCCI, WARNER, VANE, 1988; D'ORLEANS-JUSTE, DE NUCCI, VANE, 1989), levando a um relaxamento de diferentes vasos sanguíneos via ativação de receptores B1 ou B2 (REGOLI et al., 1990). Bradicinina também causa relaxamento endotélio-dependente de corpo cavernoso de coelho (KIMOTO, KESSLER, CONSTANTINOU, 1990) e de humanos (KIMOTO et al., 1992).



Quando produzidos, as diferentes cininas são inativadas rapidamente por peptidases chamadas cininases, que são encontradas no sangue e nos tecidos. Existem duas famílias de cininases: KI e KII (ERDOS, 1990). Dentro do grupo KII, está a enzima KII-ACE (cininase II – enzima conversora de angiotensina I). Ela degrada a bradicinina circulante durante a sua passagem pelos pulmões (KRONEBERG & STOEPEL, 1963; FERREIRA & VANE, 1967; VANE, 1969). Ao mesmo tempo, a enzima converte a angiotensina I em angiotensina II (HELMER, 1957; BIRON, 1968; YANG, ERDOS, LEVIN, 1970).

## 2. Objetivo

---

### 2.1. Objetivo

Caracterizar o receptor envolvido no relaxamento de corpo cavernoso humano isolado induzido por agonistas B1/B2 (bradicinina, lys-bradicinina e met-lys-bradicinina) e agonista B1 (des-arg<sup>9</sup>-bradicinina).

### **3. Casuística e Métodos**

---

Foram utilizados os corpos cavernosos de sete pacientes em morte encefálica, doadores de múltiplos órgãos com idades variando de 17 a 46 anos. Nenhum paciente tinha história pregressa de disfunção erétil e nenhum dos pacientes era previamente diabético. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP. Para todos os cadáveres, foi solicitado da família o consentimento para a retirada do tecido erétil. Este tecido era retirado da parte proximal dos corpos cavernosos, localizado no períneo, e a incisão foi a mesma para a retirada dos órgãos abdominais, ou seja, através de uma incisão xifopúbica ampliada até a base do pênis.

Abordava-se o períneo e retirava-se cerca de 4cm de cada corpo cavernoso. A parte pendular dos corpos cavernosos (pênis) era mantida. Sendo assim, não havia nenhuma mutilação do paciente.

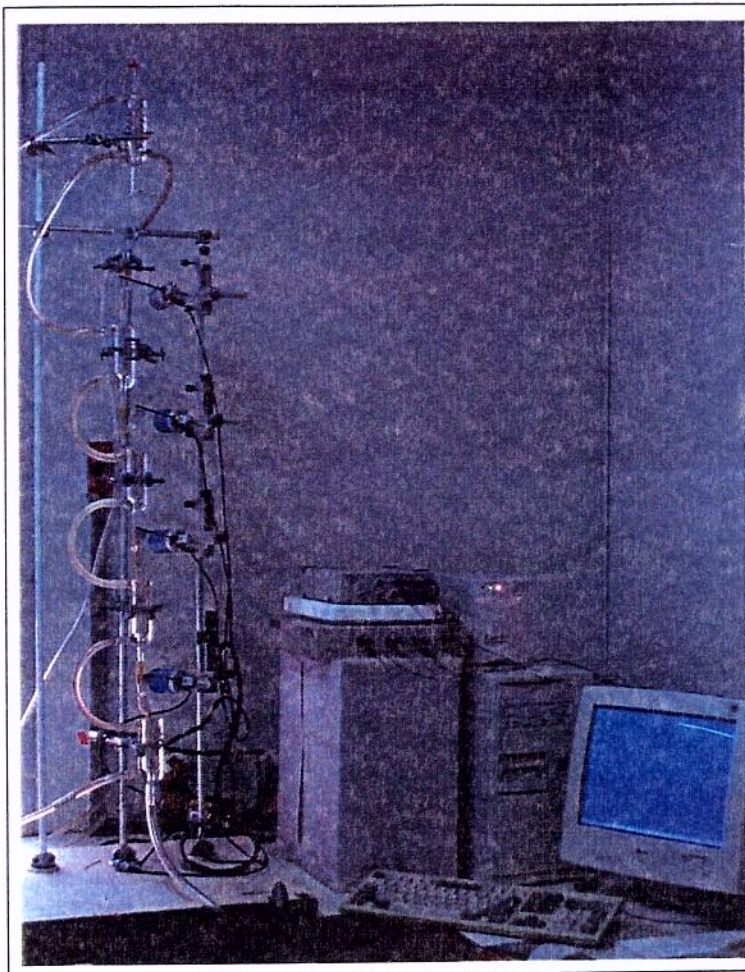
O corpo cavernoso retirado, que se encontrava envolto com a túnica albugínea, era colocado imediatamente em uma solução de krebs e mantido à 4°C até o seu uso (nunca superior à 24 horas após a remoção).

Todo corpo cavernoso era dissecado previamente ao seu uso. Retirava-se a túnica albugínea, ficando somente com o corpo cavernoso propriamente dito, que era então cortado em segmentos de aproximadamente 2cm de comprimento.

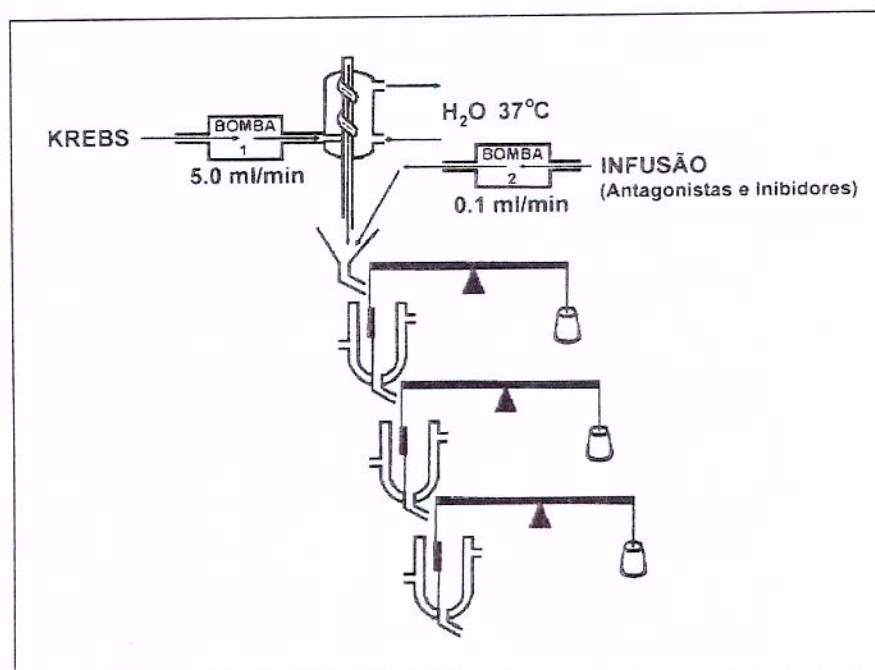
Os segmentos foram montados em cascata (VANE, 1964) (Figura 15 e 16) sob tensão de 2,5 g e superfundidos com solução de Krebs-Ringer aquecida à 37°C e aerada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Os tecidos foram ligados a alavancas conectadas a transdutores isotônicos (Harvard) para músculo liso. As respostas foram registradas em um polígrafo de seis canais (Watanabe, WR 3101). Após estabilização dos tecidos (90 minutos), eles foram continuamente infundidos (0,1ml/min) com indometacina (5,6µM) com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas.

O tônus dos tecidos foi induzido por infusão contínua (0,1ml/min) de noradrenalina (3,0µM). A sensibilidade dos transdutores foi então ajustada para produzir relaxamentos de magnitudes similares, usando-se o gliceriltrinitrato (GTN) como padrão. A acetilcolina foi utilizada como controle para teste da integridade endotelial do tecido cavernoso. Os agonistas foram administrados sob a forma de *bolus* (10–100 µl). Os antagonistas e inibidores, por sua vez, foram administrados por infusão contínua (0,1ml/min), por aproximadamente 20 minutos antes de administrar os agentes em estudo.

**Figura 15.**  
Sistema de Cascata.



**Figura 16.**  
Esquema do  
Sistema de  
Cascata.



### 3.1. Drogas

As drogas utilizadas neste estudo foram: acetilcolina, noradrenalina, indometacina, histamina, tetrodotoxina (TTX), L-arginina, Nw-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), bradicinina (BK), lis-bradicinina (L-BK), met-lis-bradicinina (ML-BK), des-arg-bradicinina (des-arg-BK) foram obtidos de Sigma (Saint Louis, MO, EUA). Gliceril trinitrato (ampolas contendo 1mg/ml de solução isotônica) foi obtido de Lipha Pharmaceuticals Ltd. (West Drayton, Middlesex, Reino Unido). Hoe 140 foi gentilmente cedido pela Hoechst AG (Frankfurt, Alemanha). 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-alquinoxalin-1-one] (ODQ) foi obtido de Tocris Cookson Inc. (Saint Louis, EUA).

A solução de krebs (pH 7,4 ) tinha a seguinte composição (mmol/L): NaCl 118, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,17,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,5,  $\text{NaHCO}_3$  25 e glicose 5,6.

### 3.2. Análise Estatística

O relaxamento induzido pelos agonistas (Ach, histamina e cininas) foi medido e calculado como uma percentagem do relaxamento máximo induzido pelo GTN (dose em nmol). Os resultados foram expressos como a média de  $n$  experimentos. O teste não-paramétrico  $t$  de Student e ANOVA foram usados para avaliar os dados, com significância assumida de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

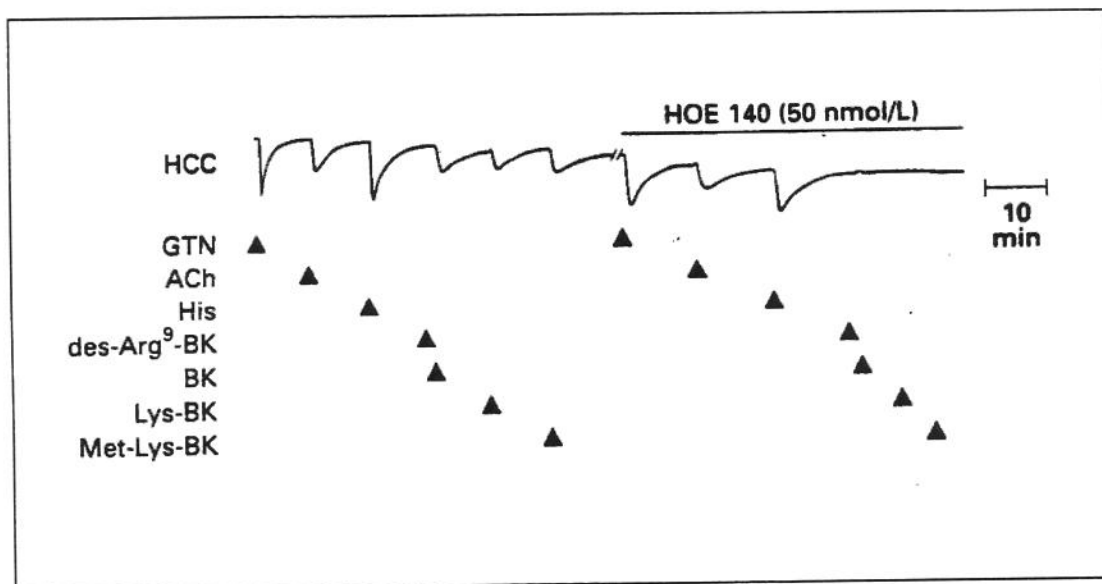
---

### 4.1. Efeito do antagonista do receptor de cinina B2 Hoe 140

A injeção em *bolus* de GTN (4,3mmol), de Acetilcolina (180nmol), de histamina (100nmol), bradicinina (1–30nmol), lis-bradicinina (1–30 nmol) e met-lis-bradicinina (1–30 nmol) relaxaram significativamente os segmentos de corpo cavernoso (Figura 17). Em base molar, não houve diferença estatisticamente diferente entre o relaxamento induzido por BK, L-BK e ML-BK com a dose efetiva para 50% de inibição ( $ED_{50}$ ), sendo 1,5, 1,3, e 1,4 nmol, respectivamente (seis segmentos). Em contraste, o agonista do receptor de cinina B1, des-arg-BK (30 nmol), não teve efeito nos seis segmentos de tecido.

A infusão de Hoe 140 (50 nmol/L) aboliu virtualmente o relaxamento induzido por BK, L-BK e ML-BK sem afetar aqueles induzidos por acetilcolina (180 nmol; 58 (9)% antes e 65 (8)% durante a infusão de Hoe 140) e histamina (100 nmol; 97 (11)% antes e 92 (8)% durante a infusão de Hoe 140 (Figura 17). Na concentração utilizada, Hoe 140 não teve nenhum efeito no tônus dos segmentos de corpo cavernoso.





**Figura 17.** O antagonista do receptor B<sub>2</sub> de cininas HOE 140 (50 nmol/L) inibiu o relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso humano (CCH) induzido por BK (30 nmol/L), L-BK (30 nmol/L) e ML-BK (30 nmol/L). Note que o agonista de receptor B<sub>1</sub> des-Arg<sup>9</sup>-BK (30 nmol) não teve efeito nos segmentos de CCH. A infusão de HOE 140 não afetou o tônus dos segmentos de CCH nem o relaxamento induzido por GTN (4,3 nmol/L), Ach (180 nmol/L) e histamina (His, 100 nmol/L I).

#### 4.2. Envolvimento do óxido nítrico no relaxamento dos segmentos de corpos cavernosos mediado por cininas

A infusão do inibidor de óxido nítrico sintase L-NAME (10µmol/L, oito segmentos) aumentou o tônus dos segmentos de corpo cavernoso (Figura 18) e reduziu acentuadamente ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido por acetilcolina (60 nmol), BK (10 nmol l), L-BK (10mmmol) e ML-BK (10 nmol; Tabela 1). O relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso induzido pelo GTN (4,3 nmol) não foi afetado por L-NAME (Figura 18). A infusão subsequente de L-arginina (300µmol/L, oito segmentos) reverteu parcialmente o tônus (Figura 18) e restaurou significativamente ( $p < 0,01$ ) o relaxamento induzido por BK, L-BK e ML-BK (Tabela 1).

**TABELA 1**

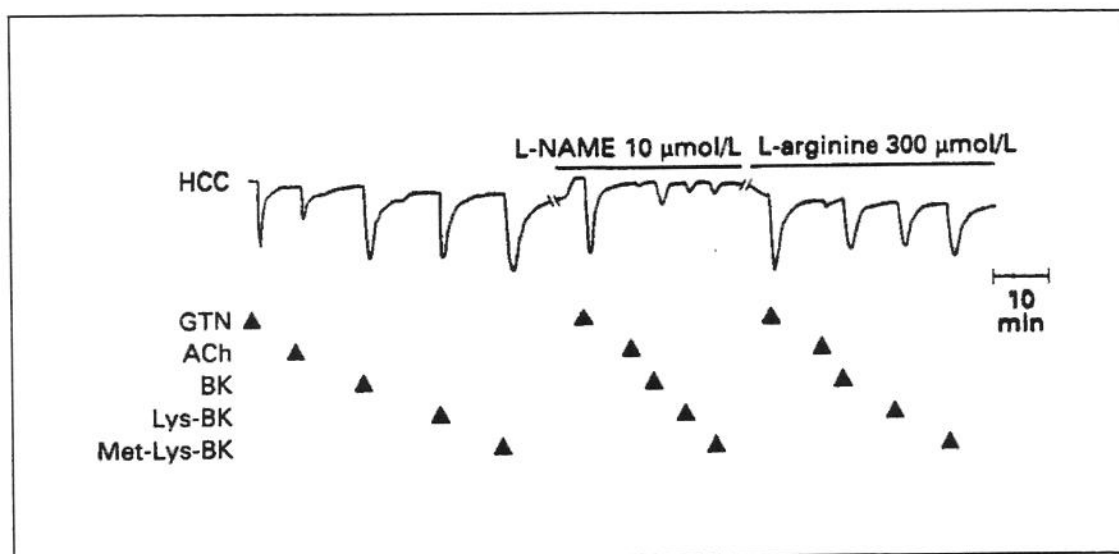
**Efeito do L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico) (10µmol/L) e L-Arginina (300µmol/L) no relaxamento do corpo cavernoso humano (CCH) (%) induzido por acetilcolina (Ach), bradicinina (BK), Lys-Bradícinina (Lys-BK) e Met-Lys-Bradícinina (Met- Lys- BK).**

Agentes	Controle	CCH (%Relaxamento) L-NAME	L-ARGININA
Ach (60mmmol)	28 ( 4)	3 (0,5) †	5 ( 1) *
Bk (10mmmol)	76 ( 9)	20 ( 5 ) †	62 (10) *
Lys – BK (10mmmol)	69 ( 6)	7 (3,5) †	53 ( 7) *
Met – Lys-Bk	71 (80)	9 ( 4 ) †	56 ( 8) *

\*  $p < 0,05$  comparado com os valores de L-NAME

†  $p < 0,01$  comparado com os valores dos controles.

Na Tabela 1 o relaxamento induzido por Ach e cininas foi medido e calculado como uma porcentagem do relaxamento máximo induzido por gliceril trinitrato (GTN). Os resultados são a média de oito fragmentos de corpo cavernoso humano testados.



**Figura 18:** Efeito do L-name (10 nmol/L) e L-arginina (300 nmol/L) em segmento de corpo cavernoso humano (CCH). A infusão de L-name aumentou o tônus dos segmentos e reduziu acentuadamente o relaxamento induzido por Ach (180 nmol/L), BK (30 nmol/L), L-BK (30 nmol/L) e ML-BK (30 nmol/L). O relaxamento induzido por GTN (4,3 nmol/L) não foi afetado significativamente por L-name. A infusão subsequente de L-arginina reverteu parcialmente a hipertonicidade dos fragmentos e também reverteu parcialmente o relaxamento induzido por cíninas.

A Figura 19 indica que a infusão de ODQ (1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3, - alquinoxacin -1 - one] - inibidor da guanilato ciclase) (10  $\mu\text{mol/L}$ , nove segmentos) aumentou significativamente o t nus dos segmentos de corpo cavernoso e diminuiu acentuadamente o relaxamento induzido por acetilcolina (180nmol; 54 (10)% antes e 1,5 (0,5)% durante a infusão de ODQ,  $p < 0,01$ ), BK (30 nmol; 70 (8)% antes e 3,5 (0,5)% durante infusão de ODQ,  $p < 0,01$ ). O relaxamento induzido por GTN (4,3 nmol) foi também significativamente reduzido com a infusão de ODQ, com 93 (2)% de inibição (  $p < 0,01$ ). O relaxamento evocado por estes agentes foi parcialmente restaurado 30 minutos após a parada da infusão do ODQ (Figura 19).

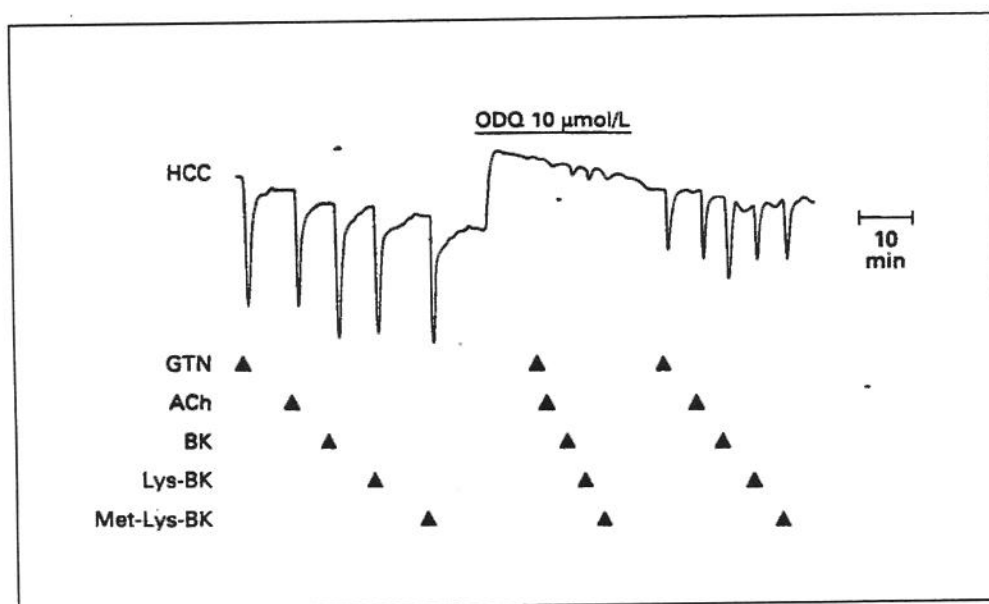


Figura 19: Inibição do relaxamento da musculatura lisa de corpo cavernoso pelo inibidor da guanilato ciclase solúvel ODQ ( $\mu\text{mol/L}$ ) induzido por

GTN (4,3 nmol), Ach ( 180 nmol), BK (30 nmol), L-BK (30 nmol) e ML-BK (30 nmol). A infusão de ODQ aumentou o tônus dos tecidos e aboliu o relaxamento induzido pelos agonistas. Após a infusão, o relaxamento foi parcialmente restabelecido.

A infusão de tetrodotoxina (TTX) (1 $\mu$ mol/L) não afetou o relaxamento induzido por acetilcolina (60 nmol; 50 (9)% antes e 68 (12) durante a infusão de TTX) e BK (10 nmol; 92 (7)% antes e 87 (6)% durante a infusão de TTX). Tetrodotoxina também não teve nenhum efeito no relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso induzido por GTN (dados não mostrados).

## 5. Discussão

---

Este estudo demonstrou que a bradicinina, lys-bradicinina e met-lys-bradicinina (mas não a des-arg<sup>9</sup>-bradicinina) relaxa preparações *in vitro* de corpo cavernoso humano, indicando a existência de receptores B2 funcionais de cininas no tecido erétil humano. O relaxamento induzido por cininas foi causado pela liberação de óxido nítrico dos segmentos de corpo cavernoso, visto que o inibidor de síntese de óxido nítrico L-NAME reduziu acentuadamente o relaxamento e a L-arginina reverteu significativamente esta inibição. Isto foi confirmado usando ODQ, um inibidor potente e seletivo de guanilato ciclase (GARTHWAITE et al, 1995), que virtualmente inibiu o relaxamento cinina-induzido.

KIMOTO et al., (1990) estudando segmentos de corpo cavernoso de humanos isolados em banho, provaram que a bradicinina relaxa os segmentos de corpo cavernoso. Estes relaxamentos desapareciam com exposição prolongada a bradicinina, o que pode ser explicado pela dessensibilização e/ou a uma liberação transitória de fator relaxante endotélio-dependente. Demonstraram também que a bradicinina é liberada das células endoteliais do corpo cavernoso.

BECKER et al. (2001b), ao estudar segmentos de corpo cavernoso isolado de indivíduos que foram submetidos à cirurgia de mudança de sexo (masculino para feminino), confirmaram a liberação de óxido nítrico induzido pela bradicinina. Expondo as preparações de corpo cavernoso a 0,01  $\mu$ M de bradicinina e 0,01 $\mu$ M de forskolin, verificaram que houve um aumento de 58 vezes e sete vezes nos níveis teciduais de AMPc, respectivamente. Assim sendo, 0,01  $\mu$ M de bradicinina aumentou sete vezes mais os níveis teciduais de AMPc, quando comparado com o forskolin. Expondo ainda as preparações de corpo cavernoso a 0,01 $\mu$ M de bradicinina e a mesma dosagem de nitroprussiato de sódio, verificaram que houve um aumento de duas vezes no total de GMPc.

BECKER e colaboradores (2001b) acreditam que os mecanismos de relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso induzido por bradicinina geralmente envolve o ciclo adenil ciclase-AMP cíclico e, em menor grau, o ciclo guanilato ciclase-GMP cíclico. No entanto, neste trabalho utilizamos a indometacina para inibir a ciclooxygenase (produção de prostaglandinas e leucotrienos) e verificou-se que mesmo assim houve relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso, demonstrando a importância do sistema guanilato ciclase-GMP cíclico no relaxamento desta musculatura.

D'ORLEANS-JUSTE et al., (1989) mostraram que a bradicinina induz à liberação de fator relaxante derivado do endotélio e prostaciclina ( $PGI_2$ ) de células endoteliais de aorta bovina em cultura, portanto ativando tanto o sistema NO/GMPc quanto o sistema prostaglandina e produção de AMPc.



DE NUCCI et al., (1988) verificaram que, em pulmões isolados de porquinhos da Índia perfundidos com solução de krebs, o captopril inibiu o metabolismo da bradicinina e a conversão de angiotensina I em angiotensina II. O captopril aumentou significativamente a produção de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), induzido pela bradicinina.

O envolvimento apenas do receptor B2 para cininas foi comprovado pelo relaxamento da musculatura lisa pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, e não pelo agonista para receptores B1 de cininas, a Des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina.

As cininas mediam seus efeitos através da ativação de receptores para cininas que são de dois tipos, B1 e B2 (REGOLI & BARABE, 1980).

O receptor B1 foi pela primeira vez definido como mediando os efeitos contráteis de cininas na aorta isolada de coelhos (REGOLI, BARABE, PARK, 1977). Os receptores B1 estão geralmente ausentes em tecidos normais, mas, após um processo inflamatório, este receptor é expresso em vários tipos de células, incluindo as células musculares lisas vasculares, células endoteliais e fibroblastos (MCLEAN, PERRETTI, AHLUWALIA, 2000). A ordem da potência agonística das cininas para os receptores B1 é Des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina > Tyr(Me)<sup>8</sup>-bradicinina > bradicinina com uma ordem reversa, quando considerado o receptor B2, ou seja, bradicinina > Tyr(Me)<sup>8</sup>-bradicinina > Des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (REGOLI & BARABE, 1980). Talvez neste estudo os segmentos de corpo cavernoso humano não responderam à Des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina pela não expressão

dos receptores B1 nas células endoteliais e células musculares lisas do corpo cavernoso, ou então pelo fato de, estando presentes os receptores B1, a sua função fisiológica seja outra que relaxamento e contração da musculatura lisa.

O receptor B2 media a maioria das ações da bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, o que não é verdade para a Des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (REGOLI & BARABE, 1980).

Os níveis teciduais de bradicinina e de angiotensina II e os diferentes modos de ação destes peptídeos na musculatura lisa do corpo cavernoso humano são regulados por uma única enzima - a enzima conversora de angiotensina (ACE). A ACE, também conhecida como KII-ACE, por ser uma cininase II, é uma peptidilpeptidase que hidrolisa a ligação Pro-Phe da molécula de cinina. A bradicinina circulante é inativada principalmente durante a sua passagem pelos pulmões (KRONEBERG & STOEPEL, 1963; FERREIRA & VANE, 1967; VANE, 1969). Ao mesmo tempo, esta enzima converte a angiotensina I (decapeptídeo) em angiotensina II (octapeptídeo).

Embora a enzima conversora de angiotensina tenha sido descrita por SKEGGS, KAHN, SHUMWAY em 1956, foi somente na década de 70 (YANG et al., 1970; IGIC et al., 1972) realmente se considerou que as ações de degradação da bradicinina delegada para a cininase II (KII) e a conversão da angiotensina I para angiotensina II atribuída para a enzima de conversão da angiotensina eram executadas pela mesma enzima, ou seja, a cininase II – enzima conversora de angiotensina (KII-ACE).

A KII-ACE aparece como uma enzima solúvel em fluidos biológicos, também estando presente no endotélio vascular (CALDWELL et al., 1976; RYAN et al., 1976).

Inibidores da KII-ACE foram desenvolvidos quando o modo de ação de peptídeos potencializadores de bradicinina, derivados de venenos de cobra e fibrinopeptídeos, foram elucidados (BHOOLA et al., 1992).

O coração de rato parece conter uma proteína que competitivamente inibe a KII-ACE (IKEMOTO et al., 1989). Baseado na estrutura de peptídeos potencializadores da bradicinina, desenvolveu-se a primeira geração de inibidores da KII-ACE, para uso clínico no tratamento da hipertensão. A eficácia dos inibidores de KII-ACE, julgado como sendo a diminuição da pressão arterial, nem sempre se correlaciona com os níveis de inibição da enzima circulante, mas sim com uma redução da atividade da enzima no cérebro, rins e musculatura lisa vascular (UNGER, GANTEN, LANG, 1987). Um achado contraditório no rato é o aumento na atividade da KII-ACE cortical, quando se administra captopril por uma semana (SONG et al., 1988; IKEMOTO et al., 1990).

Em experimentos para elucidar a sua importância clínica, usando corações de ratos e porquinhos da Índia isolados, foram observados efeitos benéficos com o uso de inibidores da ACE em arritmias de reperfusão, função cardíaca e metabolismo do músculo cardíaco. Acredita-se que esta melhora funcional do coração isolado destes animais, se deva à redução dos níveis locais de angiotensina II e da prevenção da degradação de cininas (SCHÖLKENS & LINZ, 1988; LINZ,

MARTORANA, SCHOLKENS, 1990). Os efeitos hipotensivos (relaxamento da musculatura lisa vascular) dos inibidores da KII-ACE (captopril, ramipril, etc) podem ser, pelo menos parcialmente, mediados pelos aumentos dos níveis circulantes de cininas, particularmente naqueles pacientes com uma baixa produção de renina; o aumento dos níveis plasmáticos de cininas está associado com aumentos na excreção de sódio e no volume urinário (IIMURA et al., 1986). Entretanto, o pré tratamento com indometacina inibe o efeito natriurético e atenua parcialmente o aumento no fluxo sangüíneo renal (MIURA et al., 1985). Claramente, se existe um controle da excreção de sódio regulado pelas cininas, este controle é exercido indiretamente através da liberação de prostanóides. Sendo assim, verifica-se que existe uma correlação nítida entre cininas e o sistema renina angiotensina no controle do tônus da musculatura lisa vascular e que os prostanóides exercem papel importante no relaxamento da musculatura lisa vascular, e conseqüentemente, na regulação da pressão arterial.

A bradiginina estimula neurônios sensoriais primários (KAUFMAN et al., 1980) e libera neuropeptídeos (substância P, peptídeo gene-relacionado da calcitonina e peptídeo vaso intestinal) de seus terminais periféricos em diferentes tecidos (GEPPETTI, 1993). Curiosamente, estudos imunorreativos revelaram a existência destes neuropeptídeos em nervos de corpo cavernoso de várias espécies (incluindo no do homem) sugerindo um papel destes na ereção peniana (GU et al., 1983; STIEF et al., 1991). Além disso, o peptídeo vasointestinal, o peptídeo gene-relacionado com a calcitonina e a substância P são capazes de relaxar segmentos de corpo cavernoso *in vitro* (ANDERSSON, MATTIASSON,

SJOGREN, 1983; STIEF et al., 1991). BURNETT et al. (1993) demonstraram, através de imuno-histoquímica, a presença de óxido nítrico sintase na inervação autonômica de pênis humano.

Tanto a ereção quanto a detumescência peniana são fenômenos complexos que envolvem mecanismos de controle humorais e neurais (MORLEY, 1986). A patofisiologia da impotência deve estar relacionada a um aumento do tônus da musculatura lisa dos corpos cavernosos secundário a um aumento da reatividade vascular para substâncias que produzem contração (CHRIST, STONE, MELMAN, 1991).

A grande freqüência de impotência em pacientes com hipertensão essencial, diabetes e doença coronariana sugere que ocorre um desequilíbrio na regulação de fatores constritores e relaxadores que regem o tônus da musculatura lisa vascular. Por este motivo há redução do fluxo sanguíneo regional em vários segmentos do leito vascular desses pacientes, que também é estendido para o tecido vascular do corpo cavernoso (SAENZ DE TEJADA et al., 1989; FELDMAN et al., 1994). A conseqüente falência em modular o fluxo sanguíneo peniano pode se manifestar como a disfunção erétil. A modulação da função erétil sendo mais complexa que a modulação do fluxo sanguíneo regional em outros segmentos extracavernosos do leito vascular, a disfunção erétil pode ser um sinal precoce das alterações vasoativas regulatórias do leito vascular (KIFOR et al., 1997).

A disfunção erétil decorrente do uso de drogas não é incomum e medicamentos que controlam a pressão arterial podem alterar a função erétil. A

disfunção erétil é uma das maiores preocupações em terapias anti-hipertensivas, mas quase todos os anti-hipertensivos estão associados com disfunção erétil. As drogas com maiores incidências de impotência são os betabloqueadores, diuréticos tiazídicos, reserpina, hidralazina, guanetidina, clonidina, acetazolamina, alfametildopa e bloqueadores de canal de cálcio (MORLEY, 1986). Estas drogas muito provavelmente causam disfunção erétil, por diminuírem a pressão arterial abaixo de níveis críticos para a manutenção de fluxo sanguíneo para a ereção peniana (SUZUKI et al., 1988). Considerando que os inibidores da cininase II – enzima conversora de angiotensina (ACE) - diminuem os níveis teciduais de angiotensina II e aumentam os níveis teciduais de bradicinina, devem ser os anti-hipertensivos de escolha, quando considerada a função erétil.

## 6. Conclusão

---

Este estudo demonstra claramente a existência funcional de receptores de cininas B<sub>2</sub> no tecido erétil de corpo cavernoso humano. A ativação dos receptores liberam óxido nítrico e, conseqüentemente, relaxam a musculatura lisa desses tecidos. Como a tetrodotoxina não conseguiu afetar o relaxamento induzido por cininas dos segmentos do corpo cavernoso humano, é provável que estes peptídeos liberem óxido nítrico do endotélio dos sinusóides, e não de neurônios que inervam o tecido cavernoso. Embora as calicreínas teciduais e seus produtos tenham sido encontrados no sistema reprodutor masculino, a importância fisiopatológica da sua presença nestes tecidos não está totalmente elucidada.



## **7. Referências Bibliográficas**

---

- ABOSEIF, S.R. & LUE, T.F. - Hemodynamics of penile erection. *Urol. Clin. North Am.*, **15**:1-7, 1988.
- ABOSEIF, S.T. & TANAGHO, E.A. - Anatomy of the Penis. In: HELLSTROM, W. - **Anatomy of the penis**. San Francisco, The American Society of Andrology, 1999. p.2-6.
- ALMEGARD, B. & ANDERSSON, S.E. - Vascular effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and cholecystokinin (CCK) in the monkey eye. *J. Ocul. Pharmacol.*, **9**:77-84, 1993.
- AMARENCO, G. & CASANOVA, J.M. - Lesion of the dorsal nerve of the penis in Peyronie's disease. *Prog. Urol.*, **1**:906-10, 1991.
- ANDERSSON, K.E.; MATTIASSON, A.; SJOGREN, C. - Electrically induced relaxation of the noradrenaline contracted isolated urethra from rabbit and man. *J. Urol.*, **129**:210-4, 1983.
- ANDERSSON, K.E. & WAGNER, G. - Physiology of penile erection. *Physiol. Rev*, **75**:191-236., 1995.

- ANDERSSON, K.E. - Neurotransmitters: central and peripheral mechanisms. *Int. J. Impot. Res.*, **12**:S26-S33, 2000.
- ANDERSSON, K.E. - Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev.*, **53**:417-50., 2001a.
- ANDERSSON, K.E. - Pharmacology of erectile function and dysfunction. *Urol. Clin. North Am.*, **28**:233-47, 2001b.
- ARI, G.; VARDI, Y.; HOFFMAN, A.; FINBERG, J.P. - Possible role for endothelins in penile erection. *Eur. J. Pharmacol.*, **307**:69-74., 1996.
- BALLARD, S.A.; GINGELL, C.J.; TANG, K.; TURNER, L.A.; PRICE, M.E.; NAYLOR, A.M. - 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**:2164-71, 1998.
- BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; SCHELLER, F.; KNAPP, W.H.; HARTMANN, U.; JONAS, U. - Plasma levels of angiotensin II during different penile conditions in the cavernous and systemic blood of healthy men and patients with erectile dysfunction. *Urology*, **58**:805-10, 2001a.
- BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; TRUSS, M.C.; MACHTENS, S.; SCHELLER, F.; KNAPP, W.H.; HARTMANN, U.; JONAS, U. - Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology*, **57**:193-8, 2001b.
- BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. - Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.*, **44**:1-80, 1992.
- BIRON, P. - Pulmonary extraction of bradykinin and eledoisin. *Rev. Can. Biol.*, **27**:75-6, 1968.

- BIVALACQUA, T.J.;CHAMPION, H.C.;RAJASEKARAN, M.;SIKKA, S.C.;KADOWITZ, P.J.;DOHERTY, P.C.; HELLSTROM, W.J. - Potentiation of erectile response and cAMP accumulation by combination of prostaglandin E1 and rolipram, a selective inhibitor of the type 4 phosphodiesterase (PDE 4). *J. Urol.*, **162**:1848-55, 1999.
- BOOLELL, M.;ALLEN, M.J.;BALLARD, S.A.;GEPI-ATTEE, S.;MUIRHEAD, G.J.;NAYLOR, A.M.;OSTERLOH, I.H.; GINGELL, C. - Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, **8**:47-52, 1996.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. - Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:682-5, 1990.
- BROWN, J. & TAYLOR, P. - Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.141-60.
- BURNETT, A.L.;TILLMAN, S.L.;CHANG, T.S.;EPSTEIN, J.I.;LOWENSTEIN, C.J.;BREDT, D.S.;SNYDER, S.H.; WALSH, P.C. - Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J. Urol.*, **150**:73-6, 1993.
- BURNETT, A.L.;NELSON, R.J.;CALVIN, D.C.;LIU, J.X.;DEMAS, G.E.;KLEIN, S.L.;KRIEGSFELD, L.J.;DAWSON, V.L.;DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. - Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol. Med.*, **2**:288-96, 1996.
- BUSH, P.A.;GONZALEZ, N.E.; IGNARRO, L.J. - Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**:308-14, 1992.

- CALDWELL, P.R.;SEEGAL, B.C.;HSU, K.C.;DAS, M.; SOFFER, R.L. - Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. **Science**, **191**:1050-1, 1976.
- CAMPBELL, W. & HALUSHKA, P. - Lipid-Derived Autacoids. Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.601-16.
- CARRIER, S.;NAGARAJU, P.;MORGAN, D.M.;BABA, K.;NUNES, L.; LUE, T.F. - Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. **J. Urol.**, **157**:1088-92, 1997.
- CHAKI, S. & INAGAMI, T. - Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **182**:388-94, 1992.
- CHAMNESS, S.L.;RICKER, D.D.;CRONE, J.K.;DEMBECK, C.L.;MAGUIRE, M.P.;BURNETT, A.L.; CHANG, T.S. - The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. **Fertil. Steril.**, **63**:1101-7, 1995.
- CHAMPION, H.C.;WANG, R.;SANTIAGO, J.A.;MURPHY, W.A.;COY, D.H.;KADOWITZ, P.J.; HELLSTROM, W.J. - Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the feline erection model. **J. Androl.**, **18**:513-21, 1997.
- CHRIST, G.J.;STONE, B.; MELMAN, A. - Age-dependent alterations in the efficacy of phenylephrine-induced contractions in vascular smooth muscle isolated from the corpus cavernosum of impotent men. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **69**:909-13, 1991.

- COLEMAN, R.A.;SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. - International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **46**:205-29, 1994.
- COLLIER, J. & VALLANCE, P. - Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **10**:427-31, 1989.
- COSTA, P.;SOULIE-VASSAL, M.L.;SARRAZIN, B.;REBILLARD, X.;NAVRATIL, H.; BALI, J.P. - Adrenergic receptors on smooth muscle cells isolated from human penile corpus cavernosum. *J. Urol.*, **150**:859-63, 1993.
- CROSSMAN, D.;MCEWAN, J.;MACDERMOT, J.;MACINTYRE, I.; DOLLERY, C.T. - Human calcitonin gene-related peptide activates adenylate cyclase and releases prostacyclin from human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol*, **92**:695-701, 1987.
- CROWE, R.;LINCOLN, J.;BLACKLAY, P.F.;PRYOR, J.P.;LUMLEY, J.S.; BURNSTOCK, G. - Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive nerves in diabetic penis. A comparison between streptozotocin-treated rats and man. *Diabetes*, **32**:1075-7, 1983.
- DAHIYA, R.;LIN, A.;BAKIRCIOGLU, M.E.;HUANG, S.T.; LUE, T.F. - mRNA and protein expression of nitric oxide synthase and adrenoceptor alpha 1 in young and old rat penile tissues. *Br. J. Urol.*, **80**:300-6, 1997.
- DE GROAT, W.C & STEERS, W.D. – Neuroanatomy and neurophysiology of penile erection. In: TANAGHO, E.A.; LUE, T.F.; McLURE, R.D. (eds.) – **Contemporary management of impotence and infertility**. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, 1988. p.3-27.

- DE NUCCI, G.;GRYGLEWSKI, R.J.;WARNER, T.D.; VANE, J.R. - Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**:2334-8, 1988.
- DE NUCCI, G.;WARNER, T.; VANE, J.R. - Effect of captopril on the bradykinin-induced release of prostacyclin from guinea-pig lungs and bovine aortic endothelial cells. **Br J Pharmacol**, **95**: 783-8., 1988.
- DEVINE, C.A. & ANGERMEIER, K.W. - Anatomy of the penis and male perineum. **AUA UPDATE SERIES**, **12**: Lesson 2, 1994.
- D'ORLEANS-JUSTE, P.;DE NUCCI, G.; VANE, J.R. - Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium- derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.**, **96**:920-6, 1989.
- ELIASSEN, M.J.;BLACKSHAW, S.;SCHELL, M.J.; SNYDER, S.H. - Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**:3396-401, 1997.
- ERDOS, E.G. - Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, **16**:363-70, 1990.
- FELDMAN, H.A.;GOLDSTEIN, I.;HATZICHRISTOU, D.G.;KRANE, R.J.; MCKINLAY, J.B. - Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **J. Urol.**, **151**:54-61, 1994.
- FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. - The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. **Br. J. Pharmacol.**, **30**:417-24, 1967.

- FORSTERMANN, U.;ISHII, K.;GORSKY, L.D.; MURAD, F. - The cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells synthesizes an EDRF-like substance that relaxes rabbit aorta. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, **340**:771-4, 1989.
- FORSTERMANN, U. - Characterization and purification of particulate EDRF synthase from bovine aortic endothelial cells. **FASEB J.**, **5**:A1728, 1991.
- FORSTERMANN, U.;POLLOCK, J.S.;SCHMIDT, H.H.;HELLER, M.; MURAD, F. - Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:1788-92, 1991.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**:373-6, 1980.
- FURCHGOTT, R.F. - Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium derived relaxing factors is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P.M. (ed.) - **Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium**. Raven Press, New York, 1988. p.401-14.
- GARBAN, H.;VERNET, D.;FREEDMAN, A.;RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. - Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats. **Am. J. Physiol.**, **268**:467-75, 1995.
- GARTHWAITE, J.;SOUTHAM, E.;BOULTON, C.L.;NIELSEN, E.B.;SCHMIDT, K.; MAYER, B. - Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, **48**:184-8., 1995.
- GEPPETTI, P. - Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. **Regul. Pept.**, **47**:1-23, 1993.



- GOEPEL, M.;KREGE, S.;PRICE, D.T.;MICHELOTTI, G.A.;SCHWINN, D.A.; MICHEL, M.C. - Characterization of alpha-adrenoceptor subtypes in the corpus cavernosum of patients undergoing sex change surgery. **J. Urol.**, **162**:1793-9, 1999.
- GONDRE, M. & CHRIST, G.J. - Endothelin-1-induced alterations in phenylephrine-induced contractile responses are largely additive in physiologically diverse rabbit vasculature. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **286**:635-42, 1998.
- GU, J.;POLAK, J.M.;PROBERT, L.;ISLAM, K.N.;MARANGOS, P.J.;MINA, S.; ADRIAN, T.E.;MCGREGOR, G.P.;O'SHAUGHNESSY, D.J.; BLOOM, S.R. - Peptidergic innervation of the human male genital tract. **J. Urol.**, **130**:386-91, 1983.
- HEDLUND, P.;ALM, P.;EKSTROM, P.;FAHRENKRUG, J.;HANNIBAL, J.; HEDLUND, H.;LARSSON, B.; ANDERSSON, K.E. - Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, **116**:2258-66., 1995.
- HEDLUND, P.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. – NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, **127**:349-60, 1999.
- HEDLUND, P.;ASZODI, A.;PFEIFER, A.;ALM, P.;HOFMANN, F.;AHMAD, M.; FASSLER, R.; ANDERSSON, K.E. - Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**:2349-54, 2000a.
- HEDLUND, P.;NY, L.;ALM, P.; ANDERSSON, K.E. - Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. **J. Urol.**, **164**:868-75, 2000b.
- HELMER, O. - Differentiation between two forms of angiotensin by means of spirally cut strips of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, **188**:571-7, 1957.

- HOLMQUIST, F.;ANDERSSON, K.E.; HEDLUND, H. - Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **Acta Physiol. Scand.**, **139**:113-22, 1990.
- HOLMQUIST, F.;PERSSON, K.;GARCIA-PASCUAL, A.; ANDERSSON, K.E. - Phospholipase C activation by endothelin-1 and noradrenaline in isolated penile erectile tissue from rabbit. **J. Urol.**, **147**:1632-5, 1992.
- IGIC, R.;ERDOS, E.G.;YEH, H.S.;SORRELLS, K.; NAKAJIMA, T. - Angiotensin I converting enzyme of the lung. **Circ Res**, **31**: Suppl 2:51-61., 1972.
- IGNARRO, L.J.;BYRNS, R.E.;BUGA, G.M.;WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G. - Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **244**:181-9, 1988.
- IGNARRO, L.J.;BUSH, P.A.;BUGA, G.M.;WOOD, K.S.;FUKUTO, J.M.; RAJFER, J. - Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **170**:843-50, 1990.
- IIMURA, O.;SHIMAMOTO, K.;TANAKA, S.;HOSODA, S.;NISHITANI, T.;ANDO, T.; MASUDA, A. - The mechanism of the hypotensive effect of captopril (converting enzyme inhibitor) with special reference to the kallikrein-kinin and renin- angiotensin systems. **Jpn. J. Med.**, **25**:34-9, 1986.
- JARDIM, A.; WAGNER, G.; GIULIANO, F.; PADMA-NATHAN, H.; ROSEN, R. – **Erectile dysfunction**. Health Publication Ltda, Plymouth-United Kingdon, 2000.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - Consensus Development Panel on Impotence. **JAMA**, **270**:83-7, 1993.

- IKEMOTO, F.;SONG, G.B.;TOMINAGA, M.; YAMAMOTO, K. - Endogenous inhibitor of angiotensin converting enzyme in the rat heart. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **159**:1093-9, 1989.
- IKEMOTO, F.;SONG, G.B.;TOMINAGA, M.;KANAYAMA, Y.; YAMAMOTO, K. - Angiotensin-converting enzyme in the rat kidney. Activity, distribution, and response to angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Nephron**, **55**:3-9, 1990.
- ITALIANO, G.;CALABRO, A.; PAGANO, F. - A simplified in vitro preparation of the corpus cavernosum as a tool for investigating erectile pharmacology in the rat. **Pharmacol. Res.**, **30**:325-34., 1994.
- JACKSON, E.K. & GARRISON, J.C. - Renin and Angiotensin. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.733-58.
- KARAKI, H.;OZAKI, H.;HORI, M.;MITSUI-SAITO, M.;AMANO, K.;HARADA, K.; MIYAMOTO, S.;NAKAZAWA, H.;WON, K.J.; SATO, K. - Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, **49**:157-230., 1997.
- KAUFMAN, M.P.;COLERIDGE, H.M.;COLERIDGE, J.C.; BAKER, D.G. - Bradykinin stimulates afferent vagal C-fibers in intrapulmonary airways of dogs. **J. Appl. Physiol.**, **48**:511-7, 1980.
- KIELY, E.A.;BLOOM, S.R.; WILLIAMS, G. - Penile response to intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide alone and in combination with other vasoactive agents. **Br. J. Urol.**, **64**:191-4., 1989.
- KIFOR, I.;WILLIAMS, G.H.;VICKERS, M.A.;SULLIVAN, M.P.;JODBERT, P.; DLUHY, R.G. - Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. **J. Urol.**, **157**:1920-5, 1997.

- KIM, N.;VARDI, Y.;PADMA-NATHAN, H.;DALEY, J.;GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. - Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. **J. Clin. Invest.**, **91**:437-42, 1993.
- KIM, S.Z.;KIM, S.H.;PARK, J.K.;KOH, G.Y.; CHO, K.W. - Presence and biological activity of C-type natriuretic peptide- dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. **J. Urol.**, **159**:1741-6, 1998.
- KIMOTO, Y.;KESSLER, R.; CONSTANTINOU, C.E. - Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. **J. Urol.**, **144**:1015-7., 1990.
- KIMOTO, Y.;KUMAZAWA, J.;KESSLER, R.; CONSTANTINOU, C.E. - Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. **Jpn. J. Pharmacol.**, **58**:321P, 1992.
- KITAMURA, K.;KANGAWA, K.;KAWAMOTO, M.;ICHIKI, Y.;NAKAMURA, S.;MATSUO, H.; ETO, T. - Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **192**:553-60, 1993.
- KLINGE, E. & SJOSTRAND, N.O. - Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission; a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle. **Acta Physiol Scand**, **100**: 368-76., 1977.
- KRONEBERG, G.S. & SOEPEL, K. - Untersuchungen über die kreislaufwirkung von kallikrein (Padutin), kallidin und bradykinin. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.**, **245**:284-5, 1963.
- KUTHE, A.;MAGERT, H.;UCKERT, S.;FORSSMANN, W.G.;STIEF, C.G.; JONAS, U. - Gene expression of the phosphodiesterases 3A and 5A in human corpus cavernosum penis. **Eur. Urol.**, **38**:108-14, 2000.

- KUTHE, A.;WIEDENROTH, A.;MAGERT, H.J.;UCKERT, S.;FORSSMANN, W.G.;STIEF, C.G.; JONAS, U. - Expression of different phosphodiesterase genes in human cavernous smooth muscle. *J. Urol.*, **165**:280-3, 2001.
- LEE, S.W.;WANG, H.Z.;ZHAO, W.;NEY, P.;BRINK, P.R.; CHRIST, G.J. - Prostaglandin E1 activates the large-conductance KCa channel in human corporal smooth muscle cells. *Int. J. Impot. Res.*, **11**:189-99, 1999.
- LEFKOWITZ, R.;HOFFMAN, B.; TAYLOR, P. - The Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.105-39.
- LEVIN, R.M. & WEIN, A.J. - Adrenergic alpha receptors outnumber beta receptors in human penile corpus cavernosum. *Invest. Urol.*, **18**:225-6, 1980.
- LIN, C.S.;LAU, A.;TU, R.; LUE, T.F. - Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **268**:628-35, 2000.
- LINZ, W.;MARTORANA, P.A.; SCHOLKENS, B.A. - Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **15**:S99-109, 1990.
- LUCAS, K.A.;PITARI, G.M.;KAZEROUNIAN, S.;RUIZ-STEWART, I.;PARK, J.;SCHULZ, S.;CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. - Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**:375-414, 2000.
- LUE, T.F.;TAKAMURA, T.;UMRAIYA, M.;SCHMIDT, R.A.; TANAGHO, E.A. - Hemodynamics of canine corpora cavernosa during erection. *Urology*, **24**:347-52, 1984.

- LUGG, J.;NG, C.;RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. - Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. **Am. J. Physiol.**, **271**:E354-61, 1996.
- LUNDBERG, J.M. - Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. **Pharmacol. Rev.**, **48**:113-78, 1996.
- MCDONALD, T.P.;DINNIS, D.M.;MORRISON, C.F.; HARMAR, A.J. - Desensitization of the human vasoactive intestinal peptide receptor (hVIP2/PACAP R): evidence for agonist-induced receptor phosphorylation and internalization. **Ann. NY Acad. Sci.**, **865**:64-72, 1998.
- MCLEAN, P.G.;PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. - Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. **Cardiovasc. Res.**, **48**:194-210, 2000.
- MINHAS, S.;CARTLEDGE, J.; EARDLEY, I. - The role of prostaglandins in penile erection. **Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids**, **62**:137-46, 2000.
- MITCHELL, J.A.;FORSTERMANN, U.;WARNER, T.D.;POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.;HELLER, M.; MURAD, F. - Endothelial cells have a particulate enzyme system responsible for EDRF formation: measurement by vascular relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **176**:1417-23, 1991.
- MIURA, K.;YUKIMURA, T.;IMANISHI, M.;OKAHARA, T.;ABE, Y.; YAMAMOTO, K. - Effect of SA-446, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, on renal function in anesthetized dogs: special reference to arachidonic acid metabolites. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **7**:102-7, 1985.
- MOLDERINGS, G.;MALINOWSKA, B.; SCHLICKER, E. - Inhibition of noradrenaline release in the rat vena cava via prostanoid receptors of the EP3-subtype. **Br. J. Pharmacol.**, **107**:352-5, 1992.

- MOLDERINGS, G.J.;GOTHERT, M.;VAN AHLEN, H.; PORST, H. - Noradrenaline release in human corpus cavernosum and its modulation via presynaptic alpha 2-adrenoceptors. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, **3**:497-504, 1989.
- MONCADA, S.;GRYGLEWSKI, R.;BUNTING, S.; VANE, J.R. - An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, **263**:663-5, 1976.
- MONCADA, S.;RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M. - Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem. Pharmacol.**, **37**:2495-501, 1988.
- MONCADA, S.;PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**:109-42, 1991.
- MONCADA IRIBARREN, I.S.D.T. & SAEZ DE TEJADA, I. - Anatomy and Physiology of Erection. In: MULCAHY, J. – **Diagnosis and Management of Male Sexual Dysfunction**. Nova York, Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc., 1997. p.12-34.
- MOREIRA, E.D., JR.;ABDO, C.H.;TORRES, E.B.;LOBO, C.F.; FITTIPALDI, J.A. - Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. **Urology**, **58**: 583-8., 2001.
- MORELAND, R.B., NEHRA A, GOLDSTEIN I, TRAISH A - The role of prostaglandin E as determined by expression of functional prostaglandin E receptors in human corpus cavernosum. **J. Urol.**, **161**:218, 1999.
- MORLEY, J.E. - Impotence. **Am. J. Med.**, **80**:897-905, 1986.
- MULLER-ESTERL, W. - Kininogens, kinins and kinships. **Thromb. Haemost.**, **61**: 2-6., 1989.



- MURPHY, T.J.;ALEXANDER, R.W.;GRIENDLING, K.K.;RUNGE, M.S.;  
BERNSTEIN, K.E. - Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1  
angiotensin II receptor. **Nature**, **351**:233-6, 1991.
- NARUMIYA, S.;SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. - Prostanoid receptors:  
structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, **79**:1193-226, 1999.
- NITARAHA, K.L. & LUE, T.F. - Microscopic Anatomy of the Penis. In: CARSON,  
C.K. R & GOLDSTEIN, I. – **Textbook of Erectile Dysfunction**. Oxford,  
ISIS Medical Media, 1999. p.31-41.
- OKAMOTO, H. & GREENBAUM, L.M. - Isolation and structure of T-kinin.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **112**:701-8, 1983.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. – Nitric oxide release accounts  
for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**,  
**327**:524-6, 1987.
- PENSON, D.F.;NG, C.;CAI, L.;RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. -  
Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile  
function in the rat. **Biol. Reprod.**, **55**:567-74, 1996.
- PFEIFER, A.;KLATT, P.;MASSBERG, S.;NY, L.;SAUSBIER, M.;HIRNEISS,  
C.;WANG, G.X.;KORTH, M.;ASZODI, A.;ANDERSSON, K.E.;KROMBACH,  
F.;MAYERHOFER, A.;RUTH, P.;FASSLER, R.; HOFMANN, F. - Defective  
smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. **Embo. J.**,  
**17**:3045-51, 1998.
- PICKARD, R.S.;POWELL, P.H.; ZAR, M.A. - The effect of inhibitors of nitric  
oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation  
of human cavernosal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, **104**:755-9, 1991.

- PIERCE, K.L.;GIL, D.W.;WOODWARD, D.F.; REGAN, J.W. - Cloning of human prostanoid receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **16**:253-6, 1995.
- PIPER, P.J. - Formation and actions of leukotrienes. *Physiol Rev*, **64**: 744-61., 1984.
- POLLOCK, J.S.;FORSTERMANN, U.;MITCHELL, J.A.;WARNER, T.D.;SCHMIDT, H.H.;NAKANE, M.; MURAD, F. - Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:10480-4, 1991.
- PORST, H. - The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience. *J. Urol.*, **155**:802-15, 1996.
- RADOMSKI, M.W.;PALMER, R.M.; MONCADA, S. - Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.*, **92**:181-7, 1987.
- RAJASEKARAN, M.;MONDAL, D.;AGRAWAL, K.;CHEN, I.L.;HELLSTROM, W.;SIKKA, S. - Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells. *J. Urol.*, **160**:2210-5, 1998.
- REGOLI, D.;BARABE, J.; PARK, W.K. - Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55**:855-67, 1977.
- REGOLI, D. & BARABE, J. - Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**:1-46, 1980.
- REGOLI, D.;DION, S.;RHALEB, N.E.;DRAPEAU, G.; D'ORLEANS-JUSTE, P. - Vasoactive peptides and their receptors. *Blood Vessels*, **27**:137-45, 1990.

- REILLY, C.M.;STOPPER, V.S.; MILLS, T.M. - Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. **J. Androl.**, **18**:26-31, 1997.
- ROCHA E SILVA, M.B., BERALDO, W.T; ROSENFELD, G - Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, **156**:261-73, 1949.
- ROS, C.T., TELOKEN, C; SOGARI, P - Caucasian penis: What is the normal size? **J. Urol.**, **151**:323A, 1994.
- RYAN, J.W.;RYAN, U.S.;SCHULTZ, D.R.; DAY, A.R. - Further evidence on the subcellular sites of kininase II (angiotensin converting enzyme). **Adv. Exp. Med. Biol.**, **70**:235-43, 1976.
- SAENZ DE TEJADA, I.;GOLDSTEIN, I.;AZADZOI, K.;KRANE, R.J.; COHEN, R.A. - Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. **N. Engl. J. Med.**, **320**:1025-30, 1989.
- SAENZ DE TEJADA, I. - Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. **Am. J. Physiol.**, **261**:H1078-85, 1991.
- SAENZ DE TEJADA, I.G.C., N; HEATON, J; HEDLUND, H; NEHRA, A; PICKARD, R S; SIMONSEN, U; STEERS, W - Anatomy, physiology and pathophysiology of erectile function. In: JARDIN, A.W., G; KHOURY, S; GIULIANO, F; PADMA-NATHAN, H; ROSEN, R. – **Erectile dysfunction**. Plymouth, Plymbridge Distributors Ltd., 1999. p.65-102.
- SAENZ DE TEJADA, I. - Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contratility. **Int. J. Impot. Res.**, **12**:34-38, 2000.

- SCHOLKENS, B.A. & LINZ, W. - Local inhibition of angiotensin II formation and bradykinin degradation in isolated hearts. ***Clin. Exp. Hypertens. A***, **10**:1259-70, 1988.
- SCHONFIELD, W. - Primary and secondary sexual characteristics. Study of their development in males from birth through maturity with biometric study of penis and testes. ***Am. J. Dis. Child.***, **63**:535-49, 1943.
- SEFTEL, A.D.;VAZIRI, N.D.;NI, Z.;RAZMJOUEI, K.;FOGARTY, J.;HAMPEL, N.;POLAK, J.;WANG, R.Z.;FERGUSON, K.;BLOCK, C.; HAAS, C. - Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS. ***Urology***, **50**: 1016-26., 1997.
- SHETTY, S.F & FARAH, R.N. - Anatomy of Erectile Function. In: CARSON, C.K., R; GOLDSTEIN, I. - **Textbook of Erectile Dysfunction**. Oxford, ISIS Medical Media, 1999. p.25-30.
- SIMONSEN, U.;PRIETO, D.;HERNANDEZ, M.;SAENZ DE TEJADA, I.; GARCIA-SACRISTAN, A. - Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit nitrenergic neurotransmission in horse penile resistance arteries. ***J. Urol.***, **157**:2356-60., 1997.
- SKEGGS, L.;KAHN, J.; SHUMWAY, N. - The preparation and function or the hypertensin-converting enzyme. ***J. Exp. Med.***, **103**:295-9, 1956.
- SOMLYO, A.P. & SOMLYO, A.V. - Signal transduction and regulation in smooth muscle. ***Nature***, **372**: 231-6., 1994.
- SONG, G.B.;TOMINAGA, M.;KANAYAMA, Y.;IKEMOTO, F.; YAMAMOTO, K. - Enhancement of angiotensin-converting enzyme activity in the inner cortex of rat kidney by captopril. ***Ren. Physiol. Biochem.***, **11**:43-9, 1988.

- STIEF, C.G.;BENARD, F.;BOSCH, R.J.;ABOSEIF, S.R.;LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. - A possible role for calcitonin-gene-related peptide in the regulation of the smooth muscle tone of the bladder and penis. *J. Urol.*, **143**:392-7, 1990.
- STIEF, C.G.;WETTERAUER, U.;SCHAEBSDAU, F.H.; JONAS, U. - Calcitonin-gene-related peptide: a possible role in human penile erection and its therapeutic application in impotent patients. *J. Urol.*, **146**:1010-4, 1991.
- SUZUKI, H.;TOMINAGA, T.;KUMAGAI, H.; SARUTA, T. - Effects of first-line antihypertensive agents on sexual function and sex hormones. *J. Hypert.*, **6(Suppl)**:S649-51, 1988.
- SWANSON, G.N.;HANESWORTH, J.M.;SARDINIA, M.F.;COLEMAN, J.K.; WRIGHT, J.W.;HALL, K.L.;MILLER-WING, A.V.;STOBB, J.W.;COOK, V.I.; HARDING, E.C.; ET AL. - Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul. Pept.*, **40**:409-19, 1992.
- TAYLOR, P. - Anticholinesterase Agents. In: HARDMAN, J.L., LE; MOLLINOFF, PB; RUDDON, RW; GILMAN, AG. – **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9th Ed. New York, McGraw-Hill, 1996. p.161-75.
- TOH, H.;ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. - Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett*, **361**:17-21, 1995.
- TOUYZ, R.M. & SCHIFFRIN, E.L. - Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.*, **52**:639-72, 2000.
- TRAISH, A.M.;NETSUWAN, N.;DALEY, J.;PADMAN-NATHAN, H.;GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. - A heterogeneous population of alpha 1 adrenergic receptors mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine. *J. Urol.*, **153**:222-7, 1995a.

- TRAISH, A.M.;PALMER, M.S.;GOLDSTEIN, I.; MORELAND, R.B. - Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. **Receptor**, **5**:159-76, 1995b.
- TRAISH, A.M.;MORELAND, R.B.;HUANG, Y.H.; GOLDSTEIN, I. - Expression of functional alpha2-adrenergic receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured trabecular smooth muscle cells. **Recept. Signal. Transduct.**, **7**:55-67, 1997.
- TRIGO-ROCHA, F.;HSU, G.L.;DONATUCCI, C.F.; LUE, T.F. - The role of cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, endothelium and nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in canine penile erection. **J. Urol.**, **149**:872-7, 1993.
- UHLER, M.D. - Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. **J. Biol. Chem.**, **268**:13586-91, 1993.
- UNGER, T.;GANTEN, D.; LANG, R.E. - Effect of converting enzyme inhibitors on tissue converting enzyme and angiotensin II: therapeutic implications. **Am. J. Cardiol.**, **59**:18D-22D, 1987.
- VANE, J.R. - The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, **23**:360-73, 1964.
- VANE, J.R. - The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. **Br J Pharmacol**, **35**:209-42, 1969.
- VANE, J.R. - Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New. Biol.**, **231**:232-5, 1971.
- WAGNER, G.;GERSTENBERG, T.; LEVIN, R.J. - Electrical activity of corpus cavernosum during flaccidity and erection of the human penis: a new diagnostic method? **J. Urol.**, **142**:723-5, 1989.

- WALSH, P.C. & DONKER, P.J. - Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. **J. Urol.**, **128**:492-7, 1982.
- WESPES, E.;GOES, P.M.;SCHIFFMANN, S.;DEPIERREUX, M.; VANDERHAEGHEN, J.J.; SCHULMAN, C.C. - Computerized analysis of smooth muscle fibers in potent and impotent patients. **J. Urol.**, **146**:1015-7, 1991.
- WESSELLS, H.;LUE, T.F.; MCANINCH, J.W. - Penile length in the flaccid and erect states: guidelines for penile augmentation. **J. Urol.**, **156**:995-7, 1996.
- YANAGISAWA, M.;INOUE, A.;ISHIKAWA, T.;KASUYA, Y.;KIMURA, S.; KUMAGAYE, S.;NAKAJIMA, K.;WATANABE, T.X.;SAKAKIBARA, S.; GOTO, K.; ET AL. - Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**:6964-7, 1988.
- YANG, H.Y.;ERDOS, E.G.; LEVIN, Y. - A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. **Biochim. Biophys. Acta**, **214**:374-6, 1970.

## **8. Bibliografia de Normatizações**

---

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.  
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4ª ed.,  
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.  
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade  
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98.