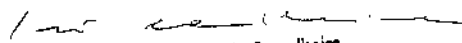




ERRATAS:

ONDE SE LÊ: 19-11-2011, LEIA-SE: 19-10-2011.

ONDE SE LÊ: Rodrigo de Oliveira Capel, LEIA-SE: Rodrigo de Oliveira Capel Martins.


Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira
Coordenador de Comissão de Pós-Graduação
FCM/UNICAMP
Matrícula 28611-0

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Alterações na função erétil induzidas por castração cirúrgica em
camundongos C57bl/6 - Avaliação das vias: óxido nítrico-GMP cíclico-
fosfodiesterase 5 e Rho-cinase.

Rodrigo de Oliveira Capel

Tese de Doutorado apresentada à
Pós-graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção
do título de doutor em Farmacologia.
Sob orientação do Prof. Dr. Gilberto
De Nucci

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C17a Capel, Rodrigo de Oliveira, 1975 -
Alterações na função erétil induzidas por castração
cirúrgica em camundongos C57bl/6 – avaliação das vias:
óxido nítrico-GMP cíclico-fosfodiesterase 5 e RhoA /
Rho-cinase. / Rodrigo de Oliveira Capel. -- Campinas, SP
: [s.n.], 2011.

Orientador : Gilberto De Nucci
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Disfunção erétil. 2. Corpo cavernoso. I. De Nucci,
Gilberto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Changes on erectile function induced by surgical castration in C57bl/6 mice – evaluation of nitric oxide-cGMP-phosphodiesterase 5 and Rho-kinase pathways

Palavra-chave em inglês:

Erectile dysfunction

Corpus cavernosum

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador]

Gabriel Forato Anhô

Kleber Gomes Franchini

Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia

Sidney Glina

Data da defesa: 19-11-2011

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

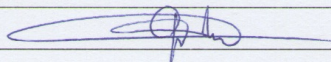
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Rodrigo de Oliveira Capel Martins

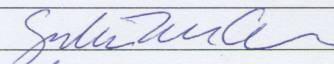
Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:

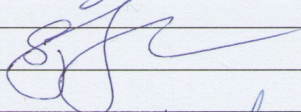
Professor Doutor Gilberto de Nucci



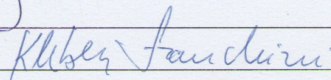
Professor Doutor Gabriel Forato Anhe



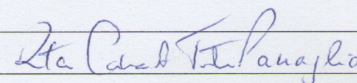
Professor Doutor Sidney Glina



Professor Doutor Kleber Gomes Franchini



Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglio



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/10/2011

Dedicatória

Aos meus pais, Marina Helenice e Lenine, meus
amigos de sempre e os maiores e melhores exemplos
de vida, minha eterna gratidão e carinho.

À minha noiva Cíntia, pela compreensão, carinho e
presença.

Aos meus irmãos Patrícia, Leandro e Christie,
amigos os quais sempre posso contar.

Às minhas afilhadas Isabelle e Clara e meu
afilhado Daniel.

À minha sobrinha Michelle e o meu sobrinho
Nicolas Pierre.

Ao amigo e mestre Prof. Dr. Fernando de Oliveira
por ter me ensinado o caminho da pesquisa e da
docência desde minha graduação.

In memoriam

Ao amigo e orientador,

Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira,

idealizador deste projeto.

Agradecimientos

Ao meu orientador,
Professor Doutor Gilberto De Nucci pela amizade e
pela orientação e oportunidades que me foram
dadas.

Aos meus sogros Antonio Ettore e Neide Maria pela
amizade, confiança e acolhimento.

Ao amigo doutor César Nahoum por todas as
madrugadas dedicadas a discussão de resultados e
o surgimento de novas ideias.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, sempre disposto a
ajudar.

Ao Prof. Dr. André A. Schenka pelas análises
histológica e imunistoquímica essenciais a este
trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de
Doutorado – 2007/06605-0 (2007-2011) e do
Auxílio Regular – 2007/06601-5.

Aos amigos do Laboratório, Julios Rojas,
Fernanda Del, Fabíola Mónica, Fernando Báu, Haroldo Toque, Fernanda Príviero, Maria
Andréia, Rafael Prada, Luiz Osório, Celso Saragossa, André Arruda, Paulo Gonzalez,
Fábio Henrique, Fabiano Calmasini, Camila Mendes, Lorenzo Pissinatti, Samuel

Barillas, Wagner Faria, Priscila Monteiro, Mario Angelo, Elen Landucci, Lineu Baldissera. Agradeço pela convivência e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FCM – UNICAMP, Francileuda, Rosicler, Larissa, Bruno, Wanderlei, Elaine, pelos serviços prestados, ao Sr. Miguel Borges e a Denise pelo cuidado e manutenção com os animais do biotério, a bibliotecária Rosana Evangelista, pela elaboração da ficha catalográfica e a todos os demais funcionários que direta ou indiretamente me ajudaram durante a minha pesquisa.

Lista de drogas	14
Lista de abreviações	15
Lista de tabelas	18
Lista de figuras	20
Resumo	23
Abstract	27
1. Introdução	32
Fisiologia da ereção peniana – mecanismos de relaxamento e contração do corpo cavernoso	33
Inervação não-adrenérgica, não-colinérgica (NANC): papel do NO	35
Disfunção erétil, hipogonadismo e regulação farmacológica	38
Justificativa	40
Objetivo	41
2. Material e Métodos	42
2.1. Animais	43
2.2. Procedimento cirúrgico	43
2.3. Ensaios funcionais	43
2.4. Análise macroscópica, histológica e imunoistoquímica	45

2.5. Western Blot	48
2.6 Doseamento de testosterona	48
2.7. Análise estatística	49
3. Resultados	50
3.1. Curva concentração-efeito ao agonista alfa1-adrenérgico, fenilefrina, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados	51
3.2. Curva frequência-resposta em de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados	54
3.3. Curva concentração-efeito à acetilcolina em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados	55
3.4. Curva concentração-efeito aos ativadores da via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5, Bay 41-2272 (ativador de guanilil ciclase, independente de NO) e SNP (doador de NO) em corpo cavernoso de camundongos cirurgicamente castrados	56
3.5. Curva concentração-efeito ao inibidor da Rho-cinase, HA1077, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados	58
3.6. Análise macroscópica e histológica	59
3.7. Análise imunoistoquímica e Western blot	62
3.8. Doseamento de testosterone	62

4. Discussão	64
5. Sumário e conclusões	68
6. Referências Bibliográficas	70

Lista de drogas

Substância	Procedência
Acetilcolina	Sigma
Bay 41-2272	Bayer
CaCl ₂	Merck
Dextrose	Synth
Fenilefrina	Sigma
HA1077	Sigma
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-NAME	Sigma
MgSO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
ODQ	Sigma

SNP

Sigma

Lista de abreviações

ATP: trifosfato de adenosina

CAS: camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

cGKI: proteína cinase dependente de monofosfato de guanosina, tipo I

cGKII: proteína cinase dependente de monofosfato de guanosina, tipo II

cNOS: sintases de óxido nítrico constitutivas

CTL: camundongos C57bl/6 controle

DAG: diacilglicerol

E_{max} : resposta máxima

eNOS: sintase endotelial de óxido nítrico

FAD: dinucleotídio flavina adenina

FMN: mononucleotídio flavina adenina

GC: ciclase de guanilil

GMP: monofosfato de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

iNOS: sintase induzível de óxido nítrico

IP3: trifosfato de inositol

L-NAME: éster metílico de N^ω-nitro-L-arginina

LPS: lipopolissacarídeo

MLC20: cadeia leve da miosina

MLCK: cinase da cadeia leve da miosina

MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina

n w: número de semanas após a castração cirúrgica

NADPH: dinucleotídeo fosfato de nicotinamida e adenina

NANC: não-adrenérgico, não-colinérgico

nNos: sintase neuronal de óxido nítrico

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

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

BH4: (6R)-5,6,7,8-tetraidro-L-bioptina

Lista de tabelas

Tabela 1: Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{max}) do agonista alfa ₁ adrenérgico fenilefrina, na presença e ausência do inibidor de óxido nítrico L-NAME, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.....	51
Tabela 2: Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{max}) do agonista alfa ₁ adrenérgico fenilefrina, na presença e ausência do inibidor de Rho-cinase HA1077, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.....	52
Tabela 3: Valores de resposta máxima (E _{max}) à acetilcolina em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.....	54
Tabela 4. Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{max}) aos ativadores da via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5, BAY 41-2272 (ativador de guanilil ciclase, independente de NO) e SNP (doador de NO) em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.....	56
Tabela 5. Valores de potência (pEC ₅₀) e resposta máxima (E _{max}) ao inibidor de Rho-cinase HA1077 em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.....	58

Figura 1: Biossíntese e mecanismo de ação do óxido nítrico.....	35
Figura 2: Estrutura química dos compostos que inibem a atividade da sintase de óxido nítrico.....	36
Figura 3: Ciclo da ereção peniana.....	38
Figura 4: Curva concentração-efeito ao agonista alfa-adrenérgico, fenilefrina, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados.....	50
Figura 5: Curva concentração-efeito ao agonista alfa-adrenérgico, fenilefrina, na presença de HA1077, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados	51
Figura 6: Frequência-resposta em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados.....	53
Figura 7: Curva concentração-efeito à acetilcolina, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados	54
Figura 8: Curva concentração-efeito aos inibidores da via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados	55
Figura 9: Curva concentração-efeito ao HA1077, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados	57

Figura 10: Desenvolvimento peniano, de camundongos C57bl/6	60
Figura 11: Fotomicrografias ilustrativas da imunexpressão peniana de: eNOS, guanilil ciclase e fosfodiesterase 5	62

Resumo

A ereção peniana é um fenômeno vascular sob controle psicológico modulado por andrógenos onde o estado de flacidez ou ereção peniana é determinado pela condição momentânea de contração ou relaxamento do sistema arterial cavernoso e da musculatura lisa trabecular. Já a disfunção erétil é definida como a incapacidade de alcançar ou manter uma ereção peniana satisfatória para uma relação sexual e pode acontecer por causas psicológicas ou orgânicas, podendo esta ser, vascular, neurológica, cirúrgica ou medicamentosa e atinge cerca de 50% dos homens com idade superior a 40 anos e um número crescente de adultos com 20 anos ou mais. Os inibidores de fosfodiesterase tipo 5 são, por via oral, a melhor opção terapêutica embora existam outras alternativas como a injeção intracavernosa de papaverina, fentolamina ou alprostadil e, em casos mais severos, a prótese peniana. Contudo existem casos de pessoas que não respondem de maneira satisfatória a essas drogas e, a(s) causa(s) permanece(m) pouco conhecida(s). Com o objetivo de investigar se no modelo proposto de disfunção erétil *in vivo* causado por orquiectomia ocorrem também alterações da resposta do corpo cavernoso *in vitro* a estímulos contráteis e estímulos relaxantes, bem como, alterações morfológicas nos corpos cavernosos de camundongos utilizamos camundongos C57bl/6 adultos machos (25-30g) castrados cirurgicamente. Avaliamos a resposta contrátil à fenilefrina (agonista alfa1) na presença ou ausência de L-NAME (inibidor de NO) e fasudil (HA1077: inibidor de Rho-quinase), estimulação elétrica (EFS: 4, 8, 16Hz, 50V, 10 segundos), bem como a resposta relaxante à acetilcolina (ACh) na presença ou ausência de L-NAME, ao Bay 41-2272 (ativador de guanilil ciclase) na ausência ou presença de ODQ (inibidor de guanilil ciclase), ao nitroprussiato de sódio (SNP: doador de NO) na ausência ou presença de ODQ e ao HA 1077. Os parâmetros morfológicos avaliados foram, comprimento, área da secção transversal e volume peniano, área da secção transversal dos corpos cavernosos, fração de

musculatura lisa, colágeno e lúmen sinusoidal e a relação quantitativa musculatura lisa/tecido colágeno bem como a imunexpressão de guanilil ciclase, fosfodiesterase tipo 5 e sintase endotelial de NO. Dois segmentos de corpos cavernosos foram obtidos de cada animal. Os tecidos foram montados em banhos para órgão isolados preenchidos com a solução Krebs-Henseleit e após o período de estabilização foram realizadas curvas concentração efeito. Nossos resultados mostraram que a castração cirúrgica aumentou a potência e a resposta máxima da fenilefrina ($pEC_{50}=5,452\pm 0,100$; $E_{max}=0,117\pm 0,005$) em relação ao grupo controle ($pEC_{50}=6,138\pm 0,110$; $E_{max}=0,086\pm 0,005$ e) e que, a presença de HA1077 reverte esse efeito sem causar alteração na resposta do animal controle, a resposta contraturante à estimulação elétrica foi significativamente maior nos animais castrados ($p<0,001$) em todas as frequências testadas. Observamos que a resposta relaxante da ACh está diminuída nos animais castrados e, as doses maiores causaram contração, já o Bay 41-2272 teve sua potência e resposta máxima reduzidas no grupo castrado enquanto que, ao SNP não há diferença entre os grupos. Já o relaxamento ao HA1077 foi significativamente maior tanto em potência quanto a resposta máxima no animais castrados ($pEC_{50}=5,863\pm 0,060$; $E_{max}=0,141\pm 0,005$) em relação ao grupo controle ($pEC_{50}=6,867\pm 0,070$; $E_{max}=0,058\pm 0,001$). A análise macroscópica mostrou que, entre a primeira e a oitava, a castração induziu no pênis dos animais uma hipoplasia passando para atrofia a partir de então. Nos parâmetros microscópicos os animais castrados perderam 7% da área dos corpos cavernosos e 30% da fração de musculatura lisa. A imunexpressão da nNOS foi semelhante para os dois grupos já a eNOS, guanilil ciclase e PDE5 estão diminuídas nos animais castrados, os dados da guanilil ciclase e da PDE5 foram, também, confirmados por western blot. Neste trabalho demonstramos que a castração cirúrgica:

aumenta a sensibilidade da musculatura lisa cavernosa aos mecanismos contraturantes, quer por estimulação adrenérgica quer pelo mecanismo de sensibilização ao calcio mediado pela Rho-cinase, além de reduzir a resposta aos mecanismos relaxantes mediados pela via óxido nítrico-GMP cíclico-PDE5; provoca perda de musculatura lisa e estriada, aumento de tecido adiposo e redução na expressão de proteínas essenciais para a manutenção do funcionamento do mecanismo de ereção.

Penile erection is a vascular phenomenon under psychological control, modulated by androgens where the erection or flacid penile state is determined by the momentary condition of either contraction or relaxation of the arterial system and the cavernous trabecular smooth muscle. Since erectile dysfunction is defined as the inability to achieve or maintain a penile erection for satisfactory sexual intercourse and may be due to psychological or organic causes, which may be, vascular, neurological, surgical or drug induced and affects about 50% of men older than 40 years old and a growing number of men aged 20 years or more. The phosphodiesterase type 5 inhibitors are orally, the best treatment option although there are other alternatives such as intracavernous injection of papaverine, phentolamine, or alprostadil, and in severe cases, the penile prosthesis. However there are cases of people who do not respond satisfactorily to these drugs and, cause(s) remain unknown. In order to investigate whether the proposed model of erectile dysfunction caused by orchiectomy in vivo also changes the response of corpus cavernosum in vitro contractile and relaxing stimulation, as well as morphological changes in the corpus cavernosum of C57BL / 6 adults males mice (25-30g) surgically castrated. We evaluated the contractile response to phenylephrine (α_1 agonist) in the presence or absence of L-NAME (NO-inhibitor) and fasudil (HA1077, Rho-kinase inhibitor), electrical stimulation (EFS: 4, 8, 16Hz, 50V, 10 seconds), as well as the relaxation response to acetylcholine (ACh) in the presence or absence of L-NAME, HA 1077, Bay 41-2272 (guanylyl cyclase activator) in the absence or presence of ODQ (guanylyl cyclase inhibitor) and sodium nitroprusside (SNP, NO donor) in the absence or presence of ODQ. The morphological parameters evaluated were length, cross-sectional area and volume of the penis, transversal sectional area of corpora cavernosa, fraction of smooth muscle, collagen

and sinusoidal lumen and quantitative smooth muscle / collagen tissue as well as the immunoexpression of guanylyl cyclase, phosphodiesterase 5 type and endothelial NOS. Two segments of the corpus cavernosum were obtained from each animal. Tissues were mounted in organ baths with Krebs-Henseleit and after stabilization, concentration curves were performed. Our results showed that castration increased the potency and maximal response of phenylephrine ($pEC_{50} = 5.452 \pm 0.100$, $E_{max} = 0.117 \pm 0.005$) compared to controls ($pEC_{50} = 6.138 \pm 0.110$; $E_{max} = \pm 0.005$ and 0.086) and HA1077 reverses this effect causing any alterations in the response of the animal control, electrical field stimulation was significantly higher in castrated animals ($p < 0.001$) at all frequencies tested. We observed that the relaxation of ACh is diminished in the castrated animals, and higher doses caused contraction, Bay 41-2272 had reduced potency and maximum response in the castrated group, while SNP had no difference between groups. HA1077 was significantly higher in both potency and maximum response in castrated animals ($pEC_{50} = 5.863 \pm 0.060$; $E_{max} = 0.141 \pm 0.005$) compared to controls ($pEC_{50} = 6.867 \pm 0.070$; $E_{max} = 0.058 \pm 0.001$). Macroscopic analysis showed that, between the first and eighth weeks after castration, castrated animals showed hypoplasia and atrophy thereafter. Microscopic parameters: castrated animals lost 7% of the corpus cavernosum and 30% of the fraction of smooth muscle. The nNOS immunoreactivity was similar in both groups as eNOS, guanylyl cyclase and PDE5 are reduced in castrated animals, and data of guanyl cylcase and PDE5 were also confirmed by western blot. We demonstrated that surgical castration: increases the sensitivity of the cavernous smooth muscle contraction mechanisms, either by adrenergic stimulation or by the mechanism of calcium sensitization mediated by Rho-kinase, and reduces the relaxing response to mechanisms mediated by nitric oxide- cGMP-

PDE5; causes loss of striated and smooth muscle, increased fat and decreased expression of proteins essential for maintaining the function of the erection mechanism.

Fisiologia da ereção peniana – mecanismos de relaxamento e contração do corpo cavernoso

A ereção peniana é um fenômeno vascular sob controle psicológico modulado por andrógenos (1), ainda que haja controvérsia a respeito destes na manutenção da responsividade do pênis (2-4).

O estado de flacidez ou ereção peniana é determinado pela condição momentânea de contração ou relaxamento do sistema arterial cavernoso e da musculatura lisa trabecular (5-7). Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusoides estão contraídos, principalmente através de mecanismos alfa-adrenérgicos, e exercem resistência máxima ao influxo arterial. Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, a dilatação das artérias cavernosa e helicinais, leva ao aumento do fluxo sanguíneo nos espaços lacunares (tumescência) e o relaxamento do músculo liso dilata os espaços lacunares, causando expansão do pênis. A pressão sanguínea sistêmica transmitida através das arteríolas helicinais dilatadas expande o músculo liso contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas e reduz o efluxo venoso e, dessa forma, o pênis é mantido rígido através do mecanismo de oclusão venosa. A ativação de nervos constritores simpáticos causa um aumento do *tonus* muscular das artérias helicinais e do corpo cavernoso, resultando na redução do influxo arterial e diminuição dos espaços lacunares (detumescência), com descompressão das vênulas sub-túnicas e aumento do efluxo sanguíneo, causando o retorno do pênis ao estado flácido. Assim, a estimulação do plexo pélvico e dos nervos cavernosos causa ereção, ao passo que a estimulação do tronco simpático leva à detumescência (5, 8).

Um vasto conjunto de evidências demonstra que o óxido nítrico (NO) é o componente central de um importante sistema de transdução de sinais que atuam no pênis para mediar a resposta erétil. O NO é constitutivamente produzido a partir da L-arginina pela ação das NO sintases (NOS), sendo liberado durante a neurotransmissão nitrérgica (ativação da nNOS) bem como do endotélio (ativação da eNOS) presente nos sinusóides. O NO se difunde para células musculares lisas adjacentes, causando ativação da guanilil ciclase solúvel, a qual converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). A elevação dos níveis intracelulares de cGMP promove ativação de proteínas cinase específicas que fosforilam outras proteínas, ativam canais iônicos e levam à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa. O cGMP é hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim a resposta erétil (5, 9).

A neurotransmissão noradrenérgica desempenha papel essencial na regulação do *tonus* do músculo liso dos corpos cavernosos. Os vasos penianos e o músculo liso cavernoso recebem uma vasta inervação adrenérgica, a qual mantém o pênis no estado flácido através da atividade tônica destes nervos, causando a liberação maciça de noradrenalina (10, 11). A noradrenalina estimula alfa-adrenoceptores (alfa-AR) e causa a contração da vasculatura peniana e do músculo liso trabecular do corpo cavernoso (5, 12). Os mecanismos intracelulares decorrentes da atividade contrátil evocada pela ativação de alfa1-AR incluem a ativação da fosfolipase C, com formação de inositol trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando assim ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a miosina cinase (MLCK), levando ao aumento expressivo de fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20). Durante este processo, a MLC20

fosforilada interage com a alfa-actina resultando na contração do músculo liso. Além disso, agonistas alfa1-AR causam contração desproporcional ao aumento concomitante e transitório da concentração intracelular de cálcio, indicando a existência de sensibilização ao cálcio decorrente da ação destes agonistas (13). Este efeito é mediado por proteínas que se ligam ao GTP, as quais recrutam outros sistemas intracelulares (14, 15). O mecanismo mais importante de sensibilização ao cálcio durante a contração do músculo liso ocorre através da inibição da MLC fosfatase (MLCP), aumentando assim o grau de fosforilação da MLC20, ainda que na presença de atividade basal de MLCK.

Inervação não-adrenérgica, não colinérgica (NANC): papel do NO

O NO é um neurotransmissor formado a partir da L-arginina, através de uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). A NOS utiliza como substrato o NADPH e o oxigênio molecular (O₂) e oxida o grupo guanidina da L-arginina, em processo que consome cinco elétrons e resulta na formação do NO com quantidade estequiométrica de L-citrulina (16) (Figura 1). A atividade da NOS se dá pela presença de diversos cofatores e grupos prostéticos, dentre eles a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina monucleotídeo (FMN), ferro, zinco e o (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH₄).

Existem três isoformas de NOS denominadas como endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) cada qual codificada por diferentes genes (17). Tanto a eNOS como a nNOS são denominadas de NOS constitutivas (cNOS), pois estão normalmente expressas nas células e atuam dependente de cálcio e de calmodulina para sua ação. O NO formado através da eNOS regula o tônus vascular, previne a adesão dos leucócitos e das

plaquetas, enquanto que o NO formado a partir da nNOS atua como neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central e no periférico. A isoforma iNOS é expressa em diferentes tipos celulares como macrófagos, hepatócitos e músculo liso vascular; é estimulada por substâncias próinflamatórias, como o lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas. Esta isoforma não é dependente de cálcio e, uma vez expressa, produz grandes quantidades de NO por longos períodos de tempo (16). O mecanismo de ação do NO, de modo geral, envolve a sua ligação na porção heme da guanilil ciclase solúvel (sGC), induzindo uma mudança conformacional que leva a enzima a sintetizar 3',5' monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Figura 1). Esta enzima tem sido detectada em diversos tecidos, como pulmão, cérebro, coração, rim, fígado, placenta, pâncreas, medula, útero, corpos cavernosos (18-23), bexiga humana (24) e bexiga de cobaia (25). O acúmulo de cGMP regula numerosas funções no organismo como: tônus dos vasos, neurotransmissão e respostas inflamatórias (21-23).

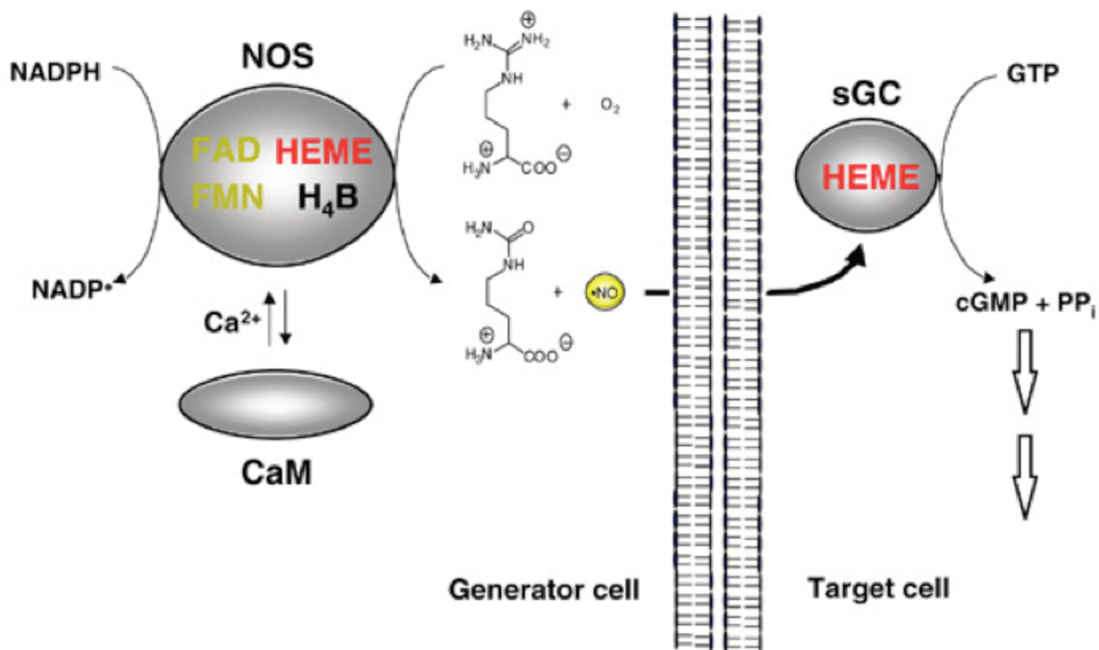


Figura 1: Biossíntese e mecanismo de ação do óxido nítrico (26).

Compostos endógenos e exógenos, incluindo autacóides, hormônios, neurotransmissores e toxinas produzem respostas celulares mediadas pelo cGMP, que tem diferentes alvos no sistema celular, como canais iônicos, fosfodiesterases (PDE) ou proteínas cinases (27). Duas proteínas cinases dependentes de cGMP foram identificadas: a cGKI, presente em altas concentrações no músculo liso, plaquetas, células de Purkinje e cerebelo, e a cGKII, expressa no intestino delgado, cérebro e cartilagens (28). A inativação da cGKI em camundongos abole o relaxamento do músculo liso vascular e cerebral, dependente de NO-cGMP causando hipertensão arterial e perda da motilidade (28).

Alguns análogos da L-arginina (Figura 2), previnem a ligação da L-arginina à enzima de maneira competitiva.

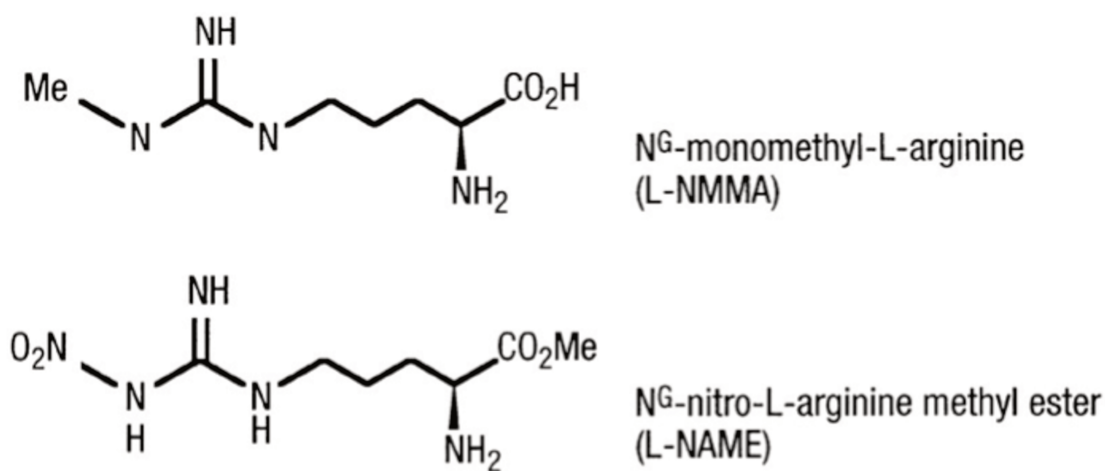


Figura 2: Estrutura química dos compostos que inibem a atividade da NOS.

Disfunção erétil, hipogonadismo e regulação farmacológica

Disfunção erétil é definida como a incapacidade de alcançar ou manter uma ereção peniana satisfatória para uma relação sexual (29). Ainda controversa a manutenção da ereção peniana ser modulada por andrógenos, é notório que a frequência de episódios de tumescência peniana noturna apresenta-se suprimida em homens com hipogonadismo (30), entretanto, terapias de reposição hormonal aparentam ter efeito positivo mais significativo, sobre o desejo sexual (domínio central) do que sobre a função erétil (31, 32) e, a literatura demonstra que a normalização dos níveis de testosterona em homens com hipogonadismo e disfunção erétil apresenta efeitos benéficos de curta duração, devido à eficácia do tratamento apresentar-se reduzida ao longo do tempo (33). Alguns efeitos adversos da terapia de reposição de testosterona incluem acne, enxaqueca, apneia, policitemia e exacerbação de doença prostática (34).

Em modelos animais de função erétil, a castração cirúrgica ou terapia antiandrogênica reduzem a magnitude das respostas eréteis induzidas por estimulação ganglionar in vivo, enquanto que o tratamento com andrógenos reverte este efeito (3, 4, 35, 36). A redução da função erétil causada pela castração está associada as alterações que levam à redução da expressão e atividade de NOS em corpo cavernoso de ratos (37-41). Há evidências que a castração pode acarretar redução da expressão gênica e proteica da fosfodiesterase V em ratos, sendo a mesma acompanhada de uma redução da resposta ao tadalafil (42). Além disso, Reilly e colaboradores, demonstraram que a testosterona regula a resposta à estimulação alfa-adrenérgica na musculatura lisa cavernosa (43) e também a expressão de nNOS (44). Estudo feito em camundongos geneticamente modificados [eNOS

(-/-)] mostra que a supressão de eNOS causa resistência ao relaxamento induzido por inibidores de Rho-cinase, sugerindo um equilíbrio entre o NO liberado pelo endotélio e a ação contraturante da Rho-cinase nos corpos cavernosos em estado fisiológico basal (45).

Lin e colaboradores em “Molecular Yin and Yang of erectile function and dysfunction”, dá a devida ênfase ao estado contraturante da flacidez, suas bases moleculares (via da Rho-cinase), e sua importância na disfunção erétil de doenças como o diabetes. Ressalta o, historicamente quase exclusivo, interesse pelos mecanismos de relaxamento e ereção – em detrimento dos de contração e flacidez, o que reafirma o recente interesse para o potencial terapêutico da inibição dos mecanismos moleculares de contração da musculatura lisa peniana (46).

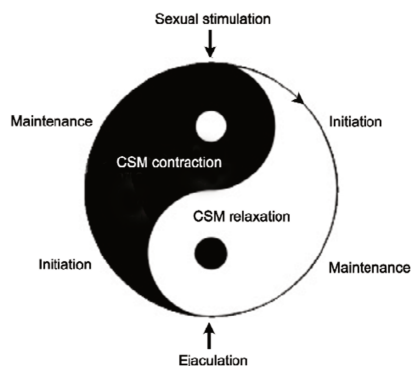


Figura 3: Ciclo da ereção peniana: mecanismos relaxantes (Yang) atuam na fase de flacidez assim como os contraturantes (Yin) atuam na fase do relaxamento. CSM (músculo liso cavernoso), (46).

Justificativa

A maioria dos estudos em modelos animais de função erétil foi realizada em ratos, coelhos e cachorros. Atualmente há interesse no desenvolvimento de modelos em camundongos, visto que o mesmo oferece potencialmente várias vantagens sobre os demais modelos animais, entre elas menor custo e maior praticidade. Além disso, a utilização de tecnologia transgênica (*knockout*) e a disponibilidade de ferramentas de biologia molecular para investigar determinantes genéticos da função erétil é única para os modelos em camundongos.

A ocorrência de disfunção erétil em adultos com mais de quarenta anos de idade é de 50% e, estudos mostram, que esse número tem aumentado, nos últimos anos, também em adultos jovens (>20 anos). Dentre as alternativas de tratamento, a mais atual é a dos inibidores de PDE5, entretanto, existem indivíduos que não respondem a esse tratamento.

Pouco interesse, ainda, é dado aos mecanismos de contração da musculatura lisa trabecular e, os estudos existentes são inconclusivos (46), justificando este estudo.

Objetivo

Objetivo geral

Investigar os mecanismos pelos quais a castração cirúrgica altera a função erétil e a atividade dos inibidores das vias óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5 e Rho-cinase.

Objetivo específico

Investigar se no modelo proposto de disfunção erétil *in vivo* causado por orquiectomia em camundongos CB57B6 ocorre também alterações da resposta do corpo cavernoso *in vitro* a estímulos contráteis e estímulos relaxantes.

Investigar as alterações morfológicas nos corpos cavernosos dos camundongos castrados.

Avaliar a expressão protéica (Imunoistoquímica/ Western blot) de proteínas das vias acima mencionadas.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Foram usados camundongos C57BL/6 pesando entre 25 e 30 g (8 a 12 semanas), provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), os quais ficaram alojados pelo menos por uma semana no biotério do Departamento de Farmacologia em gaiolas coletivas, mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 h). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Ética em Experimentação Animal (CEEAI/IB/UNICAMP) em 01 de agosto de 2007.

2.2. Procedimento cirúrgico

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de cetamina (87 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg). A castração cirúrgica foi executada em condições assépticas sob anestesia dos animais como descrito por Palese (47). Foi feita uma incisão ao longo da linha média do escroto, de modo a permitir o acesso bilateral ao conteúdo hemiescrotal. O cordão espermático foi amarrado e isolado para remoção dos testículos. Finalmente, o escroto foi suturado e os camundongos alocados em gaiolas após recuperação da anestesia. Após o tratamento, os animais foram utilizados para a execução dos protocolos experimentais.

2.3. Ensaio funcionais

Os animais, quatro semanas após a castração, foram anestesiados com isoflurano e exsanguinados. Em seguida, tiveram o penis removido e colocado em solução de Krebs-

Henseleit (mM: NaCl, 130; NaHCO₃, 14,9; dextrose, 5,5; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,18; MgSO₄.7H₂O, 1,17; CaCl₂.2H₂O, 1,6) gelada. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conectivos e glândula peniana, dois segmentos de corpo cavernosos foram obtidos de cada animal. Os tecidos foram montados em banhos para órgão isolados (10 mL) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%) e mantida a temperatura de 37°C (pH7,4), sendo suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa. A tensão aplicada aos tecidos (4,0-5,0 mN) foi periodicamente ajustada até a estabilização (~60min), os ensaios sempre foram realizados comparando os animais castrados com o grupo controle. Após o período de estabilização foram realizados os ensaios a seguir e, ao final de cada experimento, os segmentos foram pesados para corrigir os resultados pelo peso úmido de tecido (mN/mg).

- a. Resposta contrátil à fenilefrina (10nM-100µM), na ausência ou presença de L-NAME (100µM).
- b. Resposta contrátil à fenilefrina (10nM-100µM), na ausência ou presença do HA1077 (10µM).
- c. Resposta contrátil à estimulação elétrica. A estimulação elétrica foi induzida através de um estimulador Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA), pela geração de pulsos de 1ms de duração a 50V em frequências variadas (4, 8 e 16Hz).
- d. Resposta relaxante à acetilcolina (10nM-10µM), na ausência ou presença de L-NAME (100µM).
- e. Resposta relaxante ao Bay 41-2272 (1nM-30µM) na ausência ou presença de ODQ (10µM).

- f. Resposta relaxante ao SNP (10nM-10µM) na ausência ou presença de ODQ (10µM).
- g. Resposta relaxante ao HA1077 (10nM-10µM).

2.4. Análise macroscópica, histológica e imunoistoquímica

Exame macroscópico (da oitava a quadragésima semana de vida dos animais) e processamento histológico: após a eutanásia dos animais, seus pênis foram retirados cirurgicamente e fixados em formalina 10% tamponada, por 24h. Em seguida, os pênis foram mensurados em 3 dimensões, seccionados e enviados para processamento histológico de rotina em autotécnico, para obtenção dos blocos de parafina. Cortes histológicos de 4µm feitos a partir destes blocos foram corados através da técnica do tricrômico de Masson, para análise morfológica preliminar e cálculo de algumas das variáveis morfométricas.

Técnica imunoistoquímica para musculatura lisa: cortes histológicos de 4µm feitos a partir dos blocos de parafina contendo os segmentos penianos foram colocados em lâminas previamente lavadas, desengorduradas e tratadas em solução de organossilano a 25% em acetona (3-ainopropil-trietoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América; cod. A3648). As secções foram desparafinizadas em banhos de xilol, hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H₂O₂ a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS. Para recuperação antigênica, foi utilizada uma panela a vapor T-fall. No interior dessa, as lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0

durante 30 minutos a 95°C e, a seguir, lavadas em água corrente. Foi pesquisado um marcador de musculatura lisa, através do anticorpo primário específico anti-actina de músculo liso (clone 1A4, DAKOCYTOMATION, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América; diluição: 1:50). Este anticorpo foi gotejado sobre o corte histológico na diluição adequada e incubado durante o dia, por 2 horas a temperatura ambiente (24°C). Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secadas e incubadas com o sistema de revelação baseado em polímero Advance® (DAKOCYTOMATION, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América) por uma hora a 37° C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidrocloro de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500µl de H₂O₂ a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37°C. O material foi, então, lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas em lamínulas e resina Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Secções seriadas de pênis murino, não incubadas com o anticorpo primário, foram utilizadas como controles negativos. Além disso, secções histológicas de intestino murino contendo estruturas sabidamente positivas para o marcador acima mencionado foram utilizadas como controles positivos a cada bateria de coloração.

Análise de imagem: os preparados imunoistoquímicos foram avaliados utilizando um microscópio Leica DM 5000B de campo claro (Leica, Wetzlar, Alemanha), acoplado a uma câmera digital (sensor CCD) Leica DFC 300, colorida, de alta definição (12Mpixels).

Foram capturadas 3 imagens por animal, utilizando as objetivas de 4X ou 10X, dependendo da variável morfométrica alvo da análise.

Variáveis de análise morfométrica. Para a análise morfométrica, foi utilizado o programa de análise de imagem ImageJ versão 1.41 (NIH, EUA) que permite a segmentação manual e semi-automática de estruturas histológicas imunocoradas, bem como sua mensuração automática. Foram analisadas as seguintes variáveis morfométricas:

- a. Comprimento peniano: comprimento peniano mensurado durante o exame macroscópico em mm.
- b. Área de secção peniana: área de secção peniana mensurada através do programa de análise de imagem em mm².
- c. Volume peniano: volume peniano estimado, obtido através da formula: $VP = CP \times AP$ mm³
- d. Área de secção de corpos cavernosos: área de secção dos corpos cavernosos mensurada através do programa de análise de imagem em mm².
- e. Fração de musculatura lisa: fração de musculatura lisa dos corpos cavernosos mensurada através do programa de análise de imagem.
- f. Fração de tecido colágeno: fração de tecido conjuntivo não muscular dos corpos cavernosos mensurada através do programa de análise de imagem.
- g. Fração de lúmen sinusoidal: fração de tecido dos corpos cavernosos ocupada por lúmen vascular sinusoidal, mensurada através do programa de análise de imagem.

2.5. Western Blot

Os tecidos dos diferentes grupos foram homogeneizados em tampão de lise contendo 40 mM HEPES, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 1 mM Na₃VO₄ e 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto durante 30 min em gelo. As amostras foram centrifugadas a 10.000g e o sobrenadante coletado. A concentração de proteínas solúveis foi determinada usando kits de ensaios de proteína que utilizam a albumina sérica bovina (BSA). Uma alíquota de 40µg de proteína de cada amostra foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas pelo tratamento com 5% leite desnatado em TBS contendo 0,05% tween 20, incubadas com anticorpos primários (alfa guanilil ciclase e beta guanilil ciclase – abcam; PDE5 e alfa actina – Cell Signaling) e, subsequentemente, foram tratadas com os devidos anticorpos secundários e visualizada utilizando-se um kit de detecção de quimioluminescência (Cell Signaling). Os resultados foram obtidos como a razão densitométrica da proteína de interesse/alfa-actina.

2.6. Doseamento de testosterona

Os animais (n=6), quatro semanas após a castração, foram anestesiados com isoflurano e 1,0mL de sangue foi coletado com seringas contendo 10µL de heparina (5000UI). O sangue foi centrifugado e o plasma utilizado para a dosagem da testosterona por kit de Elisa (Neogen - #402510), conforme instruções do fabricante.

Em tubos contendo 100µL de plasma foi adicionado 1,0mL de éter etílico e agitado por 30 segundos. Após a separação das fases, o éter etílico foi evaporado em N₂ e o resíduo

foi dissolvido em 100 μ L de tampão extrator (fornecido no kit) em seguida, 10 μ L dessa solução foram diluídos em 990 μ L de tampão extrator. 50 μ L dessa diluição foram pipetados, em triplicata, na placa. Em seguida, 50 μ L da solução enzimática foi adicionado em cada poço e a placa foi deixada em agitador por 30 minutos. Após a incubação a placa foi lavada com tampão de lavagem (300 μ L/ poço) por 3 vezes. 150 μ L de substrato foi adicionado em cada poço e incubado sob agitação por 30 minutos e procedida a leitura a 650nm e 490nm (conforme recomendação do fabricante) em leitor de placa Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek, software Gen5). O resultado foi expresso em ng/mL de sague.

2.7. Análise estatística

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração produzida pela fenilefrina ou estimulação elétrica, sendo posteriormente dividido pelo peso úmido de tecido e expresso em mili Newton por miligrama (mN/mg). Os valores de relaxamento foram calculados por subtração a partir da contração induzida inicialmente, pela fenilefrina, sendo posteriormente dividido pelo peso úmido de tecido e, também, expresso em (mN/mg).

O logaritmo negativo da EC50 (pEC50) e a resposta máxima (emax) foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparações múltiplas de variáveis independentes, seguida pelo teste de Bonferroni, utilizando o programa InStat (GraphPad Software). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados

3.1. *Curvas concentração-efeito ao agonista alfa₁-adrenérgico, fenilefrina em camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados.* Quando comparada ao grupo controle, a potência de contração à fenilefrina (figura 4, tabela 1) teve aumento de meia casa log nos animais castrados ($p < 0,01$) e, não houve diferença de potência na presença do L-NAME ($100\mu\text{M}$, tabela 1). A resposta máxima, dos animais castrados, foi maior que a encontrada no grupo controle ($p < 0,01$, tabela 1) e o inibidor HA1077 reduziu tanto a potência quanto a resposta máxima dos animais castrados ($p = 0,0264$, figura 5, tabela 2) mas não alterou a do grupo controle, tabela 2.

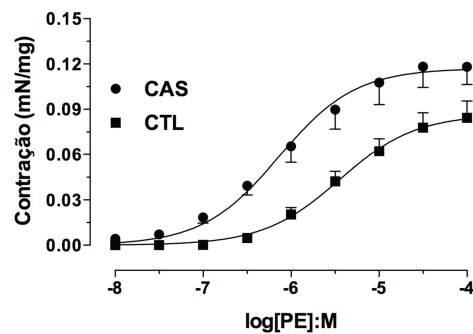


Figura 4: Curva concentração-efeito ao agonista alfa-adrenérgico, fenilefrina, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados. A contração foi calculada a partir da resposta contraturante (miliNewton) da fenilefrina dividida pelo peso úmido do tecido (miligrama). Dados representam media \pm erro padrão da média, $n=6$ animais.

Tabela 1. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) do agonista α_1 adrenérgico fenilefrina na presença e ausência do inibidor de óxido nítrico sintase L-NAME em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.

	pEC_{50}		E_{max} (mN/mg de tecido úmido)	
	Controle	Castrado	Controle	Castrado
Sem inibidor	5,452±0.100	6,138±0.110**	0,086±0.005	0,117±0.005
L-NAME	5,980±0.110*	6,230±0.100	0,096±0.005	0,114±0.005**

Dados representam média ± erro padrão média, n=6 animais. *: $p<0,05$ **: $p<0,01$.

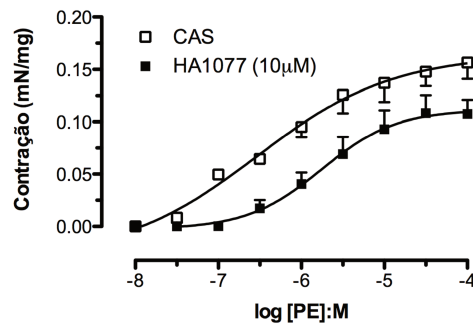


Figura 5: Curva concentração-efeito ao agonista alfa-adrenérgico, fenilefrina, na presença e ausência de HA1077 (10 μ M) em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados. A contração foi calculada a partir da resposta contraturante (miliNewton) da fenilefrina dividida pelo peso úmido do tecido (miligrama). Dados representam media ± erro padrão da média, n=6 animais.

Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) ao agonista α_1 adrenérgico fenilefrina na presença e ausência do inibidor de Rho-cinase HA1077 em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.

	pEC_{50}		E_{max} (mN/mg de tecido úndo)	
	Controle	Castrado	Controle	Castrado
Sem inibidor	5,301±0,200	6,533±0.330	0,098±0.013	0,164±0.017
HA1077	5,544±0.110	5,757±0.170***	0,098±0.007	0,111±0.010##

Dados representam média \pm erro padrão média, n=6 animais. ***: $p<0,001$; ##: $p<0.01$, comparados ao castrado na ausência do inibidor.

3.2. *Curva frequência resposta em corpo cavernoso de camundongos cirurgicamente castrados.* A resposta, dependente da frequência, contraturante à estimulação elétrica nos animais castrados, invariavelmente, foi duplicada em relação ao observado para o grupo controle, figura 6.

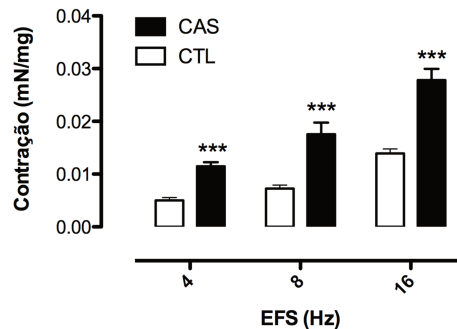


Figura 6: Frequência-resposta em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados. Estimulação elétrica (4-16Hz, 1ms de duração, 5V, duração 10 segundos), n= 4 animais, ***p<0,001.

3.3. *Curva concentração-efeito à acetilcolina em corpo cavernoso de camundongos cirurgicamente castrados.* A resposta à acetilcolina, na musculatura lisa, pode ocorrer de duas formas. Na presença de endotélio ela induz a liberação de NO e este, por sua vez, induz relaxamento da musculatura lisa e, na ausência de endotélio, a acetilcolina age diretamente no músculo liso causando contração. Neste experimento a ACh obteve sua resposta máxima de relaxamento, nos animais castrados, muito aquém da dose necessária para a resposta máxima no grupo controle (CAS=1 μ M; CTL=10 μ M, tabela 3) e nas doses subsequentes casou contração, figura 7. A presença de L-NAME (100 μ M) aboliu a resposta relaxante em ambos os grupos.

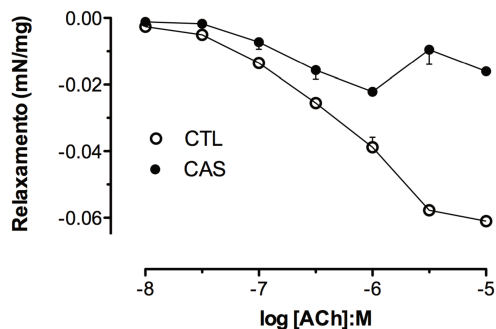


Figura 7: Curva concentração-efeito à acetilcolina, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados. Relaxamento foi calculado a partir da resposta contraturante (miliNewton) prévia da fenilefrina subtraído o valor de relaxamento após a adição das sucessivas doses de acetilcolina e dividido pelo peso úmido do tecido (miligrama). Dados representam média \pm erro padrão da média, n=6 animais.

Tabela 3. Valores de resposta máxima (E_{max}) à acetilcolina em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.

E_{max} (mN/mg de tecido úmido)	
Controle	Castrado
-0,061 \pm 0,001	-0,022 \pm 0,001

Dados representam média \pm erro padrão média, n=6 animais.

3.4. *Curva concentração-efeito aos ativadores da via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5, BAY 41-2272 (ativador de guanilil ciclase, independente de NO) e SNP (doador de NO) em corpo cavernoso de camundongos cirurgicamente castrados.* Ambos os ativadores relaxaram a musculatura lisa cavernosa dos animais cirurgicamente castrados, entretanto, o Bay 41-2272 (figura 8a, tabela 4) teve uma redução significativa na potência ($p=0,007$) e na resposta máxima ($p=0,0007$) enquanto que a resposta ao SNP (figura 8b, tabela 4) não sofreu redução nem de potência nem de resposta máxima.

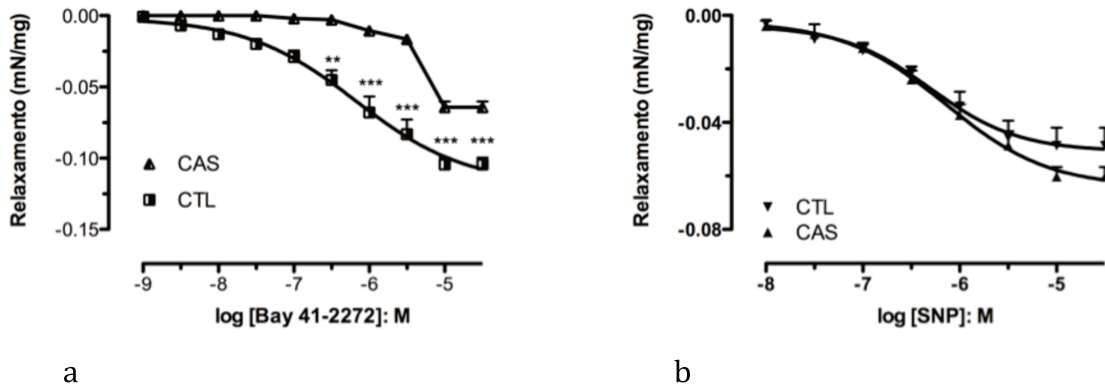


Figura 8: Curva concentração-efeito aos inibidores da via óxido nítrico-GMP cíclico-PDE5, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados. Relaxamento foi calculado a partir da resposta contraturante (miliNewton) prévia da fenilefrina subtraído o valor de relaxamento após a adição das sucessivas doses de droga e dividido pelo peso úmido do tecido (miligrama). a: ativador da guanilil ciclase, independente de óxido nítrico, BAY 41-2272 e b: doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio. Dados representam media \pm erro padrão da média, $n=4$ animais.

Tabela 4. Valores de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{max}) aos ativadores da via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5, BAY 41-2272 (ativador de guanilil ciclase, independente de NO) e SNP (doador de NO) em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.

	pEC ₅₀		E _{max} (mN/mg de tecido úmido)	
	Controle	Castrado	Controle	Castrado
BAY 41-2272	-6,126±0,178	-5,378±0,081***	-0,112±0,011	-0,064±0,002***
SNP	-6,303±0,181	-6,143±0,131	-0,050±0,004	-0,064±0,004

Dados representam média ± erro padrão média, n=4 animais, ***p<0,001.

3.5. *Curvas concentração-efeito ao inibidor da Rho-cinase, HA1077, em camundongos C57bl/6 cirurgicamente castrados.* A potência do HA1077 está aumentada em uma casa log nos animais cirurgicamente tratados e sua resposta máxima foi significativamente maior do que a do grupo controle (Figura 9, tabela 4).

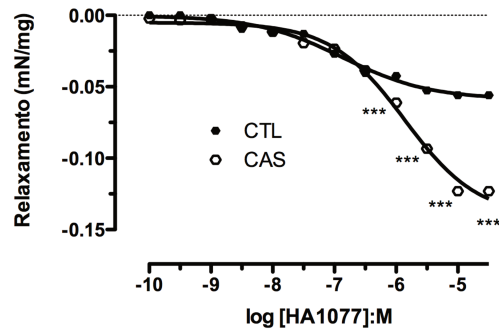


Figura 9: Curva concentração-efeito ao HA1077, em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6 controle e cirurgicamente castrados. Relaxamento foi calculada a partir da resposta contraturante (miliNewton) prévia da fenilefrina subtraído o valor de relaxamento após a adição das sucessivas doses do HA1077 e dividido pelo peso úmido do tecido (miligrama). Dados representam media \pm erro padrão da média, n=4 animais, ***: p<0,001).

Tabela 5. Valores de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{max}) ao inibidor de Rho-cinase HA1077 em corpo cavernoso de camundongos C57bl/6.

pEC ₅₀		E _{max} (mN/mg de tecido úmido)	
Controle	Castrado	Controle	Castrado
6,867 ± 0,070	5,863 ± 0,060***	0,058 ± 0,001	0.141 ± 0,005***

Dados representam média ± erro padrão média, n=4 animais. ***: p<0,001.

3.6. Análise macroscópica e histológica

A análise macroscópica mostra que o comprimento do pênis nos animais controle aumenta em média 33% da oitava (CTL0) até a trigésima segunda (CTL24w) semana de vida enquanto que, esse crescimento, é de cerca de 2,5% nos animais castrados, também comparados ao CTL0, e esse crescimento acontecendo apenas até a décima sexta semana de vida (CAS8w) e, regride 5% até a quadragésima semana (CAS32w). Nesse mesmo período a área do pênis no grupo controle aumenta 40% e nos animais castrados reduz 13%. O volume do pênis aumenta 80% no controle e reduz 24% no castrado. Com base nesses resultados podemos dizer que a castração induz um estado de hipoplasia nos camundongos nas oito semanas subsequentes à castração, passando para um estado de atrofia a partir de então (figura 10).

Já nas análises microscópicas, os animais castrados apresentaram redução de 7% na área dos corpos cavernosos e o grupo controle, por outro lado, teve um ganho de 78%,

ambos comparados ao CTL0. A porção de musculatura lisa está 30% diminuída nos animais castrados e 55% maior no grupo controle e, não houve alteração na matriz colágena.

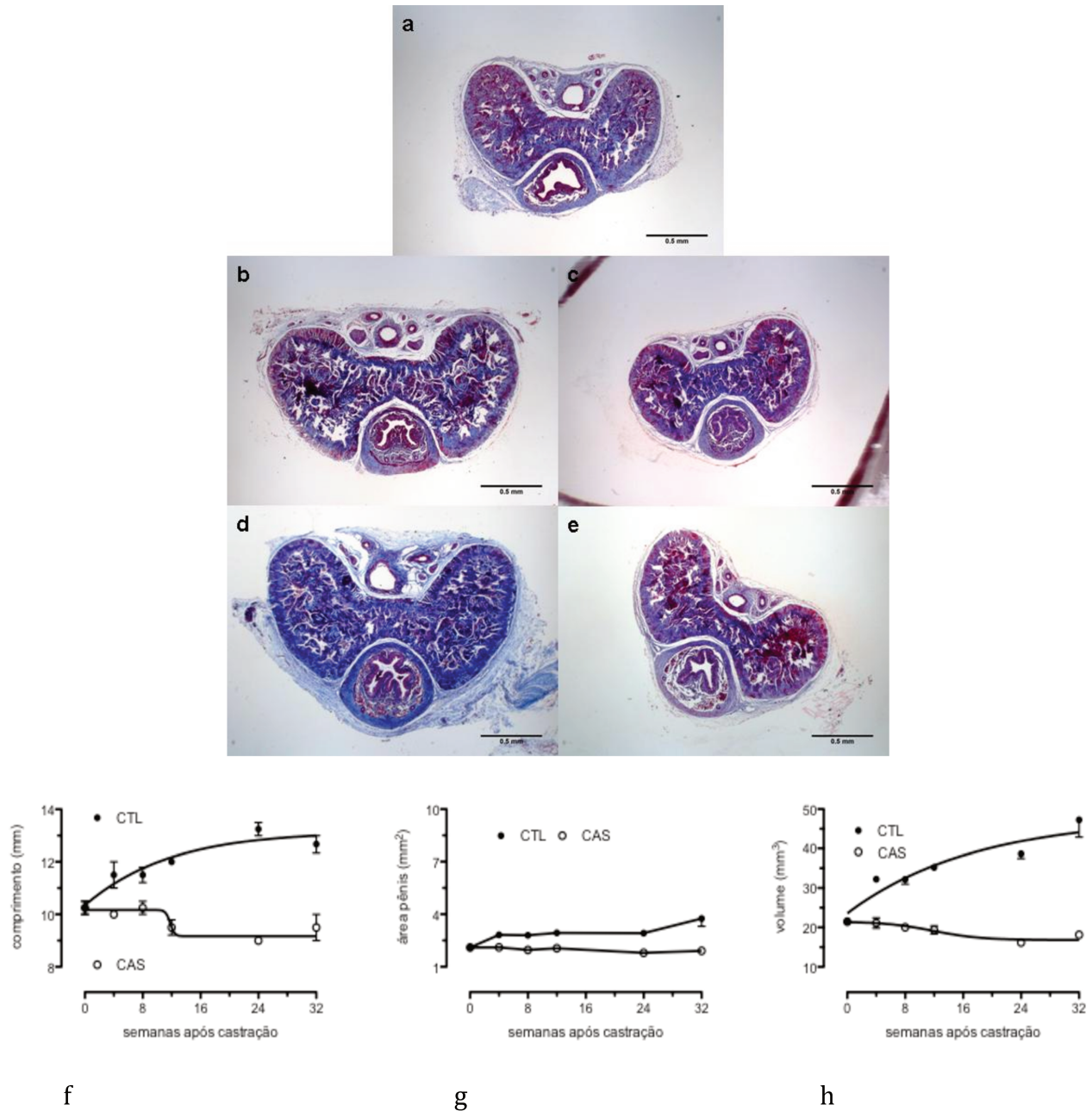


Figura 10: Desenvolvimento peniano, de camundongos C57BL/6 castrados cirurgicamente comparados ao grupo controle, observado ao longo do período após a castração: secção transversal representativa (a-e): a: controle 0, b: controle após 4 semanas, c: castrado após 4 semanas, d: controle após 8 semanas, d: castrados após 8 semanas; curva do desenvolvimento: f: comprimento, g: área do pênis, h: volume peniano. (Dados representam média \pm erro padrão média, n=6).

3.7. *Análise imunoistoquímica e Western Blot*

Analisadas por imunoistoquímica (n=6), a imunexpressão de óxido nítrico sintase neuronal foi semelhante para CAS4w e CTL4w enquanto que a óxido nítrico sintase endotelial, a fosfodiesterase 5 e a guanilil ciclase estão reduzidas nos camundongos castrados (CAS4w), Figura 11. A diminuição da expressão protéica da fosfodiesterase 5 e da guanilil ciclase foram observadas também nas análises por western blot.

3.8. *Doseamento de testosterona*

Os animais castrados, quatro semanas após a orquiectomia, apresentam cerca de 6% da testosterona encontrada nos animais controle (controle= $0,108 \pm 0,033$; castrado= $0,007 \pm 0,003$, n=6, ng/mL) que foi tomada como 100% para a execução do cálculo.

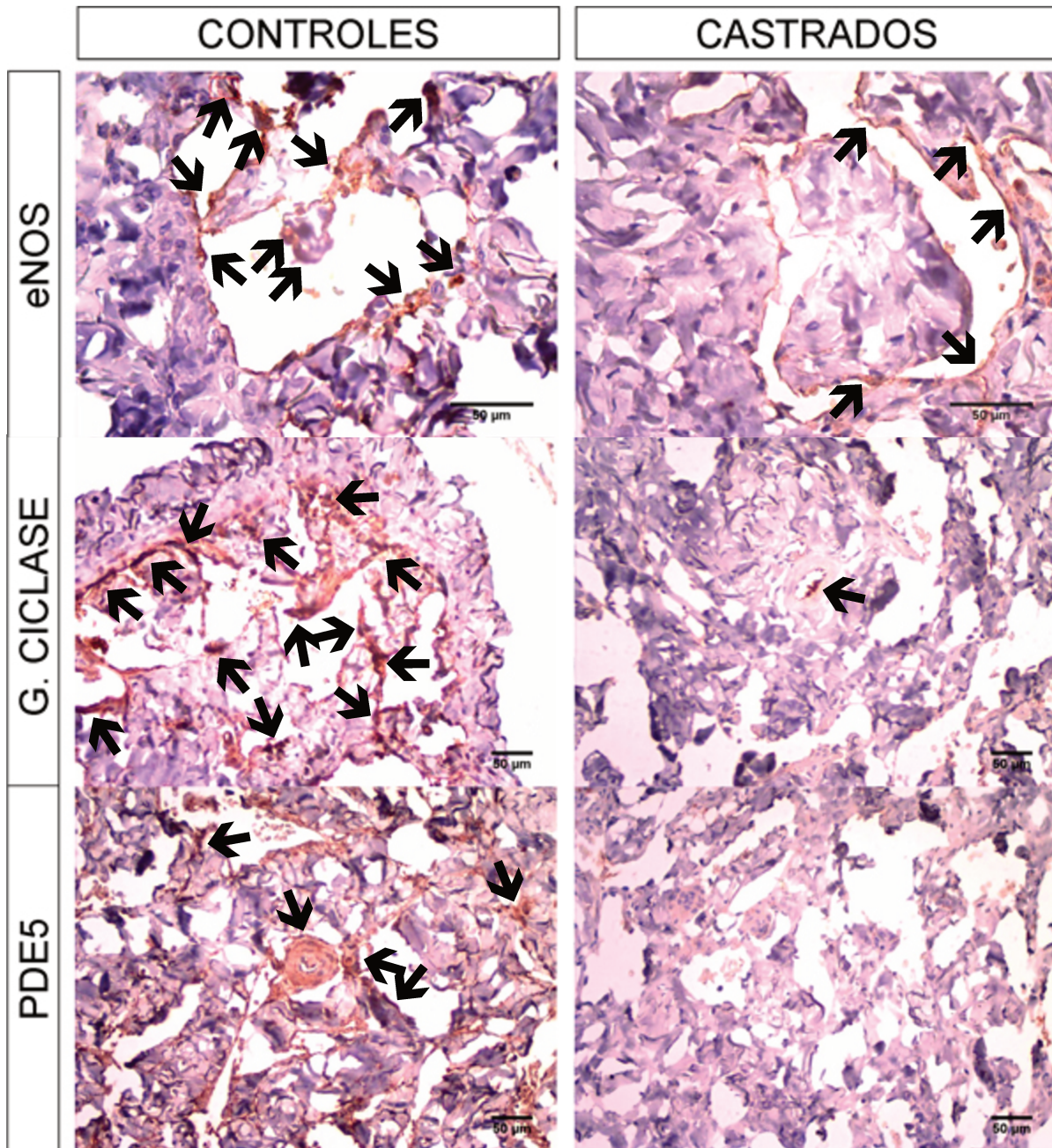


Figura 11: Fotomicrografias ilustrativas da imunoposição peniana (corpos cavernosos de camundongos C57BL/6 castrados cirurgicamente comparados ao grupo controle) de: eNOS (no endotélio dos sinusóides), guanilil ciclase (em musculatura lisa trabecular e arteriolar cavernosa) e fosfodiesterase 5 (PDE5; em musculatura lisa trabecular e arteriolar cavernosa), em CAS4w e CTL4w. Imunoperoxidase, 400X (eNOS) e 200X (PDE5 e GC).

4. Discussão

Neste trabalho demonstramos que a castração cirúrgica, limitando o nível de testosterona ao que é produzido pelas glândulas adrenais (cerca de 6% do que foi encontrado nos animais controle), aumenta a sensibilidade da musculatura lisa cavernosa a mecanismos contraturantes, além de reduzir a resposta ao mecanismo de relaxamento mediado pela via óxido nítrico-GMPcíclico-PDE5. Essa redução abrupta de testosterona também promove mudanças na morfologia peniana, perda de musculatura lisa e estriada, aumento de tecido adiposo e reduz a expressão de proteínas essenciais para manutenção do funcionamento do mecanismo de ereção como a eNOS e, demonstrado pela primeira vez, também a guanilil ciclase.

Estudos mostram que a resposta a agonistas adrenérgicos está aumentada no corpo cavernoso de ratos castrados (43, 48) corroborando os resultados encontrados na curva dose-efeito à fenilefrina e também com o aumento da contração neurogênica avaliada através de estimulação elétrica, onde, esta também evoca ativação de receptores α_1 adrenérgicos. Em parte esse aumento está relacionado a uma *up-regulation* na via da RhoA/Rho-cinase pois, o inibidor de Rho-cinase, HA1077, causou uma diminuição no efeito contraturante da fenilefrina nos animais castrados sem promover qualquer diferença na resposta do grupo controle. Lin e colaboradores demonstram um aumento do mecanismo contraturante mediado pela via RhoA/Rho-cinase nos animais castrados, sendo esta via responsável pela manutenção do tônus muscular no estágio de flacidez peniana (46). É sabido que o tecido cavernoso de ratos, coelhos e humanos expressam RhoA e Rho-kinase (isoformas ROKa e ROKb) (49-51). O papel da Rho-cinase na regulação do *tonus* de músculo liso foi elucidado *in vitro* e *in vivo* utilizando-se inibidores específicos desta enzima, tais como fasudil (HA1077) e (R)-(+)-trans-N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil)-

ciclohexanecarboxamida (Y-27632). Estes compostos ocupam o sítio ligante para o ATP na enzima Rho-cinase e, portanto, previnem a fosforilação e inativação da MLCP (52, 53) evitando assim a manutenção da contração na musculatura lisa.

A administração intracavernosa de Y-27632 em pênis de rato causa aumento da pressão intracavernosa de forma independente de NO (54). A potente atividade vasoconstritora observada após administração intracavernosa de metoxamina (agonista α_1 -AR) ou endotelina-1 é inibida pelo tratamento prévio com Y-27632 (49), sustentando que o sistema RhoA/Rho-cinase regula a vasoconstrição peniana, essa hipótese corrobora a de outros trabalhos publicados (45, 51-59).

Os mecanismos que regulam o relaxamento da musculatura lisa cavernosa também se encontram afetados, pela ausência ou diminuição de testosterona. Foi demonstrado por trabalhos anteriores que a testosterona regula a expressão e a atividade de PDE5 (42, 60, 61) e por isso a castração reduz a resposta ao tadalafil (42), entretanto, caso essa redução de PDE5 ocorra, o que poderia se esperar como consequência seria priapismo já que a PDE5 é pró-contraturante. Yang e colaboradores rebatem essas afirmações e afirmam que a testosterona não controla a expressão e/ou a atividade da PDE5 mas, sim, o crescimento e manutenção da musculatura lisa uma vez que, segundo eles, ao corrigir os dados de expressão da PDE5 pelos de alfa-actina e beta-tubulina, não há diferença entre os animais castrados e o controle (ou castrados+testosterona) (42).

Em nosso trabalho, verificamos, além da diminuição de PDE5, também, a diminuição da guanilil ciclase. Este fato não foi mencionado por nenhum desses autores mas pode, também, estar relacionado à perda de musculatura lisa. Com isso é plausível a resposta reduzida ao Bay 41-2272, em corpo cavernoso de camundongos castrado, embora o mesmo não ocorra com o SNP restando como explicação, a maior potência do SNP em

relação ao Bay 41-2272. A esse respeito, existem trabalhos demonstrando que o SNP responde de forma semelhante em animais castrados e não castrados assim como, mostrando que a resposta foi reduzida, ou ainda, usado concomitantemente com o Bay 41-2272 aumenta a resposta quando comparado a qualquer um dos dois de forma isolada (44, 62-65).

O resultado obtido para o relaxamento à acetilcolina pode estar relacionado com a integridade do endotélio pois, via endotélio a ACh relaxa a musculatura lisa cavernosa e, na ausência do mesmo o efeito é o oposto. Como demonstrado, nas concentrações maiores a ACh induziu contração nos animais castrados, por outro lado, o inibidor de Rho-cinase promoveu um relaxamento extremamente maior nesses animais. Outro fato que corrobora essa hipótese é a diminuição de eNOS encontrada nas análises imunohistoquímicas realizadas e, também, os resultados publicados por Priviero e colaboradores e Jin e colaboradores, demonstrando a diminuição do efeito relaxante induzido por inibidores de Rho-cinase em camundongos *knockout* [eNOS (-/-)] (45) e o aumento da atividade da via RhoA/ Rho-cinase em ratos com idade superior a 20 meses (66).

5. Sumário e conclusão

A castração cirúrgica em camundongos adultos:

- ⇒ Aumentou a resposta contrátil à fenilefrina;
- ⇒ Não altera a contração causada pela fenilefrina na presença de L-NAME;
- ⇒ A presença de HA1077 reduz a resposta à fenilefrina;
- ⇒ Reduziu a resposta à acetilcolina;
- ⇒ Aumentou a resposta contrátil à estimulação elétrica;
- ⇒ Não alterou a resposta ao nitroprussiato de sódio;
- ⇒ Reduziu a resposta ao Bay-412272;
- ⇒ Aumentou a resposta ao HA1077;
- ⇒ Reduziu o tamanho de pênis, em comprimento, área e volume;
- ⇒ Causou redução na musculatura lisa peniana;
- ⇒ Reduziu a área dos corpos cavernosos;
- ⇒ Reduziu a expressão das enzimas eNOs, GCs e PDE5.

Conclusão: Os dados mostraram que a redução drástica de testosterona leva a disfunção erétil, exacerbando a resposta aos mecanismos contraturantes e reduzindo a resposta aos mecanismos relaxantes, bem como, uma hipoplasia seguida por hipertrofia peniana.

1. Wespes E, Schulman CC. Erectile dysfunction and cardiovascular diseases. *Arch Esp Urol*. 2010;63(8):649-54.
2. Arver S, Dobs AS, Meikle AW, Allen RP, Sanders SW, Mazer NA. Improvement of sexual function in testosterone deficient men treated for 1 year with a permeation enhanced testosterone transdermal system. *J Urol*. 1996;155(5):1604-8.
3. Mills TM, Lewis RW. The Role of Androgens in the Erectile Response: A 1999 Perspective. *Mol Urol*. 1999;3(2):75-86.
4. Mills TM, Stopper VS, Reilly CM. Sites of androgenic regulation of cavernosal blood pressure during penile erection in the rat. *Int J Impot Res*. 1996;8(1):29-34.
5. Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev*. 1995;75(1):191-236.
6. Stief CG, Noack T, Andersson KE. Signal transduction in cavernous smooth muscle. *World J Urol*. 1997;15(1):27-31.
7. Zhao C, Chae HJ, Kim SH, Cui WS, Lee SW, Jeon JH, et al. A New Perfusion Model for Studying Erectile Function. *J Sex Med*. 2010.
8. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005;32(4):379-95, v.
9. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med*. 2000;342(24):1802-13.
10. Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev*. 2001;53(3):417-50.
11. Celtek S. Nitrenergic-noradrenergic interaction in penile erection: a new insight into erectile dysfunction. *Drugs Today (Barc)*. 2000;36(2-3):135-46.
12. Andersson KE. Pharmacology of erectile function and dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2001;28(2):233-47.
13. Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol*. 1987;385:437-48.
14. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. 1997;49(2):157-230.

15. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325-58.
16. Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(6):2166-70.
17. Stothers L, Laher I, Christ GT. A review of the L-arginine - nitric oxide - guanylate cyclase pathway as a mediator of lower urinary tract physiology and symptoms. *Can J Urol.* 2003;10(5):1971-80.
18. Saenz de Tejada I, Blanco R, Goldstein I, Azadzo K, de las Morenas A, Krane RJ, et al. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am J Physiol.* 1988;254(3 Pt 2):H459-67.
19. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med.* 1992;326(2):90-4.
20. Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, Ignarro LJ, Rajfer J, Lue TF. Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 2):H419-22.
21. Nakane M, Arai K, Saheki S, Kuno T, Buechler W, Murad F. Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem.* 1990;265(28):16841-5.
22. Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(3):696-701.
23. Schoser BG, Behrends S. Soluble guanylyl cyclase is localized at the neuromuscular junction in human skeletal muscle. *Neuroreport.* 2001;12(5):979-81.
24. Ehsan A, Sommer F, Schmidt A, Klotz T, Koslowski J, Niggemann S, et al. Nitric oxide pathways in human bladder carcinoma. The distribution of nitric oxide synthases, soluble guanylyl cyclase, cyclic guanosine monophosphate, and nitrotyrosine. *Cancer.* 2002;95(11):2293-301.
25. Smet PJ, Jonavicius J, Marshall VR, de Vente J. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves and identification of the cellular targets of nitric oxide in guinea-pig and human urinary bladder by cGMP immunohistochemistry. *Neuroscience.* 1996;71(2):337-48.

26. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Skvortsov VG, Mandrugina AA, Fedoseev VM. Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(1):8-23.
27. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):375-414.
28. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, et al. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 1998;17(11):3045-51.
29. NIH. Impotence. NIH Consensus Statement. 1992;10(4):1-33.
30. Granata AR, Rochira V, Lerchl A, Marrama P, Carani C. Relationship between sleep-related erections and testosterone levels in men. *J Androl*. 1997;18(5):522-7.
31. Schiavi RC, White D, Mandeli J, Levine AC. Effect of testosterone administration on sexual behavior and mood in men with erectile dysfunction. *Arch Sex Behav*. 1997;26(3):231-41.
32. Shabsigh R. Hypogonadism and erectile dysfunction: the role for testosterone therapy. *Int J Impot Res*. 2003;15 Suppl 4:S9-13.
33. Mulhall JP, Valenzuela R, Aviv N, Parker M. Effect of testosterone supplementation on sexual function in hypogonadal men with erectile dysfunction. *Urology*. 2004;63(2):348-52; discussion 352-3.
34. Ojumu A, Dobs AS. Is hypogonadism a risk factor for sexual dysfunction? *J Androl*. 2003;24(6 Suppl):S46-51.
35. Marin R, Escrig A, Abreu P, Mas M. Androgen-dependent nitric oxide release in rat penis correlates with levels of constitutive nitric oxide synthase isoenzymes. *Biol Reprod*. 1999;61(4):1012-6.
36. Traish AM, Park K, Dhir V, Kim NN, Moreland RB, Goldstein I. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology*. 1999;140(4):1861-8.
37. Chamness SL, Ricker DD, Crone JK, Dembeck CL, Maguire MP, Burnett AL, et al. The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. *Fertil Steril*. 1995;63(5):1101-7.

38. Lugg JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology*. 1995;136(4):1495-501.
39. Penson DF, Ng C, Cai L, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Androgen and pituitary control of penile nitric oxide synthase and erectile function in the rat. *Biol Reprod*. 1996;55(3):567-74.
40. Baba K, Yajima M, Carrier S, Akkus E, Reman J, Nunes L, et al. Effect of testosterone on the number of NADPH diaphorase-stained nerve fibers in the rat corpus cavernosum and dorsal nerve. *Urology*. 2000;56(3):533-8.
41. Liu WJ, Xin ZC, Xin H, Yuan YM, Tian L, Guo YL. Effects of icariin on erectile function and expression of nitric oxide synthase isoforms in castrated rats. *Asian J Androl*. 2005;7(4):381-8.
42. Zhang XH, Morelli A, Luconi M, Vignozzi L, Filippi S, Marini M, et al. Testosterone regulates PDE5 expression and in vivo responsiveness to tadalafil in rat corpus cavernosum. *Eur Urol*. 2005;47(3):409-16; discussion 416.
43. Reilly CM, Stopper VS, Mills TM. Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum. *J Androl*. 1997;18(1):26-31.
44. Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, Mills TM. Androgenic regulation of NO availability in rat penile erection. *J Androl*. 1997;18(2):110-5.
45. Priviero FB, Jin LM, Ying Z, Teixeira CE, Webb RC. Up-regulation of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway in corpus cavernosum from endothelial nitric-oxide synthase (NOS), but not neuronal NOS, null mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(1):184-92.
46. Lin CS, Xin ZC, Wang Z, Lin G, Lue TF. Molecular Yin and Yang of erectile function and dysfunction. *Asian J Androl*. 2008;10(3):433-40.
47. Palese MA, Crone JK, Burnett AL. A castrated mouse model of erectile dysfunction. *J Androl*. 2003;24(5):699-703.
48. Leipheimer RE, Sachs BD. Relative androgen sensitivity of the vascular and striated-muscle systems regulating penile erection in rats. *Physiol Behav*. 1993;54(6):1085-90.
49. Mills TM, Chitaley K, Wingard CJ, Lewis RW, Webb RC. Effect of Rho-kinase inhibition on vasoconstriction in the penile circulation. *J Appl Physiol*. 2001;91(3):1269-73.

50. Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, Kell P, Moncada S, Celtek S. Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells express Rho-kinase. *Int J Impot Res.* 2002;14(1):1-7.
51. Wang H, Eto M, Steers WD, Somlyo AP, Somlyo AV. RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization in erectile function. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30614-21.
52. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000;57(5):976-83.
53. Narumiya S, Ishizaki T, Uehata M. Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol.* 2000;325:273-84.
54. Chitaley K, Wingard CJ, Clinton Webb R, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, et al. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med.* 2001;7(1):119-22.
55. Rees RW, Ralph DJ, Royle M, Moncada S, Celtek S. Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* 2001;133(4):455-8.
56. Buyukafsar K, Un I. Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2003;472(3):235-8.
57. Linder AE, Webb RC, Mills TM, Ying Z, Lewis RW, Teixeira CE. Rho-kinase and RGS-containing RhoGEFs as molecular targets for the treatment of erectile dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2005;11(31):4029-40.
58. Teixeira CE, Ying Z, Webb RC. Proerectile effects of the Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinolinyl)sulfonyl]homopiperazine (H-1152) in the rat penis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(1):155-62.
59. Gratzke C, Angulo J, Chitaley K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7(1 Pt 2):445-75.
60. Morelli A, Filippi S, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Marini M, et al. Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology.* 2004;145(5):2253-63.
61. Armagan A, Kim NN, Goldstein I, Traish AM. Dose-response relationship between testosterone and erectile function: evidence for the existence of a critical threshold. *J Androl.* 2006;27(4):517-26.

62. Zhang XH, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Luconi M, Donati S, et al. Testosterone restores diabetes-induced erectile dysfunction and sildenafil responsiveness in two distinct animal models of chemical diabetes. *J Sex Med.* 2006;3(2):253-64; discussion 264-5, author reply 265-6.
63. Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch JP. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. *Urology.* 2003;61(2):464-7.
64. Alcorn JF, Toepfer JR, Leipheimer RE. The effects of castration on relaxation of rat corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol.* 1999;161(2):686-9.
65. Bivalacqua TJ, Rajasekaran M, Champion HC, Wang R, Sikka SC, Kadowitz PJ, et al. The influence of castration on pharmacologically induced penile erection in the cat. *J Androl.* 1998;19(5):551-7.
66. Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction. *FASEB J.* 2006;20(3):536-8.