

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA

NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES

**MANIPULAÇÃO DO EIXO  
“ECA2/ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS”  
NO TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS  
HIPERTENSOS E DIABÉTICOS**

Ouro Preto - MG

2011

NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES

**MANIPULAÇÃO DO EIXO  
“ECA2/ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS”  
NO TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS  
HIPERTENSOS E DIABÉTICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma), como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Romulo Leite

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Grabe Guimarães

Ouro Preto – MG

2011

NÍVEA CRISTINA VIEIRA NEVES

**MANIPULAÇÃO DO EIXO “ECA2 / ANGIOTENSINA-(1-7) / RECEPTOR MAS” NO  
TRATAMENTO DA DISFUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS HIPERTENSOS E  
DIABÉTICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma), como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Romulo Leite

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Grabe Guimarães

Área de concentração: Farmacologia Cardio-renal

Data da defesa: 12/08/2011

Resultado: \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Linder

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Penido

Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Romulo Leite

Universidade Federal de Ouro Preto

*A Deus,  
Ao meu amor Luciano,  
Ao meu filho,*

*“Se tudo fosse imensurável  
E desconhecido soubesse  
De sua enorme força  
Virá  
Como a consciência que cresce!”*

*À minha mãe Izaura,  
À minha irmã Tânia.*

## AGRADECIMENTOS

Desde o momento que resolvi investir nesse sonho, muitos foram os apoios que recebi.

Luciano, meu amor, companheiro, incentivador, professor e confidente. Quantos (e muitos) foram os conselhos e idéias compartilhadas. Como é difícil colocar num papel todo o meu agradecimento... Sem seu apoio não teria conseguido!

Minha mãe Izaura que, mais uma vez, soube compreender minha ausência e distância por todo esse tempo e, sempre, me dando força para não desistir.

Minha irmã Tânia, no tumulto das mudanças e casamentos, sempre perguntando como andavam as “coisas em Ouro Preto”.

Minha sogra Lúcia Helena, sempre preocupada em saber todas as novidades e os avanços de minha pesquisa. Grande incentivadora!

Aos queridos amigos, em especial, Alex, Fred, Pollyane, Beatriz, Daniela e Ramon.

Às minhas amigas e companheiras de Estrada Real, Juliana e Alessandra, que tornaram mais fáceis todas as idas e vindas. Quantos assuntos discutidos e comentados nessas imensas horas de viagens e, sobretudo, com um cenário privilegiado...

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Experimental, em especial, Priscila, Eduardo, Kamila, Danielle, Mariana, Leonardo, Hebert e Ana Carolina. Aos companheiros de finais de semana, Wallace, Cíntia e Carolina Lício. Obrigada pela companhia, aprendizado e amizade.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Romulo Leite. Agradeço em especial a confiança a mim dedicada e todo o apoio recebido nessa jornada que foi minha iniciação na pesquisa. Muitos foram os obstáculos e desafios enfrentados, mas,

maiores ainda, foram os ensinamentos de como a pesquisa pode ser recompensadora.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Grabe Guimarães pela amizade, companhia nos Congressos e pelos ensinamentos a mim dedicados. Como as análises estatísticas se tornaram mais agradáveis de serem feitas!

E, finalmente, não menos importantes, os órgãos financiadores, FAPEMIG, CAPES, CNPq e UFOP pela concessão de bolsas e auxílios financeiros para fomento dessa pesquisa e participação em Congressos.

“Procuras os grandes homens, estranho louco!  
Quem te ensinou tal coisa?  
Será hoje o tempo oportuno para isso?  
Ó malicioso investigador! Por que me tentas?”

*Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

Estudos recentes têm estabelecido um novo eixo regulatório do Sistema Renina Angiotensina. Neste eixo, a Angiotensina-(1-7) [ANG-(1-7)] é produzida a partir da Angiotensina I (ANG I) e Angiotensina II (ANG II), através da atividade catalítica da isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina (ECA2). Ao contrário do modelo clássico “ECA / Angiotensina II / receptor AT<sub>1</sub>”, o eixo “ECA2 / Angiotensina-(1-7) / receptor Mas” apresenta ações vasodilatadora e anti-proliferativa, além das atividades de natriurese e envolvimento com o sistema bradicinina-óxido nítrico. A ANG-(1-7), uma vez liberada nos sinusóides dos corpos cavernosos, pode estar relacionada com o processo de ereção peniana. Neste estudo, foi avaliada a importância de manobras farmacológicas que aumentam a atividade e/ou a concentração de componentes desse novo eixo no tratamento da disfunção erétil. Essas manobras incluíram a administração crônica de medicamentos que aumentam a formação da ANG-(1-7), inibidores da enzima conversora de angiotensina, enalapril e captopril, e um bloqueador de receptor AT<sub>1</sub> para ANG II, candesartana. Essas manipulações farmacológicas, foram testadas em modelos animais que sabidamente apresentam disfunção erétil (DE), como ratos com hipertensão induzida por acetato de deoxicorticosterona (DOCA, 200 mg/Kg) ou N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 25 mg/Kg/dia) e ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ, 40 mg/Kg). Os tratamentos com candesartana (2 mg/Kg/dia) ou enalapril (30 mg/Kg/dia) produziram uma redução na hipertensão induzida por L-NAME, que não foi acompanhada por melhora na função erétil. Pelo contrário, o tratamento com enalapril, nessa dose, reduziu o índice de ereção (razão PIC/PAM) quando comparados aos animais controles. No modelo de hipertensão induzida por DOCA-sal, foi observada uma redução nos níveis pressóricos acompanhada de uma melhora significativa dos índices de ereção após o tratamento por 4 semanas com captopril (25 mg/Kg/dia) ou candesartana (2 mg/Kg/dia). A DE nos ratos hiperglicêmicos só foi observada após 8 semanas da injeção de STZ. Nesses ratos, o índice de ereção por estimulação do gânglio pélvico maior no modelo anestesiado foi significativamente restabelecido após o tratamento com captopril ou candesartana por 8 semanas. Nossos dados sugerem que a utilização crônica de captopril ou candesartana, manobras que aumentam os níveis circulantes de ANG-(1-7),

apresentam um potencial no tratamento da DE de pacientes hipertensos e/ou diabéticos.

**Palavras-chaves:** Angiotensina-(1-7). Sistema Renina-Angiotensina. Disfunção erétil. Hipertensão. Diabetes

## ABSTRACT

Recent studies established a new regulatory axis of the renin-angiotensin system. In this axis, the Angiotensin-(1-7) [ANG-(1-7)] is produced from Angiotensin I (ANG I) and Angiotensin II (ANG II) through the catalytic activity of the isoform Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2). Unlike the classic model “ACE / Angiotensin II / AT1 receptor”, the “ECA2 / Angiotensin-(1-7) / Mas” has vasodilator and anti-proliferative activities in addition to natriuresis and involvement in the bradykinin-nitric oxide system. ANG-(1-7), once released into the sinusoids of the corpora cavernosa may be involved to penile erection process. In this study, we evaluated the importance of pharmacological managements that increase the activity and / or concentration of components of this new axis in the treatment of erectile dysfunction. These interventions involve the chronic administration of drugs that increase ANG-(1-7) formation such as angiotensin-converting enzyme inhibitors, enalapril and captopril, or an AT1 receptor blocker, candesartan. These pharmacological interventions have been tested in animal models of erectile dysfunction (ED), such as rats with hypertension induced by deoxycorticosterone acetate (DOCA, 200 mg/Kg by subcutaneous pellet implant) or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 25 mg/Kg/day in drinking water) and rats with diabetes induced by streptozotocin (STZ, 40 mg/Kg). Treatment with candesartana (2 mg/Kg/day) or enalapril (30 mg/Kg/day) produced a reduction in hypertension induced by L-NAME, which was not accompanied by improvement in erectile function. In contrast, treatment with enalapril in this dose reduced the erection index (ICP/MAP ratio) compared to control animals. In the DOCA-salt hypertensive rats, we observed a reduction in blood pressure accompanied by a significant improvement of erection index after treatment for 4 weeks of captopril (25 mg/Kg/day) or candesartan (2 mg/Kg/day). ED in hyperglycemic rats was only established after 8 weeks of STZ injection. Erection index induced by major pelvic ganglia electrical stimulation in anesthetized rats was significantly restored after treatment with captopril or candesartana for 8 weeks. Our data suggest that chronic use of captopril or candesartana, pharmacological interventions that increase circulating levels of ANG-(1-7), have the potential to treat ED in patients with hypertension and/or diabetes.

**Keywords:** Angiotensin-(1-7). Renin-Angiotensin System. Erectile dysfunction. Hypertension. Diabetes

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina  
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico  
ANG-(1-7): Angiotensina-(1-7)  
ANG I: Angiotensina I  
ANG II: Angiotensina II  
AT1: subtipo 1 do receptor para Angiotensina II  
ATP: trifosfato de adenosina  
AVE-0991: agonista do receptor Mas  
A-779: antagonista do receptor Mas  
BRA: bloqueador do receptor de Angiotensina II  
Ca<sup>2+</sup>: cálcio  
CCA: Centro de ciência animal  
CEUA: Comitê de ética para o uso de animais  
DAG: diacilglicerol  
DE: disfunção erétil  
DOCA: Acetato de deoxicorticosterona  
ECA: Enzima Conversora de Angiotensina  
ECA2: isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina  
GMPc: monofosfato de guanosina cíclico  
GPM: gânglio pélvico maior  
iECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina  
iPDE5: inibidores da fosfodiesterase 5  
IM: intra-muscular  
IP<sub>3</sub>: trifosfato de inositol  
L-NAME: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster  
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal (NOS-I)  
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial (NOS-III)  
NANC: não adrenérgicos não colinérgicos  
NE: norepinefrina  
NEP: endopeptidase neutra  
NO: óxido nítrico

NPY: neuropeptídeo Y

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PDE5: fosfodiesterase 5

PCP: prolil-carboxipeptidase

PEP: prolil-endopeptidase

PIC: pressão intracavernosa

PGE<sub>1</sub>: prostaglandina E<sub>1</sub>

SC: subcutânea

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SHRSP: ratos espontaneamente hipertensos com tendência a acidente vascular cerebral

SRA: Sistema Renina Angiotensina

STZ: estreptozotocina

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

UI: unidade internacional

VIP: peptídeo intestinal vasoativo

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 -	Anatomia e hemodinâmica peniana.....	23
Figura 2 -	Controle da função muscular peniana.....	26
Figura 3 -	Vias de formação da Ang II e Ang-(1-7).....	27
Figura 4 -	Balanço entre as atividades de ECA e ECA2.....	28
Figura 5 -	Fisiopatologia da DE na diabetes.....	32
Figura 6 -	Tratamento crônico com enalapril, nos grupos controle e tratados com L-NAME.....	36
Figura 7 -	Tratamento crônico com captopril, nos grupos controle e tratados com DOCA-sal.....	37
Figura 8 -	Tratamento crônico com captopril, nos grupos controle e com diabetes induzida por STZ.....	37
Figura 9 -	Tratamento crônico com candesartana, nos grupos controle, tratados com L-NAME e DOCA-sal.....	38
Figura 10 -	Tratamento crônico com candesartana, nos grupos controle e com diabetes induzida por STZ.....	38
Figura 11 -	Monitoramento da pressão arterial média.....	41
Figura 12-	Exposição do gânglio pélvico maior.....	41
Figura 13 -	Exposição do corpo cavernoso.....	42
Figura 14 -	Pletismografia caudal.....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	PAS de ratos controle, tratados com candesartana e tratados com enalapril.....	47
Gráfico 2 -	PAS de ratos controles, tratados com L-NAME e L-NAME + candesartana.....	48
Gráfico 3 -	PAS de ratos controles, tratados com L-NAME e L-NAME + enalapril.....	49
Gráfico 4 -	Nº de ereções de ratos controle, tratados com candesartana e tratados com enalapril.....	50
Gráfico 5 -	Nº de ereções de ratos controle, tratados com L-NAME, L-NAME + candesartana e L-NAME + enalapril.....	51
Gráfico 6 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle, tratados com candesartana e tratados com enalapril.....	52
Gráfico 7 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle, tratados com L-NAME e tratados com L-NAME + candesartana.....	53
Gráfico 8 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle, tratados com L-NAME e tratados com L-NAME + enalapril.....	54
Gráfico 9 -	PAS de ratos controle, tratados com captopril e tratados com candesartana.....	55
Gráfico 10 -	PAS de ratos controle DOCA-sal e ratos sham.....	55
Gráfico 11 -	PAS de ratos controle DOCA-sal, DOCA-sal tratados com captopril e DOCA-sal tratados com candesartana.....	56

Gráfico 12 -	N° de ereções de ratos controle e tratados com captopril.....	57
Gráfico 13 -	N° de ereções de ratos sham, controle DOCA-sal, DOCA-sal tratados com captopril e DOCA-sal tratados com candesartana.....	58
Gráfico 14 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle, tratados com captopril e tratados com candesartana.....	59
Gráfico 15 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle DOCA-sal e sham....	60
Gráfico 16 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controle DOCA-sal, DOCA-sal tratados com captopril e DOCA-sal tratados com candesartana.	61
Gráfico 17 -	PAS de ratos controle e tratados com estreptozotocina, acompanhados durante 4 e 8 semanas.....	62
Gráfico 18 -	N° de ereções de ratos controles e tratados com estreptozotocina, acompanhados durante 4 e 8 semanas.....	63
Gráfico 19 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controles e tratados com estreptozotocina, acompanhados durante 4 e 8 semanas.....	65
Gráfico 20 -	PÁS de ratos controles, tratados com captopril e tratados com candesartana.....	66
Gráfico 21 -	N° de ereções de ratos controles, tratados com captopril e tratados com candesartana.....	67
Gráfico 22 -	Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos controles, tratados com captopril e tratados com candesartana.....	68
Gráfico 23 -	PAS de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, diabéticos tratados com captopril e tratados com candesartana.....	69

Gráfico 24 - N° de ereções de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, diabéticos tratados com captopril e tratados com candesartana.....	70
Gráfico 25 - Índice de ereção (PIC/PAM) de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, diabéticos tratados com captopril e tratados com candesartana.....	71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1	Definição e epidemiologia da disfunção erétil.....	20
1.2	Anatomia peniana.....	21
1.3	Fisiologia da ereção peniana.....	23
1.4	Controle do tônus da musculatura lisa peniana.....	25
1.5	Sistema Renina-Angiotensina e disfunção erétil.....	26
1.6	Hipertensão e disfunção erétil.....	30
1.7	Diabetes e disfunção erétil.....	31
1.8	Farmacologia da disfunção erétil.....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	35
2.1	Objetivos específicos.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	Protocolo experimental.....	36
3.2	Animais.....	39
3.3	Modelos de estudo de ereção em ratos.....	39
3.3.1	Ereção induzida por apomorfina (ratos conscientes).....	40
3.3.2	Ereção induzida por estimulação ganglionar (ratos anestesiados).....	40
3.4	Monitoramento da pressão arterial.....	42
3.5	Monitoramento da glicemia.....	43
3.6	Tratamentos especiais.....	43
3.6.1	Hipertensão DOCA-sal.....	43
3.6.2	Hipertensão L-NAME.....	44
3.6.3	Diabetes induzida por estreptozotocina.....	45
3.6.4	Tratamento crônico com inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA).....	45
3.6.5	Tratamento crônico com bloqueador dos receptores de angiotensina (BRA).....	46
3.7	Análise estatística.....	46

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1	Grupo hipertenso L-NAME.....	47
4.2	Grupo hipertenso DOCA-sal.....	54
4.3	Grupo com diabetes induzida por estreptozotocina.....	61
<b>5</b>	<b>ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição e epidemiologia da disfunção erétil

Disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de se alcançar e/ou manter uma ereção peniana adequada para a satisfação sexual (NIH, 1993). É estimado que a DE afeta 152 milhões de homens em todo o mundo e a previsão é que, em 2025, haja 325 milhões de homens com disfunção erétil, um aumento de, aproximadamente, 170 milhões de casos (AYTAC e cols., 1999). De acordo com Moreira e cols. (2003), aproximadamente, 46% dos homens brasileiros relatam algum grau de DE, o que pode contribuir para uma diminuição da qualidade de vida em muitos casos.

A prevalência da disfunção erétil está fortemente relacionada com a idade. De acordo com um estudo realizado em Portugal por Teles e cols. (2008), em homens com idade entre 40-69 anos, a prevalência da DE é de 29%; entre 50-59, cerca de 50% e entre 60-69, atinge 74%.

Muitas classificações têm sido propostas para a DE. Algumas são baseadas na causa (diabetes, iatrogênica, traumática) e outras no mecanismo neurovascular do processo de ereção (neurogênica, arterial, venosa) (DEAN e cols., 2005). A DE é primariamente de origem psicogênica, com uma prevalência de 90% entre os homens (MASTERS e cols., 1970). De acordo com a presença e gravidade da DE, ela pode ser classificada em ausente, leve, leve a moderada, moderada e grave (RHODEN e cols., 2002).

O desenvolvimento da DE é geralmente multifatorial com vários fatores de risco associados: idade (homens entre 50-90 anos têm 10 vezes mais chance de desenvolver DE), co-morbidades (diabetes, distúrbios cardiovasculares, arteriosclerose, problema renal crônico, falência hepática, doença de Peyronie, desordens endócrinas e neurológicas, hipertensão e desordens psiquiátricas), condições traumáticas (cirurgia vascular, urológica, pélvica e injúria da medula espinhal), estilo de vida / comportamento (abuso de álcool, drogas, anabolizantes,

cigarros e conflitos com a(o) parceira(o) sexual e medicações (anti-hipertensivos, anti-histamínicos, antidepressivos, tranquilizantes e antipsicóticos) (DAVIES e cols., 2008).

## **1.2 Anatomia peniana**

O pênis é constituído de três colunas cilíndricas de tecido erétil, que são mantidas unidas através de tecido fibroso e recobertas por pele. Os corpos cavernosos, posicionados dorsalmente, constituem a principal massa do corpo do pênis e formam o seu dorso e partes laterais. Na junção com a face uretral, eles determinam um sulco mediano largo, onde está situado o corpo esponjoso. Terminam como projeções cegas cobertas pela glândula do pênis (GRAY, 1998). O corpo esponjoso é menor que o corpo cavernoso. Ao passar através do corpo do pênis ele se estreita ligeiramente; porém, na sua extremidade subitamente se expande para formar a glândula do pênis. A túnica albugínea do corpo cavernoso é o invólucro fibroso denso que se localiza sobre a fáscia profunda. Suas fibras superficiais apresentam uma direção longitudinal e formam uma bainha que envolve ambos os corpos cavernosos. Suas fibras mais profundas estão dispostas circularmente em torno de cada corpo e se encontram no plano mediano para formar o septo do pênis. Próximo à raiz do pênis, o septo é espesso e completo. Já em direção a sua extremidade livre, ele se torna mais fino e apresenta algumas soluções de continuidade através das quais os corpos cavernosos se comunicam entre si. A túnica albugínea do corpo esponjoso é mais fina e mais elástica do que a bainha correspondente em torno do corpo cavernoso. O interior do corpo cavernoso e esponjoso está dividido em numerosos espaços cavernosos através de muitas trabéculas. Essas trabéculas correm em todas as direções através do tecido erétil. Elas consistem de fibras elásticas, colágenas e musculares lisas, dando sustentação aos nervos, sinusóides e artérias helicinais. O corpo cavernoso inteiro é um conglomerado de sinusóides, maior no centro e menor na periferia. No estado flácido, o sangue difunde lentamente dos sinusóides centrais para os periféricos. No corpo esponjoso e na glândula, a estrutura é similar, exceto que os sinusóides são maiores em diâmetro e a túnica é mais fina no esponjoso e ausente na glândula (Fig.1).

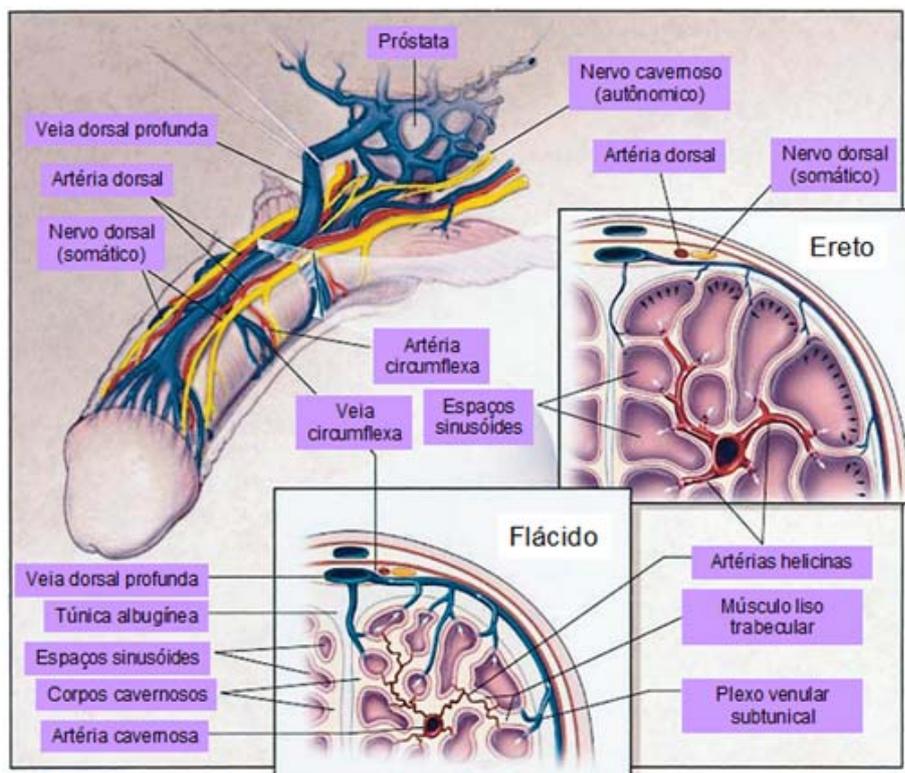
O principal suprimento arterial do tecido peniano é feito através das artérias pudendas internas, que se ramificam em artéria dorsal, bulbouretral e cavernosa. A artéria cavernosa entra nos corpos cavernosos e irriga a maior parte do tecido erétil. Ao longo de seu curso, ela fornece vários ramos (artérias helicinas) que vão suprir o tecido trabecular erétil e os sinusóides (GRAY, 1998). Estas artérias helicinas estão contraídas e tortuosas no estado flácido e tornam-se dilatadas e estiradas durante a ereção. A artéria dorsal do pênis corre inferiormente à fáscia profunda, sobre o dorso do pênis, entre o nervo dorsal, na sua face lateral e a veia profunda, na sua face medial. Seus ramos auxiliam a irrigação do tecido erétil do corpo cavernoso e do corpo esponjoso, e anastomosam-se com ramos da artéria profunda do pênis e artéria do bulbo. A artéria dorsal fornece a maior parte da irrigação da glândula (Fig.1).

A drenagem venosa origina-se em pequenas vênulas nos espaços sinusoidais periféricos, abaixo da túnica albugínea (Fig.1). Essas vênulas viajam nas trabéculas entre a túnica e os sinusóides e vão formar o plexo venular subtúnico, antes de sair como veias emissárias. A maioria dessas veias sai dorsalmente para penetrar profundamente na veia dorsal ou lateralmente na veia circunflexa; algumas emergem ventralmente e penetram na veia periuretral. Como a glândula do pênis não é coberta pela túnica, os sinusóides da glândula desembocam diretamente em veias que formam o plexo retrocoronal. Ao longo desse curso, a veia dorsal do pênis recebe muitas veias circunflexas; juntas, essas eventualmente ascendem atrás do osso púbico para tornar-se o plexo periprostático.

A glândula do pênis é a porção terminal em forma de cone, que é formada pela ampliação do corpo esponjoso. A abertura da uretra na extremidade da glândula do pênis é chamada óstio externo da uretra. A coroa da glândula é a proeminente saliência posterior da glândula do pênis. Na face inferior da glândula, uma prega vertical de tecido chamada frênulo do prepúcio prende a pele que cobre o pênis na glândula.

Na pele que cobre o pênis faltam pêlos e células adiposas, e é geralmente mais pigmentada que o resto da pele do corpo. A pele do corpo do pênis está frouxamente ligada e continua sobre a glândula do pênis como uma bainha retrátil protetora chamada prepúcio.

O pênis tem muitos receptores táteis sensíveis, especialmente na glândula, tornando-o um órgão altamente sensível. Além disso, apresenta uma extensa inervação motora simpática e parassimpática (VAN DE GRAAFF, 2003).



**FIGURA 1** – Anatomia e hemodinâmica peniana.  
Fonte: adaptado de KANDEEL e cols., 2001, p. 343.

### 1.3 Fisiologia da ereção peniana

O estado erétil do pênis depende da regulação do tônus da musculatura lisa nas paredes das arteríolas cavernosais e trabécula dos sinusóides cavernosais. A dilatação dos vasos sanguíneos do pênis resulta num aumento do fluxo sanguíneo, levando à ereção. Um dos mais importantes mediadores da ereção é o óxido nítrico (NO), o qual é sintetizado e liberado nos nervos terminais parassimpáticos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) e pelas células endoteliais dos vasos e sinusóides. O NO age nas células musculares lisas para induzir o relaxamento. As células endoteliais, conseqüentemente, desempenham um papel crítico na fisiologia e patologia da ereção, o que tem levado diversos grupos a investigar marcadores bioquímicos de danos celulares da DE. Entretanto, a estreita correlação da DE e

função endotelial levam muitos investigadores a dizer a frase: “DE2: disfunção erétil = disfunção endotelial” (GUAY, 2007; DAVIES e cols., 2008).

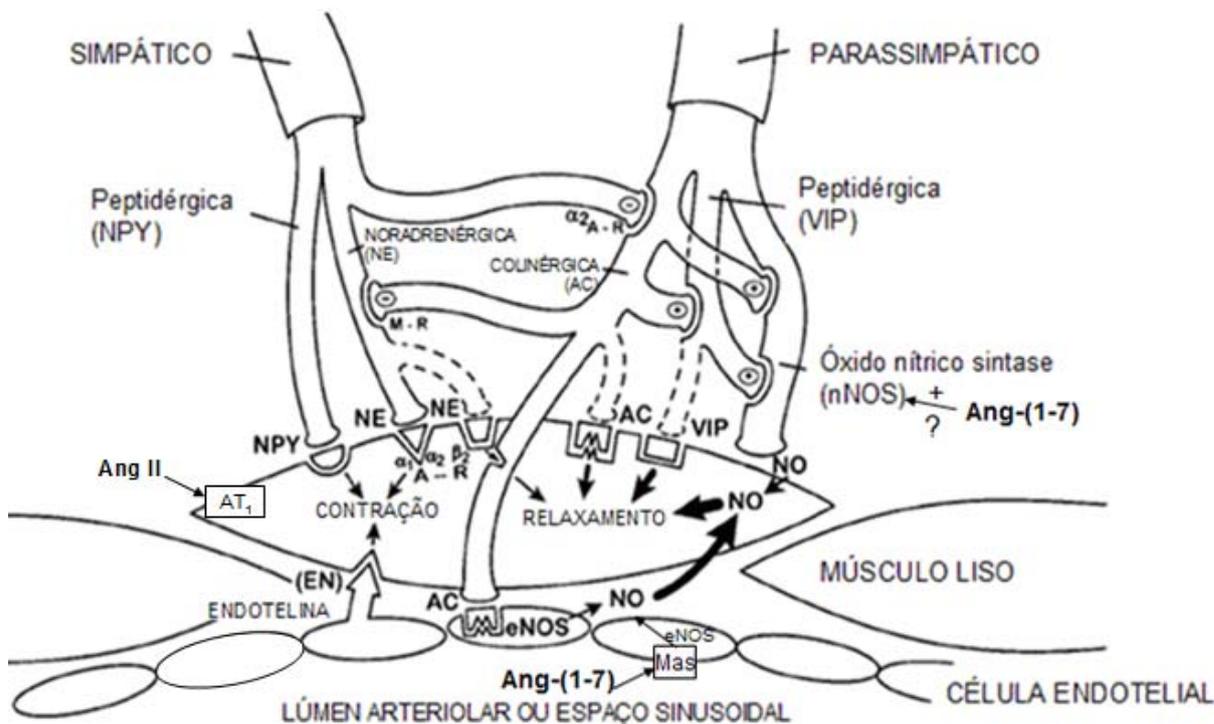
A contração e o relaxamento da musculatura lisa são regulados pelo Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico (sarcoplasmático) livre. A norepinefrina dos nervos terminais, endotelinas e prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  provenientes do endotélio atuam sobre as células musculares lisas aumentando o trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e o diacilglicerol (DAG), resultando na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques (retículo sarcoplasmático) ou abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nas membranas das células musculares lisas, levando a um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dos espaços extracelulares. Em altas concentrações, o  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à calmodulina, alterando sua conformação e expondo sítios de ligação para a interação com a quinase da miosina de cadeia leve. Esta ativação resultante catalisa a fosforilação da miosina de cadeia leve e provoca o cruzamento ao longo dos filamentos de actina e desenvolvimento de força. Esta fosforilação também ativa a miosina ATPase, que hidrolisa ATP promovendo energia para a contração muscular. Outro mecanismo de ativação da contração é através da excitação dos receptores acoplados à proteína G. Esta via envolve RhoA, uma pequena e monomérica proteína G que ativa a Rho-quinase. Esta enzima ativada inibe a subunidade regulatória da miosina fosfatase e previne a defosforilação dos miofilamentos, mantendo o tônus contrátil. Já o relaxamento da musculatura é seguido por um decréscimo do  $\text{Ca}^{2+}$  livre no sarcoplasma. A calmodulina dissocia-se da quinase da miosina de cadeia leve e a inativa. Quando a miosina é defosforilada pela fosfatase da miosina de cadeia leve ela é desatada do filamento de actina e o músculo relaxa. A via do NO-GMPc no músculo liso do corpo cavernoso também contribui com o relaxamento através da reversão do mecanismo excitatório de transdução de sinal. O AMPc e GMPc são segundos mensageiros envolvidos no relaxamento da musculatura lisa. Eles ativam as proteínas quinases dependentes de AMPc e GMPc que alteram certas proteínas e canais iônicos por fosforilação, resultando na abertura de canais de potássio e hiperpolarização, seqüestro de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático e inibição dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes, bloqueando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A consequência é uma queda de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico livre e o relaxamento do músculo liso vascular e cavernosal, com consequente ereção peniana (DEAN e cols., 2005).

#### 1.4 Controle do tônus da musculatura lisa peniana

As fibras parassimpáticas inervam diretamente a musculatura lisa cavernosal e as células endoteliais sinusoidais. A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor parassimpático que, através da ativação de receptores colinérgicos presentes nas células endoteliais, ativa a produção de NO, a partir da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), via fosfolipase C, pela produção de IP<sub>3</sub>, com consequente aumento da produção de Ca<sup>2+</sup>, o qual ativa a eNOS. A inervação parassimpática das células musculares, por outro lado, é mediada por ativação da guanilato ciclase, que forma o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e este ativa a proteína quinase e reduz os níveis de Ca<sup>2+</sup>, o que leva a uma separação dos filamentos de actina-miosina, levando ao relaxamento muscular. O NO produzido localmente na célula muscular ou proveniente da difusão das células endoteliais adjacentes, é o principal mediador do relaxamento, via estímulo da produção de GMPc. Ainda, o peptídeo vasointestinal (VIP), produzido pelas fibras parassimpáticas não colinérgicas, também chamadas peptidérgicas, desempenha um menor papel na estimulação direta do relaxamento da musculatura lisa cavernosal (via NO-GMPc) (Fig. 2). Além deste peptídeo, outras substâncias também foram relacionadas como capazes de estimular o relaxamento da musculatura lisa e, conseqüentemente, aumentarem a resposta erétil: bradicinina, peptídeo metionina histidina, polipeptídeo pituitário ativado pela adenilato ciclase, helospectina, galanina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, prostaglandina E-1 e Angiotensina-(1-7). (KANDEEL e cols., 2001; YOUSIF e cols., 2007).

A inervação simpática das células musculares lisas envolve a produção de norepinefrina (NE) e não-adrenérgicas, o neuropeptídeo Y (NPY). A ativação dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos, em conjunto com as ações do NPY e endotelina-1, é responsável pela contração das células musculares lisas. Outros neurotransmissores são capazes de promover a contração da musculatura lisa e, conseqüentemente, a detumescência peniana: endotelina-1, substância P, prostaglandina F-2 $\alpha$ , tromboxana A-2, Angiotensina II e cálcio (DE TEJADA e cols., 1988). Existe uma relação cruzada entre as duas divisões da inervação autonômica,

via receptor  $\alpha_2$  adrenérgico e M2 muscarínico, o que auxilia na inibição de cada divisão quando o outro está ativado (KANDEEL e cols., 2001) (Fig. 2).



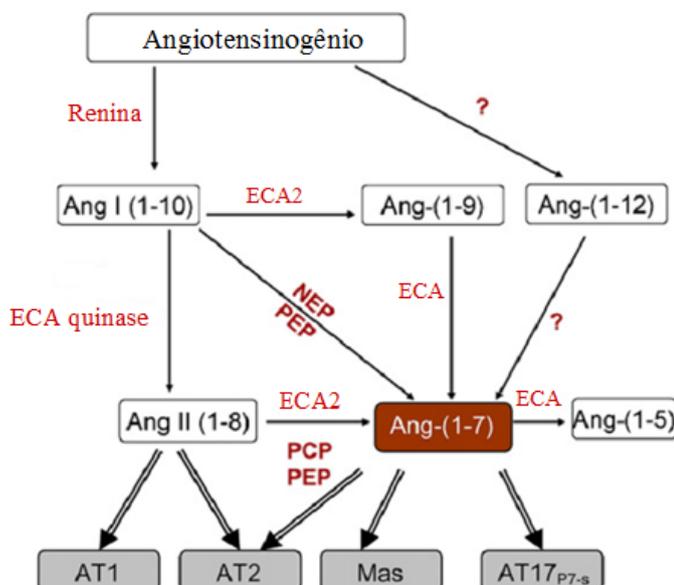
**FIGURA 2** – Controle da função muscular peniana. Inervação simpática e parassimpática. As setas pontilhadas representam relativa importância da inervação ou neurotransmissão, + representa estímulo e – inibição ou efeito negativo. NPY = neuropeptídeo Y, NE = norepinefrina, A-R = receptor adrenérgico, VIP = peptídeo intestinal vasoativo, M-R = receptor muscarínico, AC = acetilcolina, NO = óxido nítrico, nNOS = óxido nítrico sintase neuronal, eNOS = óxido nítrico sintase endotelial, Ang-(1-7) = Angiotensina-(1-7), EN = endotelina, Ang II = Angiotensina II.

Fonte: adaptado de KANDEEL e cols., 2001, p. 345.

### 1.5 O Sistema Renina-Angiotensina e a disfunção erétil

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) desempenha um papel crítico no sistema cardiovascular. Recentes estudos têm encontrado vários componentes com ações fisiológicas neste sistema e têm proposto novas vias de sinalização. Num sistema clássico, a Angiotensina II (ANG II) produzida a partir da Angiotensina I (ANG I) pela enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma forte substância bioativa. ANG II liga-se a dois tipos de receptores chamados receptores para ANG II do tipo 1 ( $AT_1$ ) e do tipo 2 ( $AT_2$ ). Em distúrbios cardiovasculares, a estimulação do receptor  $AT_2$  parece antagonizar o sinal associado com a estimulação do receptor  $AT_1$  (IWAI e cols., 2009).

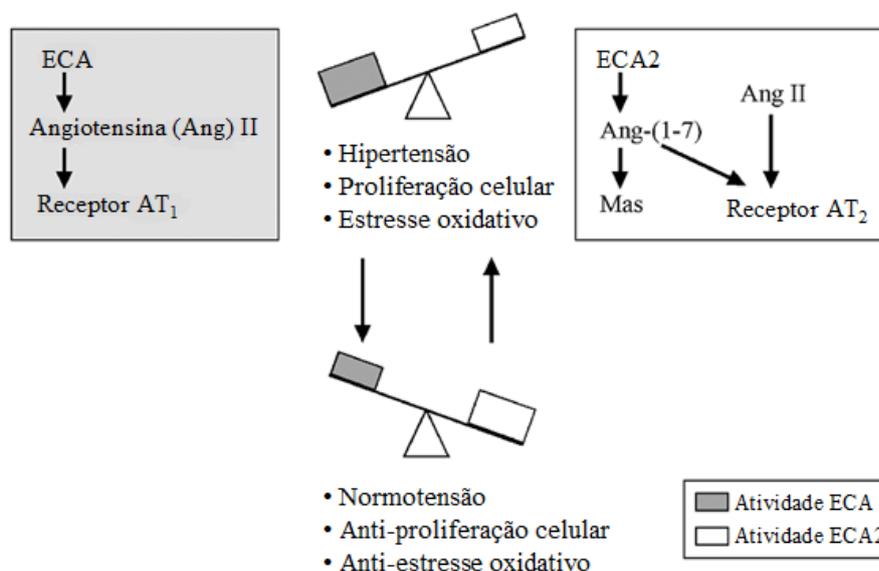
Recentemente, um novo eixo do SRA tem sido estabelecido. Neste eixo, ANG I é finalmente convertida em Angiotensina-(1-7) [ANG-(1-7)] pela atividade catalítica da isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina (ECA2) (SANTOS e cols., 2008). Os mecanismos de ação da ANG-(1-7) ainda estão sendo investigados por muitos grupos de pesquisa. Dentre as recentes descobertas, está o receptor Mas acoplado à proteína G, o qual é um receptor para a ANG-(1-7) (SANTOS e cols., 2003). Além da ECA2, outras enzimas também estão envolvidas na formação da ANG-(1-7), incluindo a prolil-endopeptidase (PEP), neutral-endopeptidase (NEP) e prolil-carboxipeptidase (PCP) (IUSUF e cols., 2008) (Fig. 3).



**FIGURA 3** – Vias de formação da Ang II e Ang-(1-7). Os retângulos em cinza indicam os receptores que medeiam os efeitos agonistas (setas duplas) dos peptídeos. As setas simples representam as conversões metabólicas. A sequência de aminoácidos relativa a cada peptídeo é dada em parênteses. ECA: enzima conversora da angiotensina; Ang: angiotensina; AT<sub>1</sub>: receptor tipo 1 da Ang II; AT<sub>2</sub>: receptor tipo 2 da Ang II; Mas: receptor acoplado à proteína G, codificado como Mas proto-oncogene, o qual medeia os efeitos da Ang-(1-7); AT17<sub>P7-s</sub>: receptor da Ang-(1-7) que é inibido pela pro-Angiotensina-(1-7); PCP: prolil-carboxipeptidase; PEP: prolil-endopeptidase; NEP: neutral-endopeptidase. Fonte: adaptado de IUSUF e cols., 2008, p. 305.

O papel biológico e a relevância da ANG-(1-7) foi descartada por muitos investigadores, acreditando ser esta angiotensina somente um produto da degradação da ANG II e um dos mecanismos de inativação da ANG II. No entanto, recentes estudos indicam que a ANG-(1-7) apresenta papéis ativos no SRA. ANG-(1-7) causa vasodilatação, que antagoniza a vasoconstrição mediada pelo estímulo do receptor AT<sub>1</sub>. Este efeito parece envolver a via bradicinina-NO. Estes resultados

sugerem que a ANG-(1-7) antagoniza o efeito pressor da estimulação do receptor  $AT_1$ , podendo agir como um antagonista do receptor  $AT_1$ , resultando numa queda da pressão sanguínea e um efeito órgão protetor, como a redução do efeito hipertrófico cardíaco e fibrose e dano renal (IWAI e cols., 2009). Dessa forma, podemos dizer que o SRA apresenta dois eixos contra-regulatórios: o eixo ECA/ANG II/receptor  $AT_1$ , vasoconstritor/proliferativo e o eixo ECA2/ANG-(1-7)/receptor Mas, vasodilatador/anti-proliferativo (Fig. 4).



**FIGURA 4** – Balanço entre as atividades da ECA e ECA2.  
Fonte: adaptado de IWAI e cols., 2009, p. 535.

De acordo com o conceito atual, o SRA regula a ereção peniana através da manutenção do tônus cavernosal e promoção de detumescência peniana via ação da ANG II em receptores  $AT_1$  (BECKER e cols., 2001). No entanto, outros peptídeos do SRA, incluindo o vasodilatador ANG-(1-7), são liberados nos corpos cavernosos (KIFOR e cols., 1997). A hipótese é que ANG-(1-7), gerada via ECA2, interage com o receptor Mas e provavelmente com o receptor  $AT_2$  para induzir de forma direta ou indireta (envolvendo a ativação de receptores de bradicinina do tipo 2,  $B_2$ ) a liberação de NO que levaria à vasodilatação (aumento do fluxo sanguíneo cavernosal) e relaxamento da musculatura lisa cavernosal, com conseqüente ereção peniana.

Baseado nestas observações, um caminho para a terapêutica de distúrbios cardiovasculares seria aquele onde houvesse um aumento ou estimulação do eixo

ECA2/ANG-(1-7)/receptor Mas. Isso nos remete a drogas correntemente utilizadas como os inibidores da ECA (iECA), bem como os bloqueadores do receptor  $AT_1$  (BRA), onde estes fármacos promoveriam a supressão do eixo ECA/ANG II/ $AT_1$ , levando a um aumento significativo da expressão de ECA2, com consequente aumento nos níveis de ANG-(1-7) (SANTOS e cols., 2008).

A contribuição da ANG-(1-7) para o efeito cardiovascular desses fármacos acima citados foi sugerida a partir da observação de que o bloqueio agudo da formação ou ação da ANG-(1-7) reverte o efeito hipotensor da losartana em ratos hipertensos (NAKAMURA e cols., 2003). Além disso, a infusão de A-779 (antagonista de receptores Mas) reverte a ação antitrombótica do captopril e da losartana (KUCHAREWICZ e cols., 2002), e atenua a atividade potencializadora da bradicinina induzida por inibidores da ECA em ratos (MAIA e cols., 2004). A presença da ANG II está associada com a detumescência peniana (BECKER e cols., 2001), e os fármacos que reduzem a formação ou a ação da Ang II, tais como os inibidores da ECA (iECA) ou antagonistas de receptores  $AT_1$  (BRA) mostram evidências de melhoria na função erétil (DORRANCE e cols., 2002; LLISTERRI e cols., 2001). O uso de enalapril, mas não o de hidralazina (vasodilatador direto), induz remodelamento estrutural da vasculatura peniana e melhora o fluxo sanguíneo para o corpo cavernoso em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (HALE e cols., 2001). O tratamento com captopril melhora a função erétil em ratos espontaneamente hipertensos com tendência a acidente vascular cerebral (SHRSP), medido como mudanças na razão da pressão intracavernosa/pressão arterial média (PIC/PAM) (DORRANCE e cols., 2002). Essa melhora pode estar associada ao fato de que inibição da ECA causa aumento nos níveis plasmáticos e teciduais de ANG-(1-7) como mencionado acima (IYER e cols., 1998). O aumento na latência para o início do comportamento copulatório e para ejaculação induzido por infusão intracerebroventricular de ANG II foi bloqueado por um antagonista de receptor  $AT_1$  (KEATON e cols., 1998). Esses achados sugerem o efeito benéfico do bloqueio do SRA sobre a função erétil, que pode ser mediado pela ANG-(1-7). A manipulação da via de formação da ANG-(1-7) parece apresentar um potencial para o desenvolvimento de regimes terapêuticos para tratamento de doenças cardiovasculares tais como hipertensão, diabetes e DE associada à hipertensão e

diabetes, devido à habilidade da ANG-(1-7) em induzir a liberação de NO e prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina), assim como sua habilidade de modular as ações da ANG II.

O papel da ANG-(1-7) como modulador do estresse oxidativo induzido por ANG II é outro ponto importante a ser considerado. Já foi demonstrado que a liberação de NO endotelial induzida por ANG-(1-7) é acompanhada de uma redução na produção de íons superóxido, que pode proteger o endotélio (HEITSCH e cols., 2001). No entanto, a contribuição da ANG-(1-7) como agente anti-oxidante e/ou anti-inflamatório, que se opõe à sinalização da ANG II no tecido cavernoso, ainda não é bem esclarecida. Recentemente, Yousif e cols. mostraram que ANG-(1-7) causa relaxamento de tiras de corpo cavernoso de coelho. Tal relaxamento foi bloqueado por inibidor da NOS (L-NAME) e se apresentava reduzido em tecido cavernoso de coelhos idosos ou diabéticos (YOUSIF *et al.*, 2007). Os resultados obtidos com um mimético da ANG-(1-7), o agonista não peptídico AVE-0991 (PINHEIRO e cols., 2004; WIEMER e cols., 2002), fazem com que esse agonista dos receptores Mas se apresente como uma ferramenta bastante promissora para o tratamento da DE.

### **1.6 Hipertensão e disfunção erétil**

A hipertensão arterial afeta mais de 25% da população adulta ocidental e é geralmente considerada um problema de saúde pública (KEARNEY e cols., 2005), podendo ainda levar ao desenvolvimento de uma morbidade cardiovascular e mortalidade (MANCIA e cols., 2007).

Os danos vasculares estruturais e funcionais causados pela hipertensão contribuem para o desenvolvimento da DE. Dos pacientes com hipertensão, cerca de 30% apresentam DE, sendo que sua severidade está diretamente relacionada à severidade da hipertensão instalada (BURCHARDT e cols., 2000). Ainda, em alguns pacientes hipertensos, é observada uma desregulação do SRA, onde a ANG II desempenha um papel principal na indução da disfunção endotelial. Segundo Becker e cols. (2001), os níveis sanguíneos de ANG II na circulação cavernosa em homens com DE organogênica estão muito mais elevados quando comparados com homens que apresentam DE psicogênica ou em indivíduos saudáveis. Em animais

hipertensos, o fato de a inibição da ECA e o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> melhorarem a função erétil demonstra os efeitos patológicos da ANG II (JIN, 2009).

Por ser a pressão sanguínea a principal causadora do processo aterosclerótico e, dessa forma, os tecidos genitais vasculares e perivasculares exibirem profundo dano com o aumento da pressão sanguínea, não é surpresa que uma hipertensão essencial esteja relacionada com a DE (MANOLIS e cols., 2008) e, frequentemente, seja utilizada como um marcador dessa doença (FELDMAN e cols., 1994).

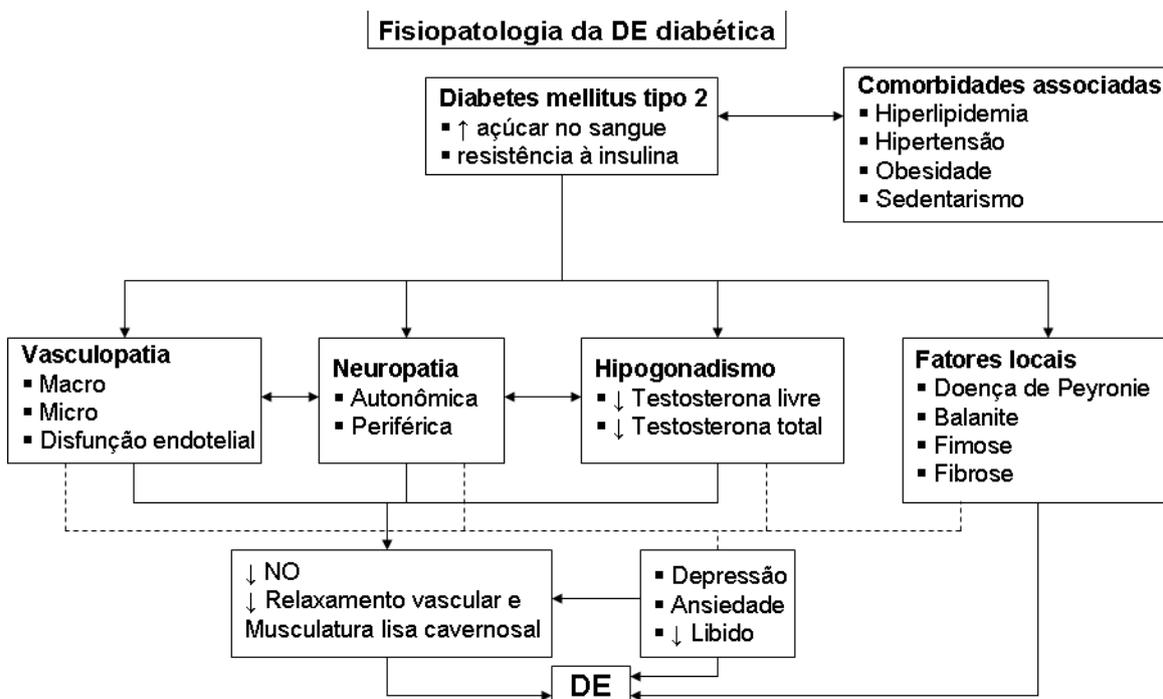
### **1.7 Diabetes e disfunção erétil**

Diabetes mellitus é uma doença caracterizada por hiperglicemia que, se não tratada, pode levar a complicações vasculares e neurológicas as quais são responsáveis pelo desenvolvimento da disfunção erétil em pacientes diabéticos (TRONCHINI e cols., 2010).

Apesar da incidência da DE ser de 52% na população entre 40 e 70 anos de idade, homens com diabetes mellitus apresentam impotência mais precocemente e com alta prevalência, chegando a ser superior a 75% (HAKIM e cols., 1996). Comparando-se homens diabéticos e não-diabéticos, observou-se uma ocorrência da DE cerca de dez a quinze anos antes nos diabéticos (FELDMAN e cols., 1994), uma menor responsividade ao tratamento oral (GOLDSTEIN e cols., 1998) e uma maior associação a outras comorbidades tais como hipertensão, hiperlipidemia e síndrome metabólica (MALAVIGE e cols., 2009).

A etiologia da DE no diabetes é considerada multifatorial. Uma função erétil normal é produto de um complexo processo envolvendo fatores biológicos e psicológicos. A ereção resulta de impulsos nervosos que produzem relaxamento da musculatura lisa cavernosal e vascular, levando ao aumento do influxo arterial nos corpos cavernosos. Este efeito é predominantemente mediado pelo NO, que é produzido via ativação parassimpática, NANC e neurônios colinérgicos que estimulam as células endoteliais, provocando uma cascata de reações moleculares que resulta no relaxamento das células musculares lisas e vasodilatação. O aumento do fluxo

sanguíneo impede o efluxo venoso através da compressão das veias subtunicais, mantendo a ereção. Mudanças fisiopatológicas associadas ao diabetes tais como vasculopatia, neuropatia, hipogonadismo e fatores locais podem estar associados ao desenvolvimento da DE (Fig. 5) (MALAVIGE e cols., 2009).



**FIGURA 5** – Fisiopatologia da DE na diabetes. ↓ indica redução; ← indica causa unidirecional; ↔ indica causa bidirecional; DE = disfunção erétil; NO = óxido nítrico.  
Fonte: adaptado de MALAVIGE e cols., 2009, p. 1235.

## 1.8 Farmacologia da disfunção erétil

A terapia para a disfunção erétil inclui a modificação dos fatores de risco associados, seguida de aconselhamento e, se necessário, medicação. As intervenções para as modificações no estilo de vida tais como dieta controlada, perda de peso, cessação de fumo, consumo moderado de álcool e aumento da prática de atividade física têm se mostrado benéficas para os homens que apresentam DE, visto que promovem uma melhora na função endotelial (JACKSON, 2007).

A farmacoterapia inicial para o tratamento da disfunção erétil envolve a utilização dos agentes da classe dos inibidores da fosfodiesterase 5 (iPDE5), como sildenafil (Viagra®), tadalafila (Cialis®), vardenafila (Levitra®) e lodenafila (Helleva®). O mecanismo de ação destes agentes relaciona-se com a inibição da PDE5, que leva

ao aumento os níveis de GMPc, levando a um relaxamento da musculatura lisa do tecido peniano, permitindo uma ereção peniana de melhor qualidade e mais duradoura. Esses agentes apresentam uma eficácia clínica de aproximadamente 60 a 70 %, havendo uma redução em pacientes que apresentam distúrbios neurológicos ou vasculares mais severos. As contra-indicações incluem o uso concomitante com nitratos,  $\alpha$ -bloqueadores, história de retinite pigmentosa e condições que predisõem ao priapismo, como leucemia ou mieloma múltiplo (HATZIMOURATIDIS e cols., 2008).

Ainda na terapia oral, outros agentes, hoje praticamente em desuso, foram utilizados no tratamento da DE tais como a fentolamina, ioimbina e apomorfina. A fentolamina é um antagonista não-seletivo  $\alpha$ -adrenérgico e seu mecanismo de ação está relacionado com a diminuição da função contrátil da musculatura lisa do corpo cavernoso, com conseqüente facilitação da ereção. De forma semelhante, a ioimbina, um antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, age na melhora da resposta erétil. A apomorfina, um agonista dos receptores centrais de dopamina (D1 e D2), promove a ativação das vias ocitocinérgicas, levando a um aumento da libido, o que implica diretamente no aumento do desejo sexual, bem como na facilitação do orgasmo. Os efeitos colaterais mais comuns associados ao uso da apomorfina são o aparecimento de náuseas e vômitos, o que leva à intolerância pelos pacientes (BIVALACQUA e cols., 2000).

A segunda linha de tratamento da DE envolve os agentes vasoativos administrados localmente, através de injeção intracavernosa ou aplicação transuretral tais como alprostadil e papaverina. O alprostadil é um análogo sintético da prostaglandina  $E_1$  ( $PGE_1$ ) e é a terapia mais eficaz para administração intracavernosa. Seu mecanismo de ação relaciona-se com um aumento intracelular nos níveis de AMPc, resultando no relaxamento da musculatura lisa cavernosal e ereção peniana. Os principais efeitos adversos relatados pela administração local são dor, hipotensão, priapismo e fibrose local no pênis. A papaverina é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase e atua prevenindo a quebra de ambos os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc, levando ao aumento do relaxamento da musculatura lisa e promovendo ereção peniana.

Outras alternativas para o tratamento da DE incluem a utilização de bomba de vácuo, que atua de forma a facilitar o enchimento de sangue dos corpos cavernosos, facilitando a ereção, e os implantes penianos, realizados cirurgicamente, mas que são adotados em último recurso para facilitação da ereção peniana.

## **2 OBJETIVO**

Determinar se a manipulação farmacológica do eixo “ECA2/ANG-(1-7)/receptor Mas” melhora a função erétil de ratos hipertensos e diabéticos.

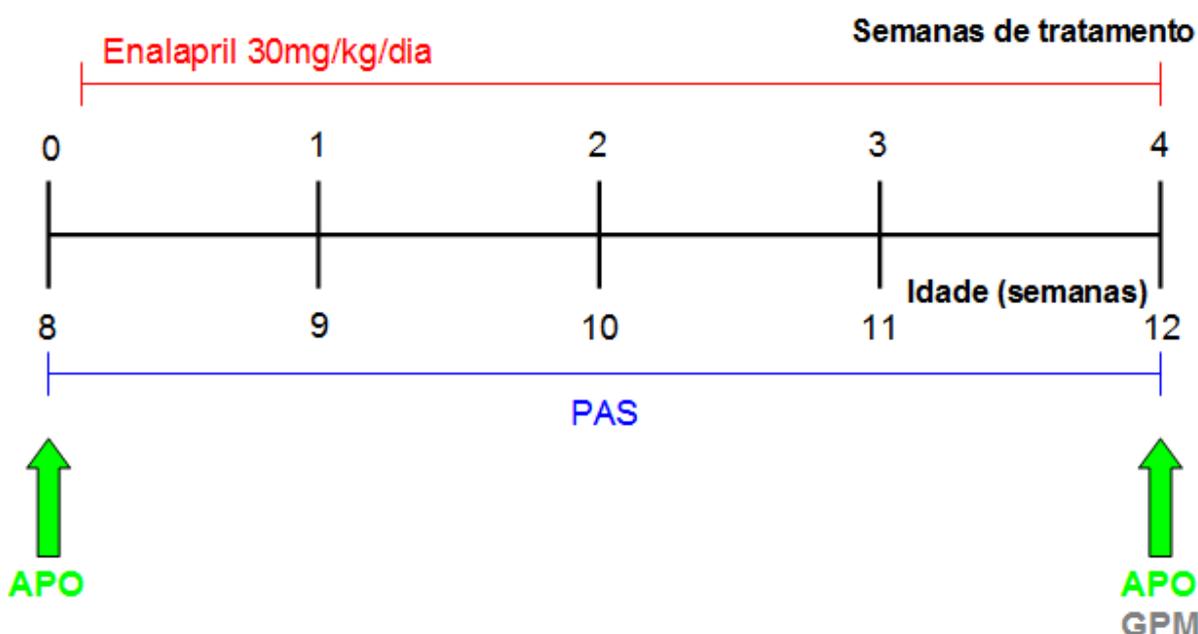
### **2.1 Objetivos específicos:**

- Avaliar se o tratamento crônico com inibidor da ECA produz uma melhora na função erétil de ratos hipertensos e diabéticos.
- Avaliar se o tratamento crônico com antagonista de receptor AT1 produz uma melhora na função erétil de ratos hipertensos e diabéticos.

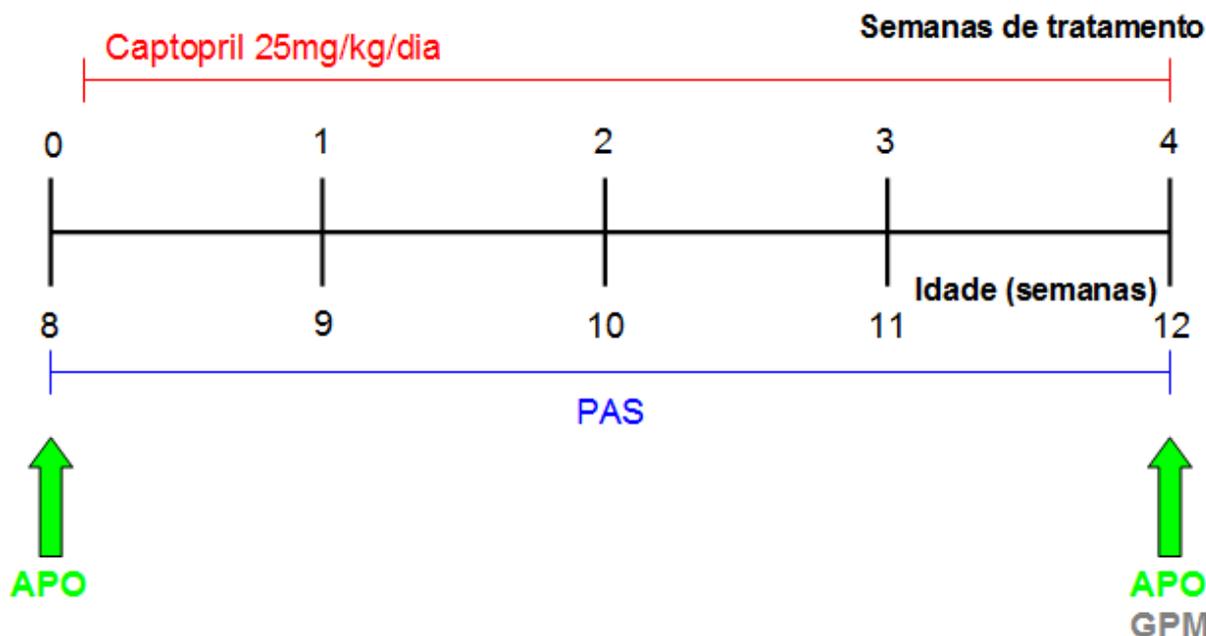
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Protocolo Experimental

Neste estudo, foi utilizada uma abordagem farmacológica para verificar se o tratamento crônico com inibidores da ECA (enalapril, captopril) e antagonista de receptor AT1 (candesartana) pode reverter ou prevenir a disfunção erétil observada em ratos hipertensos e ratos diabéticos. Os modelos de hipertensão (L-NAME, DOCA-sal) e diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) que sabidamente apresentam DE severa foram usados nesse estudo.

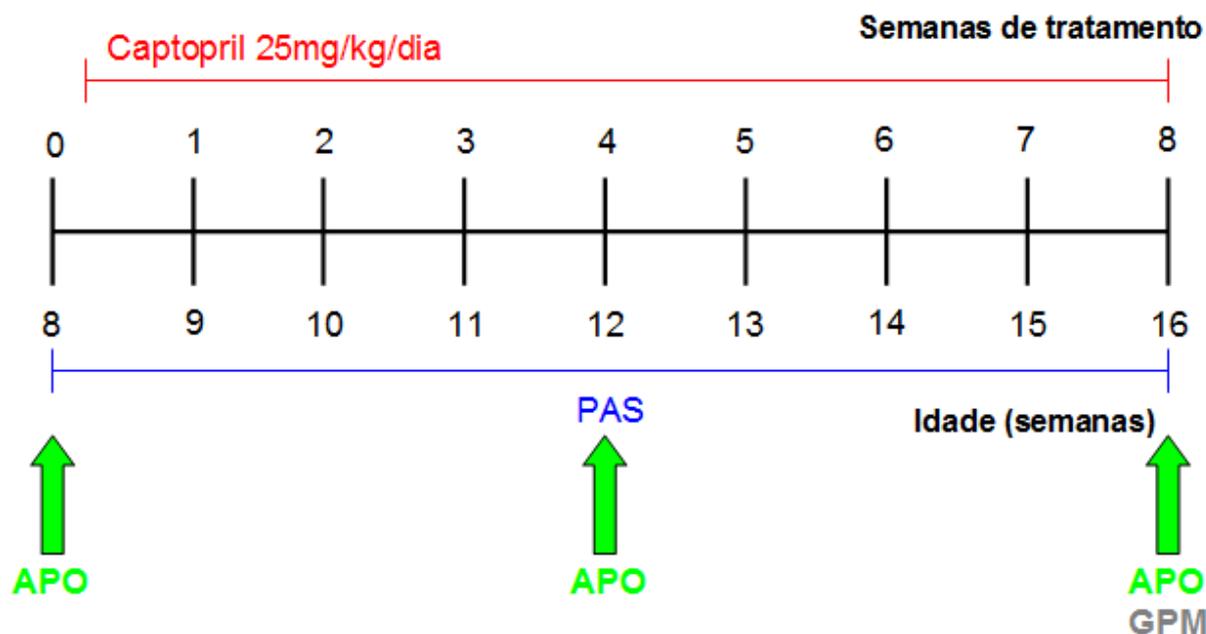


**Figura 6** – Tratamento crônico com enalapril, nos grupos controle e tratados com L-NAME. Legenda: APO = modelo de ereção induzida por apomorfina; PAS = pressão arterial sistólica, por pletismografia de cauda; GPM = modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar (gânglio pélvico maior).  
Fonte: protocolo desenhado pela autora



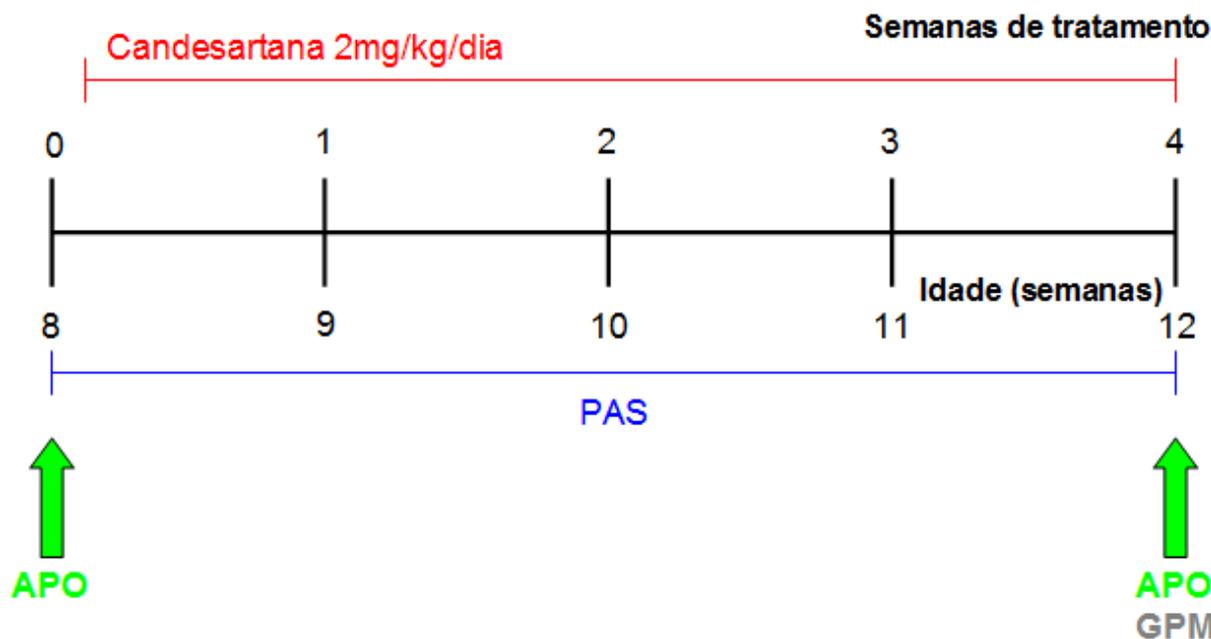
**Figura 7** – Tratamento crônico com captopril, nos grupos controle e tratados com DOCA-sal. Legenda: APO = modelo de ereção induzida por apomorfina; PAS = pressão arterial sistólica, por pletismografia de cauda; GPM = modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar (gânglio pélvico maior).

Fonte: protocolo desenhado pela autora



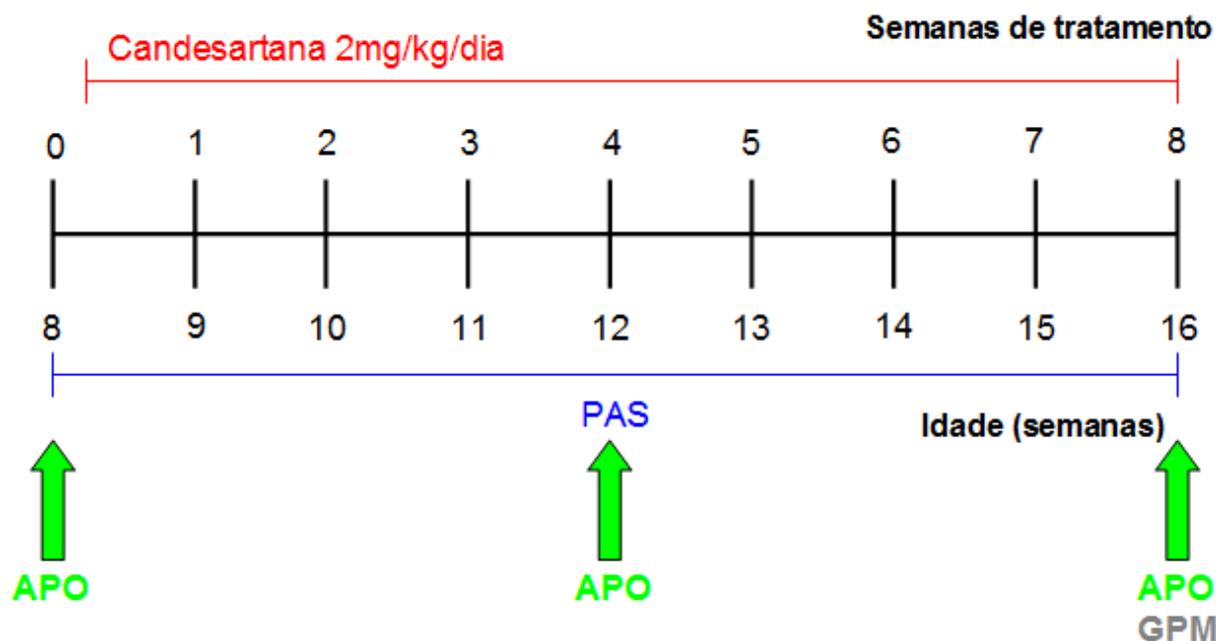
**Figura 8** – Tratamento crônico com captopril, nos grupos controle e com diabetes induzida por STZ. Legenda: APO = modelo de ereção induzida por apomorfina; PAS = pressão arterial sistólica, por pletismografia de cauda; GPM = modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar (gânglio pélvico maior).

Fonte: protocolo desenhado pela autora



**Figura 9** – Tratamento crônico com candesartana, nos grupos controle, tratados com L-NAME e DOCA-sal. Legenda: APO = modelo de ereção induzida por apomorfina; PAS = pressão arterial sistólica, por pletismografia de cauda; GPM = modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar (gânglio pélvico maior).

Fonte: protocolo desenhado pela autora



**Figura 10** – Tratamento crônico com candesartana, nos grupos controle e com diabetes induzida por STZ. Legenda: APO = modelo de ereção induzida por apomorfina; PAS = pressão arterial sistólica, por pletismografia de cauda; GPM = modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar (gânglio pélvico maior).

Fonte: protocolo desenhado pela autora

### **3.2 Animais**

Para os modelos de hipertensão (DOCA-sal e L-NAME) e diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) foram utilizados ratos Wistar machos com 08 semanas de idade e peso em torno de 200-220 g, provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (Protocolo n° 2010/53, CEUA/UFOP).

Os ratos permaneceram no Centro de Ciência Animal (CCA) em salas com temperatura controlada e ciclo de claro/escuro 12/12 horas com livre acesso à água e comida (exceto nos casos de tratamento pela água de beber). Todas as cirurgias de implantes, nefrectomia, e medida direta da pressão intracavernosa/pressão arterial foram feitas sob anestesia pela mistura de quetamina/xilasina (100/14 mg/kg, IM), seguindo as normas de esterilização e desinfecção. Ao final dos experimentos, os ratos foram sacrificados sob anestesia pelo CO<sub>2</sub>. Os animais tiveram sua pressão arterial sistólica monitorada semanalmente durante os tratamentos crônicos pelo método de pletismografia de cauda e, os ratos diabéticos, tiveram ainda monitoramento semanal da glicemia (glicemia capilar, glicosímetro Breeze 2<sup>®</sup>, Bayer).

### **3.3 Modelos de estudo de ereção em ratos**

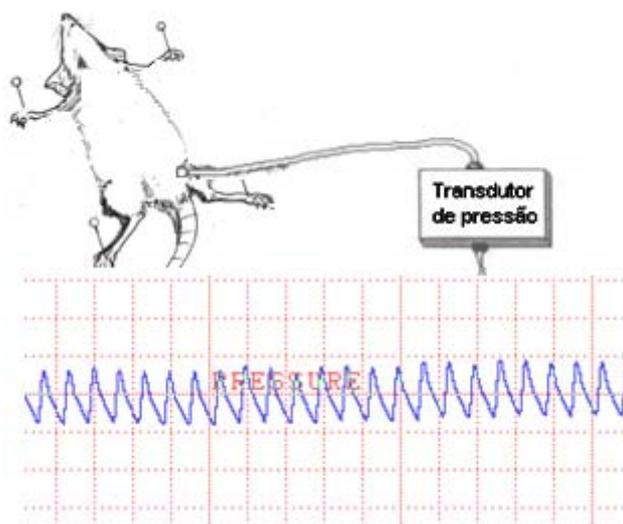
Os animais tiveram a função erétil monitorada nas semanas 0 e 4 (para os animais acompanhados por 4 semanas) ou 0, 4 e 8 (para os animais acompanhados por 8 semanas), através do modelo de estudo de ereção induzida por apomorfina (ratos conscientes), com início a partir da 8<sup>a</sup> semana de idade. Ao final de cada protocolo estudado (4 ou 8 semanas de tratamento), os mesmos foram submetidos ao estudo de ereção induzida por estimulação ganglionar (ratos anestesiados).

### **3.3.1 Ereção induzida por apomorfina (ratos conscientes)**

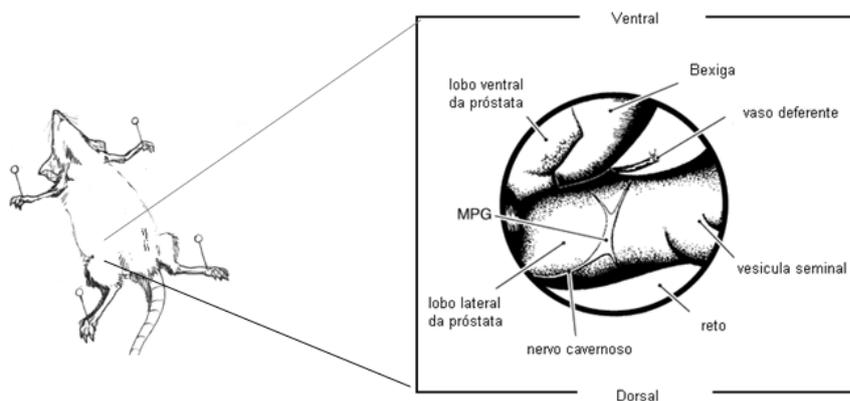
Os ratos acordados receberam uma injeção subcutânea (na região dorsal) de apomorfina (80 µg/kg) preparada em solução salina (0,9 g/100mL) contendo ácido ascórbico (100 µg/mL) num volume de 0,01 mL/100g. Em seguida, foram colocados individualmente em uma caixa de madeira, com a frente e o fundo de vidro transparente, onde foram filmados por 30 minutos com o auxílio de duas câmeras digitais colocadas em frente e embaixo da caixa. Esse procedimento foi realizado em uma sala silenciosa e com luminosidade semelhante àquela do biotério. Os animais receberam um treinamento (ambientação na caixa por 30 minutos sem filmagem) antes da aplicação de apomorfina e realização das filmagens. A partir dos filmes obtidos, o número de ereções foi contado. Uma ereção típica constitui o momento em que o rato apóia-se nas patas traseiras e curva-se em direção ao pênis, segurando e lambendo o membro por, aproximadamente, 15 segundos. Foram também observados os efeitos decorrentes da administração da apomorfina como bocejos, lambedura das patas dianteiras, apoio do corpo nas patas traseiras, com envergadura corporal. Os ratos controles receberam uma injeção subcutânea (na região dorsal) de veículo (solução salina 0,9 g/100mL) contendo ácido ascórbico (100 µg/mL) num volume de 0,01 mL/100g.

### **3.3.2 Ereção induzida por estimulação ganglionar (ratos anestesiados)**

Os ratos anestesiados pela mistura quetamina/xilasina tiveram a artéria femoral esquerda canulada por um tubo de polietileno PE-10 soldado a um polietileno PE-50, contendo salina heparinizada 50 UI/mL e conectado a um transdutor de pressão e um sistema de aquisição de dados para monitoramento contínuo da pressão arterial média (FIG. 11). Em seguida, foi realizada uma incisão mediana suprapubiana, na porção inferior direita da cavidade abdominal e exposição do gânglio pélvico maior (GPM) para posterior estimulação elétrica (FIG. 12).



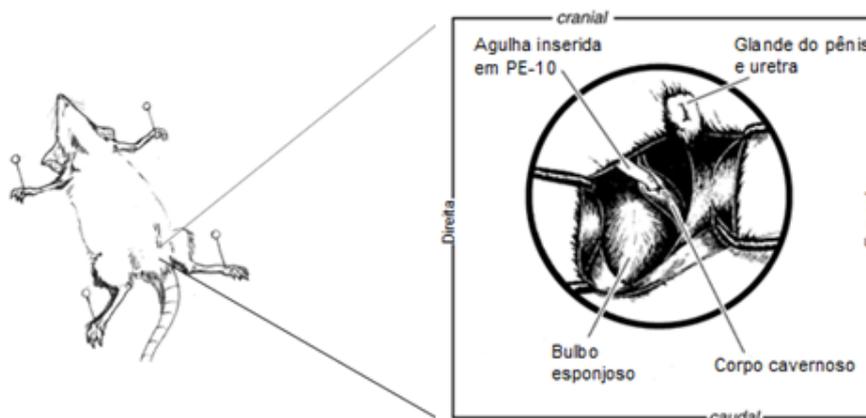
**FIGURA 11** – Monitoramento da pressão arterial média.  
Fonte: figura de experimento feito pela autora



**FIGURA 12** – Exposição do gânglio pélvico maior (GPM).  
Fonte: adaptado de HEDLUND e cols., 2005.

O pênis foi isolado e exposto e um dos corpos cavernosos foi canulado por uma agulha de pequeno diâmetro (calibre 30 G) inserida em um polietileno PE-10 (FIG. 13), contendo salina heparinizada 50 UI/mL, conectado a transdutor de pressão e um sistema de aquisição de dados para medida da pressão intracavernosa. Um eletrodo bipolar de platina foi colocado no centro do GPM e ajustado posteriormente. A estimulação foi realizada de forma contínua e crescente, fixando-se a tensão em 4 Volts, pulsos de 5 milissegundos e frequência variando de 1 a 16 Hz, com mudança de frequência a cada 30 segundos (Estimulador GRASS SD9). A pressão intracavernosa (PIC) e a pressão arterial média (PAM) foram monitoradas continuamente durante a estimulação ganglionar, através de um sistema de aquisição de dados (DATAQ/Windaq, versão 2.63). Os resultados (índice de ereção)

foram expressos como a razão da PIC/PAM (magnitude da resposta máxima) para cada frequência utilizada para os estímulos do GPM. Foram realizadas 3 seqüências de estimulação elétrica (frequências 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 Hz), com intervalos de 5 minutos entre as mesmas. Ao final do experimento, esses animais ainda sob anestesia foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>.



**FIGURA 13** – Exposição do corpo cavernoso.  
Fonte: adaptado de HEDLUND e cols., 2005.

### 3.4 Monitoramento da pressão arterial

O método utilizado para monitoramento semanal da pressão arterial foi o de pletismografia de cauda. Os ratos foram acondicionados em caixas contentoras de acrílico, para limitar seus movimentos. Na cauda, foi colocado um manguito (tail-cuff) acoplado a uma bomba insufladora de ar (Eletro-esfigmomanômetro, Narco Bio-Systems) para promover o enchimento do manguito e conseqüente oclusão do fluxo sanguíneo, além de um sensor piezoelétrico para detecção do pulso (FIG. 14). A cauda foi levemente aquecida por uma lâmpada a fim de promover a dilatação da artéria caudal e possibilitar a detecção do pulso pelo sensor. Tanto o manguito quanto o sensor foram acoplados a um sistema de aquisição de dados (inicialmente Mac Lab/400, programa Chart, versão 3.5, posteriormente substituído pelo DATAQ/Windaq, versão 2.63) para registro do pulso correspondente ao fluxo sanguíneo, bem como da pressão necessária (em mmHg) para se ocluir a artéria caudal. Após a estabilização do fluxo, a bomba de insufladora foi acionada (pressão máxima de 200 mmHg) e o manguito tornou-se inflado, o que fez com que houvesse a oclusão do fluxo sanguíneo. Esta oclusão foi observada pela ausência de fluxo

detectada pelo sensor. Em seguida, o manguito foi desinflado, havendo retorno do fluxo sanguíneo. O primeiro sinal de pulso detectado representou o momento em que a pressão do sistema tornou-se menor do que a pressão sanguínea do rato. Este valor de pressão de oclusão do manguito que permitiu o aparecimento do primeiro sinal de pulso foi considerado equivalente à pressão arterial sistólica (PAS).



**FIGURA 14** – Pletismografia caudal. Pode-se observar o animal acondicionado numa caixa de acrílico e, em sua cauda, um manguito e um sensor de pulso foram acoplados ao sistema de aquisição de dados.

Fonte: Foto de um dos experimentos feita pela autora.

### **3.5 Monitoramento da glicemia**

As concentrações sanguíneas de glicose foram monitoradas semanalmente utilizando-se um glicosímetro digital (Breeze 2<sup>®</sup>, Bayer). O sangue para análise foi obtido da pata traseira do rato, mediante perfuração, utilizando-se lancetas (Breeze 2<sup>®</sup>, Bayer), depois de devida assepsia com álcool a 70%. Os valores de glicemia foram expressos em mg/dL.

### **3.6 Tratamentos especiais**

#### **3.6.1 Hipertensão DOCA–Sal**

Os ratos receberam um implante subcutâneo de um pellet de silicone (Dow Corning) contendo 200 mg/kg de acetato de deoxicorticosterona (Sigma-Aldrich), através de uma incisão de 1 cm na região dorsal e, ainda, realização de nefrectomia unilateral.

Esses procedimentos cirúrgicos foram feitos em condições assépticas e sob anestesia pela mistura de quetamina/xilasina (100/14 mg/kg, IM).

Como após a realização desses procedimentos, os ratos se recobram da anestesia, foi aplicada uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico<sup>®</sup>, Forte Dodge Ltda, na dose de 24.000 UI de penicilina e 10 mg de estreptomicina e diidroestreptomicina por animal, IM) e uma dose de analgésico e antiinflamatório não-esteroidal flunixinina meglumina (Banamine<sup>®</sup>, Schering-Plough, S/A, na dose de 1,0 mg por animal, SC). Esses animais foram colocados em caixas levemente aquecidas e limpas, até a total recuperação. Ainda, receberam uma suplementação salina na água de beber (1% NaCl, 0,2% KCl).

Após o período de tratamento, valores de pressão foram obtidos utilizando-se para tal um pletismógrafo de cauda acoplado a um sistema de aquisição de dados (Mac Lab/400, programa Chart versão 3.5 ou DATAQ/Windaq, versão 2.63). Foram considerados hipertensos os ratos que apresentaram pressão arterial sistólica superior a 150 mmHg. Ratos uni-nefrectomizados com livre acesso a água de beber foram usados como controles sham operados.

### **3.6.2 Hipertensão L-NAME**

Os ratos foram mantidos em caixas individuais e a hipertensão foi induzida através da administração de L-NAME (Sigma-Aldrich 25 mg/kg/dia) na água de beber, por um período de 4 semanas. Para garantir a ingestão da dose requerida, a ingestão de água foi monitorada e a dose de L-NAME ajustada durante os 30 dias de tratamento para cada rato. Foram considerados hipertensos os ratos que apresentaram pressão arterial sistólica superior a 150 mmHg. Os ratos que receberam água sem tratamento foram utilizados como controle. A pressão arterial foi monitorada semanalmente pelo método de pletismografia de cauda.

### **3.6.3 Diabetes induzida por estreptozotocina**

A diabetes foi induzida nos ratos através de três injeções intraperitoneais consecutivas de estreptozotocina (STZ) 40 mg/kg/dia, em veículo tampão citrato de sódio 0,05 M, com pH 5,0. Após 5 dias da aplicação da última dose de estreptozotocina, o teste de glicemia capilar foi realizado utilizando-se um glicosímetro digital (Breeze 2<sup>®</sup>, Bayer) para se obter as concentrações sanguíneas da glicose. Foram considerados diabéticos ratos que apresentaram níveis de glicemia superiores a 250 mg/dL. O mesmo volume de veículo (tampão citrato de sódio, 0,05 M, pH 5,0) foi injetado em ratos com a mesma idade e peso e os mesmos foram utilizados como controles.

Os animais foram utilizados 4 semanas ou 8 semanas após a última injeção de STZ ou veículo, havendo monitoramento semanal da pressão arterial (método pletismografia de cauda) e da glicemia capilar.

### **3.6.4 Tratamento crônico com inibidor da ECA (iECA)**

Os ratos foram mantidos em caixas individuais e receberam o tratamento com um inibidor da ECA, maleato de enalapril (Renitec<sup>®</sup> comprimidos de 20 mg, Merck Sharp & Dohme, 30 mg/kg/dia) ou captopril (Capoten<sup>®</sup> comprimidos de 50mg, Bristol-Myers Squibb, 25mg/kg/dia), preparados a partir da maceração completa dos respectivos comprimidos e adicionados nas concentrações adequadas para fornecimento das doses acima indicadas na água de beber, diariamente, durante 4 ou 8 semanas, de acordo com o protocolo em questão. Para garantir a ingestão da dose requerida, a ingestão de água foi monitorada e a dose de enalapril ou captopril ajustada durante os dias de tratamento para cada rato. Os ratos que receberam água sem tratamento foram utilizados como controle. A pressão arterial foi monitorada semanalmente pelo método de pletismografia de cauda.

### **3.6.5 Tratamento crônico com bloqueador dos receptores de angiotensina (BRA)**

Os ratos foram mantidos em caixas individuais e receberam o tratamento com um bloqueador dos receptores de Angiotensina II, candesartana cilexetila (Atacand® comprimidos de 16 mg, AstraZeneca, 2 mg/kg/dia) preparados a partir da maceração completa dos comprimidos e adicionados nas concentrações adequadas para fornecimento da dose acima indicada na água de beber, diariamente, durante 4 ou 8 semanas, de acordo com o protocolo em questão. Para garantir a ingestão da dose requerida, a ingestão de água foi monitorada e a dose de candesartana ajustada durante os dias de tratamento para cada rato. Os ratos que receberam água sem tratamento foram utilizados como controle. A pressão arterial foi monitorada semanalmente pelo método de pletismografia de cauda.

### **3.7 Análise estatística**

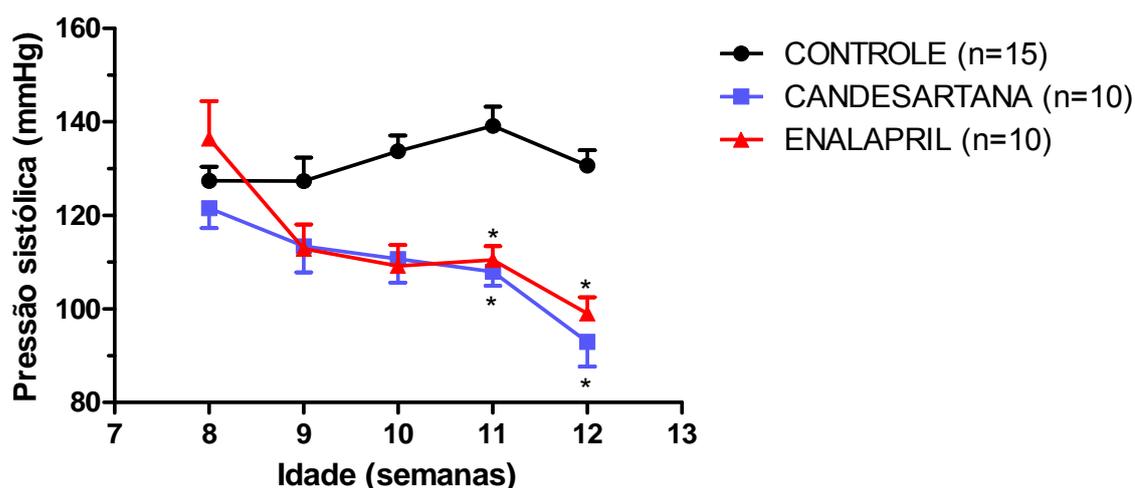
Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo método one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni e  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Grupo hipertenso L-NAME

O monitoramento da pressão arterial sistólica dos ratos controles (normotensos), tratados com enalapril e tratados com candesartana foi realizado durante 4 semanas, a partir da 8ª semana de idade (GRAF. 1), bem como dos ratos tratados com L-NAME, L-NAME + candesartana (GRAF. 2) e L-NAME + enalapril (GRAF. 3).

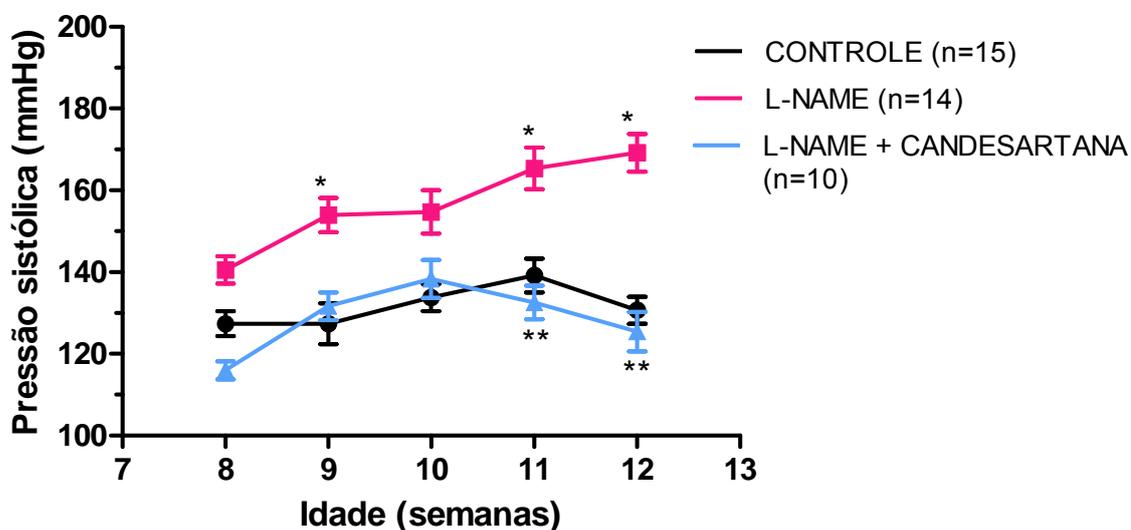
O tratamento de ratos controles com candesartana e enalapril promoveu uma redução da pressão arterial sistólica a partir da 9ª semana, sendo que a diferença foi considerada significativa a partir da 11ª semana (GRAF. 1).



**Gráfico 1** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles, tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) e tratados com enalapril (30 mg/kg/dia). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

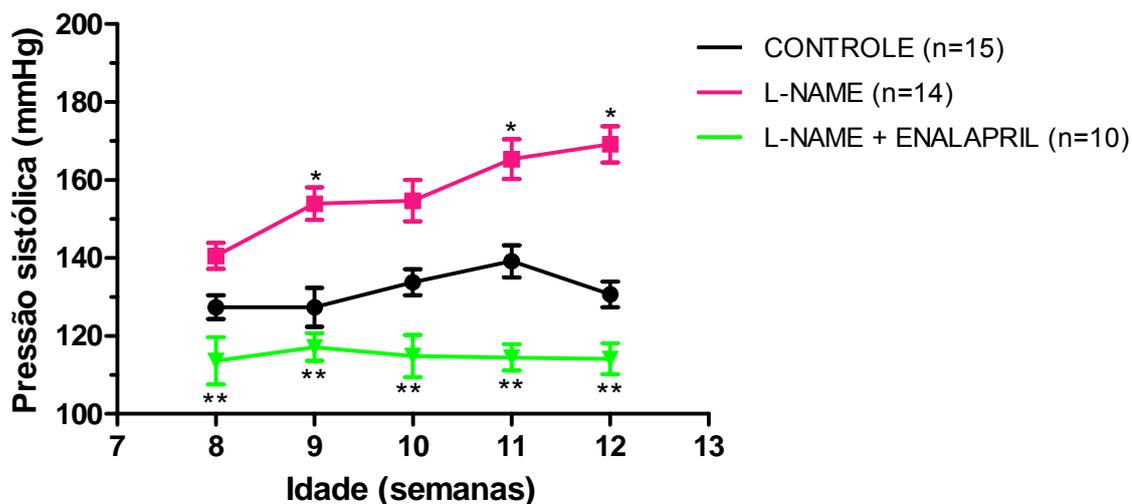
O tratamento com L-NAME promoveu um aumento da pressão arterial sistólica. Esse aumento foi considerado significativo nas semanas 9, 11 e 12 em relação à pressão dos ratos controles. Os ratos tratados concomitantemente com L-NAME e candesartana não apresentaram diferença significativa nos valores de pressão sistólica em relação aos ratos controles. No entanto, eles apresentaram uma redução da pressão sistólica em relação ao grupo tratado somente com L-NAME.

Essa redução foi considerada estatisticamente significativa nas semanas 11 e 12 (GRAF. 2).



**Gráfico 2** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles, ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia) e ratos tratados com L-NAME + candesartana (25 mg/kg/dia + 2 mg/kg/dia). Cada ponto representa a média ± EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle e (\*\*) diferença significativa em relação ao L-NAME (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

O tratamento concomitante com L-NAME e enalapril demonstrou uma redução significativa da pressão arterial sistólica em relação aos ratos tratados com L-NAME nas 4 semanas observadas, mas sem diferença significativa em relação aos ratos controles (GRAF. 3).

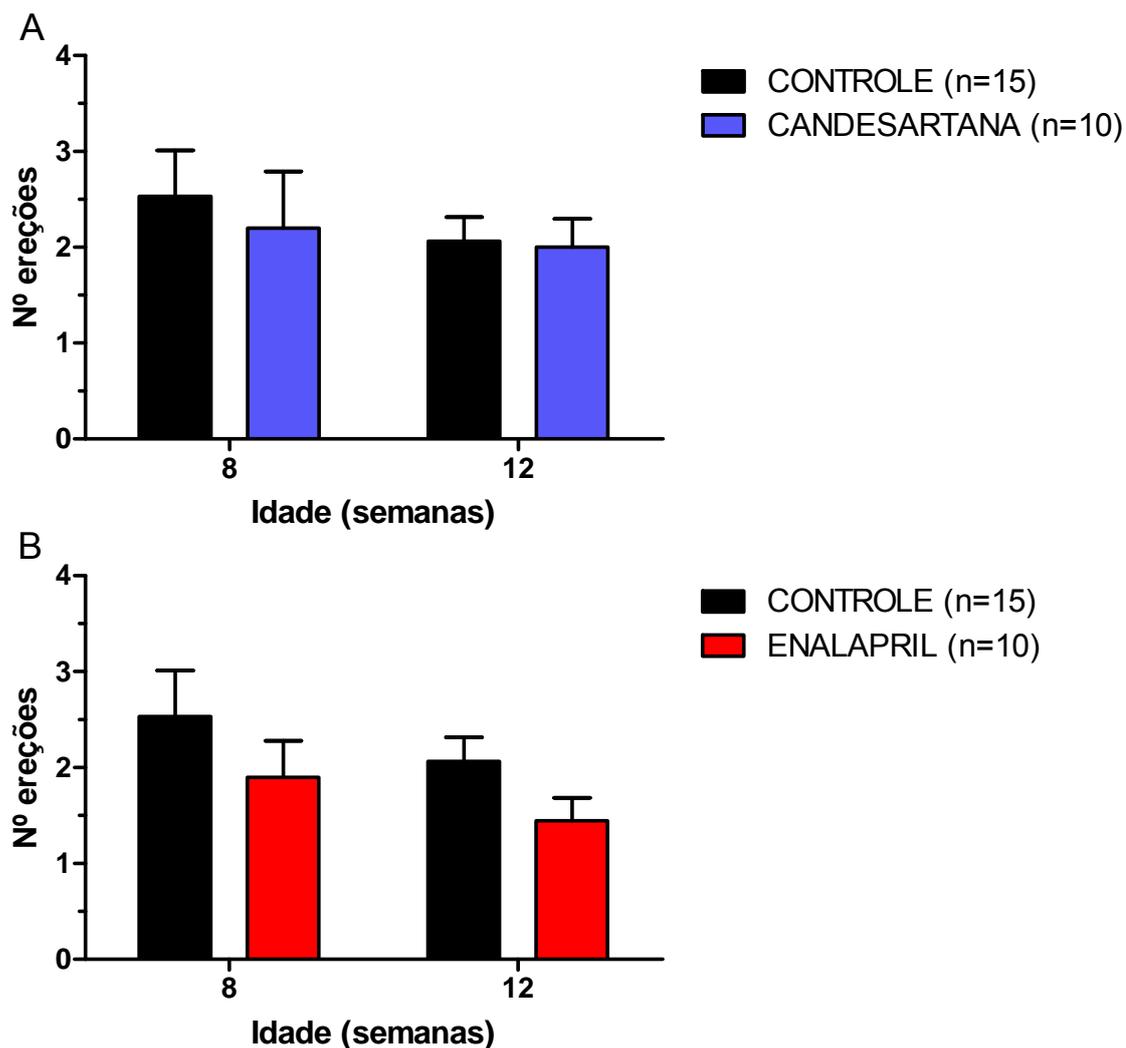


**Gráfico 3 – (A)** Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles, ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia) e ratos tratados com L-NAME + enalapril (25 mg/kg/dia + 30 mg/kg/dia). Cada ponto representa a média ± EPM, (\*) representa diferença significativa (p<0.05) em relação ao controle e (\*\*) diferença significativa em relação ao L-NAME (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Para se avaliar a função erétil em ratos conscientes (acordados), os animais foram submetidos ao modelo de ereção induzida por apomorfina (80µg/Kg, SC) e acompanhados semanalmente.

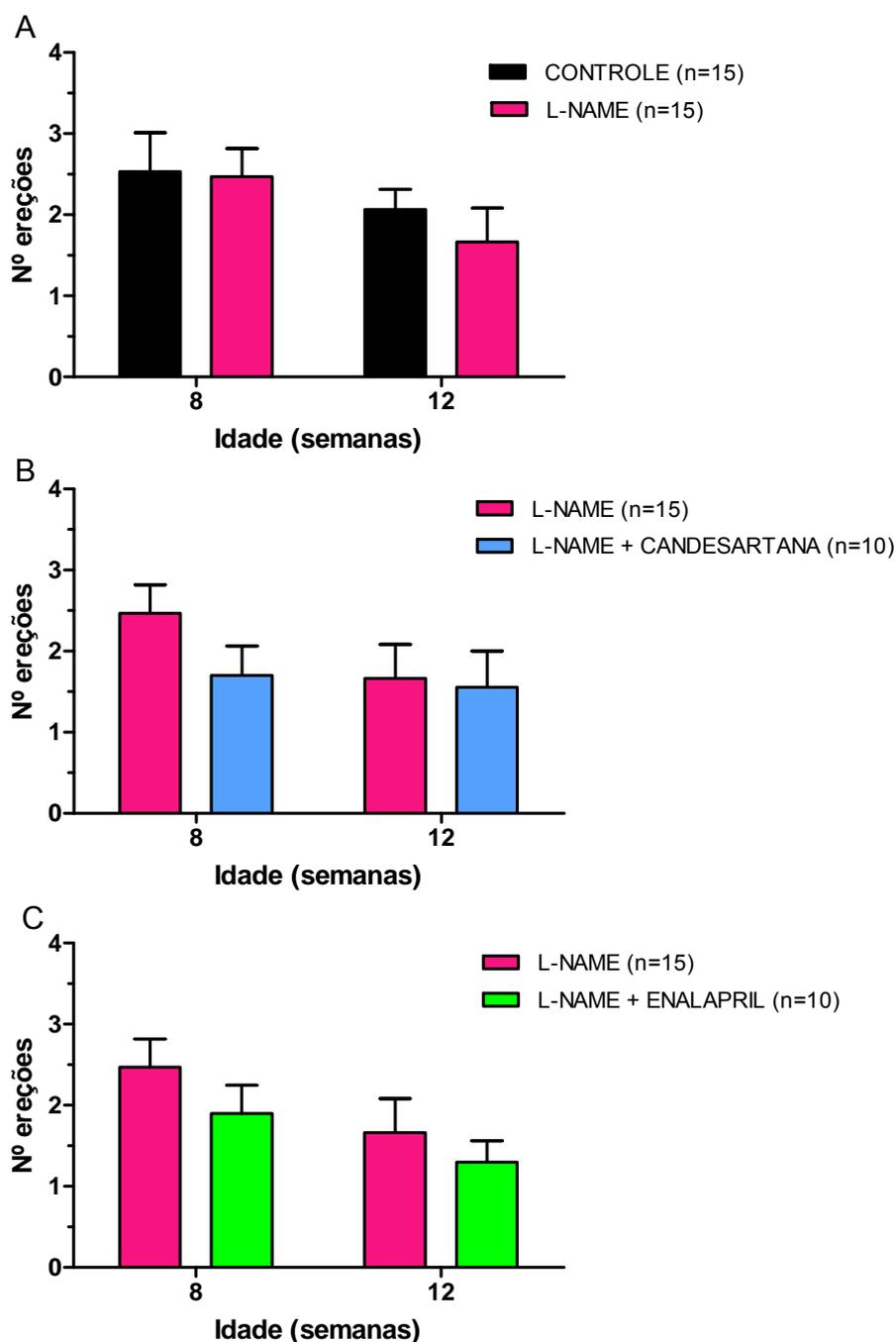
Os ratos controles, ratos tratados com enalapril e tratados com candesartana foram acompanhados durante 4 semanas, a partir da 8ª semana de idade, bem como os ratos tratados com L-NAME, L-NAME + candesartana e L-NAME + enalapril.

Durante as 4 semanas de acompanhamento, não foi observada nenhuma diferença significativa no número de ereções induzidas por apomorfina nos grupos tratados com candesartana (GRAF. 4A) e enalapril (GRAF. 4B), em relação aos ratos controle.



**Gráfico 4** – (A) N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com candesartana (2 mg/kg/dia), correspondente às semanas 0 (idade de 8 semanas) e 4 (idade de 12 semanas) após tratamento. (B) N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com enalapril (30 mg/kg/dia), correspondente às semanas 0 (idade de 8 semanas) e 4 (idade de 12 semanas) após tratamento. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

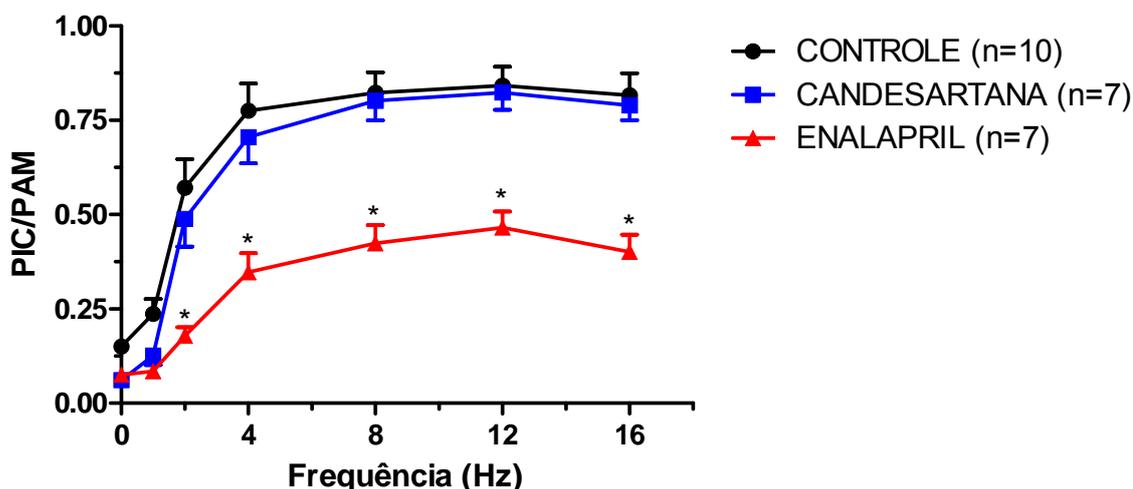
Não foram observadas diferenças significativas no número de ereções do grupo tratado com L-NAME, em relação ao controle (GRAF. 5A), do grupo tratado com L-NAME + candesartana, em relação ao grupo tratado com L-NAME (GRAF. 5B) e do grupo tratado com L-NAME + enalapril, em relação ao grupo tratado com L-NAME (GRAF. 5C).



**Gráfico 5** – (A) N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia), correspondente às semanas 0 (idade de 8 semanas) e 4 (idade de 12 semanas) após tratamento. (B) N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos tratados com L-NAME (25 mg/Kg/dia) ou L-NAME + candesartana (25 mg/kg/dia + 2 mg/kg/dia). (C) N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia) ou L-NAME + enalapril (25 mg/kg/dia + 30 mg/kg/dia). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Usando o modelo de ereção *in vivo* em ratos anestesiados pela mistura quetamina/xilasina, foi avaliado o efeito da estimulação elétrica do GPM (estimulação ganglionar), numa voltagem fixa (4 V) e frequências crescentes (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 Hz) sobre o índice de ereção (estimado a partir da razão PIC/PAM).

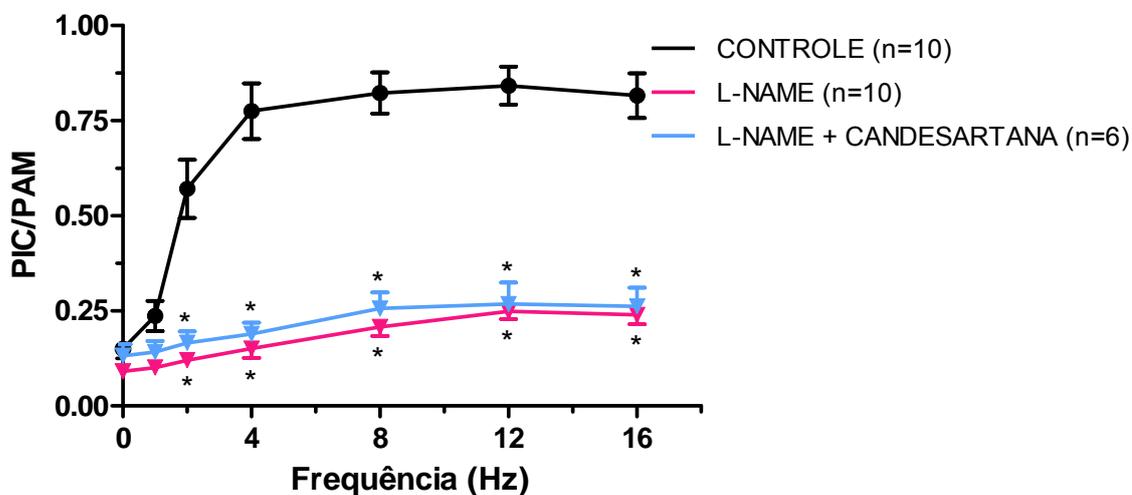
O tratamento com candesartana não promoveu alteração significativa no índice de ereção (razão PIC/PAM) com relação ao observado para os ratos controles, em nenhuma das frequências utilizadas durante a estimulação ganglionar. Já o tratamento com enalapril promoveu uma redução significativa no índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação ao observado para os ratos controles e para os ratos tratados com candesartana (GRAF. 6).



**Gráfico 6** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles, tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) e tratados com enalapril (30 mg/kg/dia), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

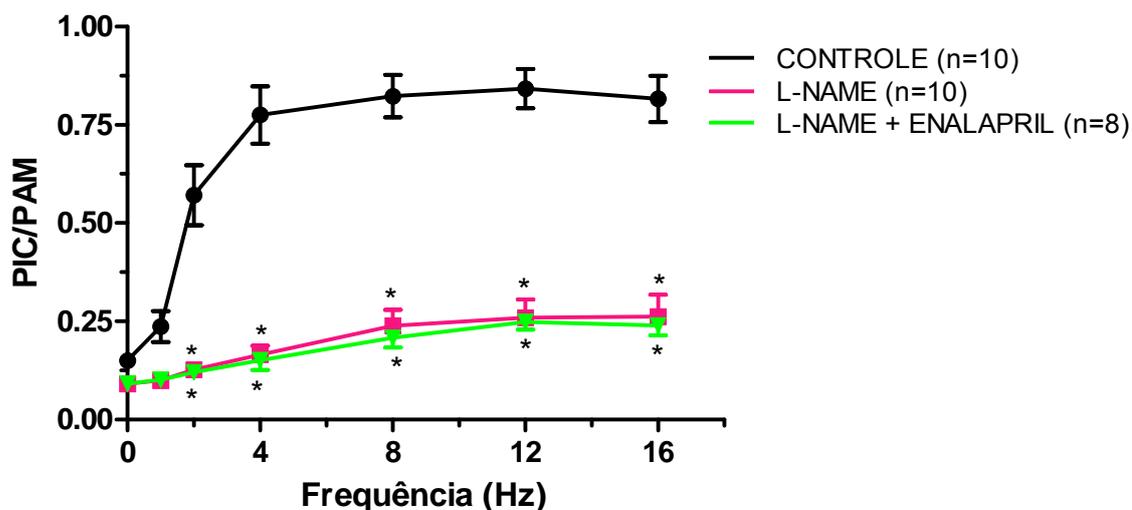
O tratamento com L-NAME promoveu uma queda significativa do índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação ao observado para os ratos controles. O tratamento concomitante com L-NAME e candesartana promoveu uma queda significativa do índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação aos

índices observados para os ratos controles, não havendo diferença entre os ratos tratados com L-NAME isoladamente (GRAF. 7).



**Gráfico 7** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles, ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia) e ratos tratados com L-NAME + candesartana (25 mg/kg/dia + 2 mg/kg/dia), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Do mesmo modo, o tratamento concomitante com L-NAME e enalapril promoveu uma queda significativa do índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação aos índices observados para os ratos controles, não havendo diferença entre os ratos tratados com L-NAME isoladamente (GRAF. 8).



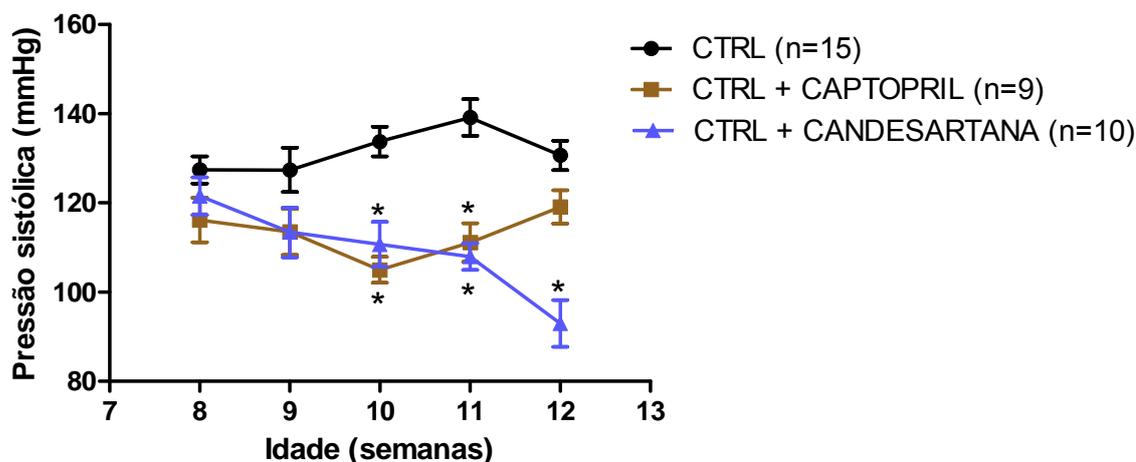
**Gráfico 8** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles, ratos tratados com L-NAME (25 mg/kg/dia) e ratos tratados com L-NAME + enalapril (25 mg/kg/dia + 30 mg/kg/dia), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

#### 4.2 Grupo hipertenso DOCA-sal

O monitoramento da pressão arterial sistólica foi realizado nos ratos controles, controles tratados com captopril, controles tratados com candesartana, sham (com cirurgia fictícia), controle DOCA-sal, DOCA-sal tratado com captopril e DOCA-sal tratado com candesartana, durante as 4 semanas de acompanhamento.

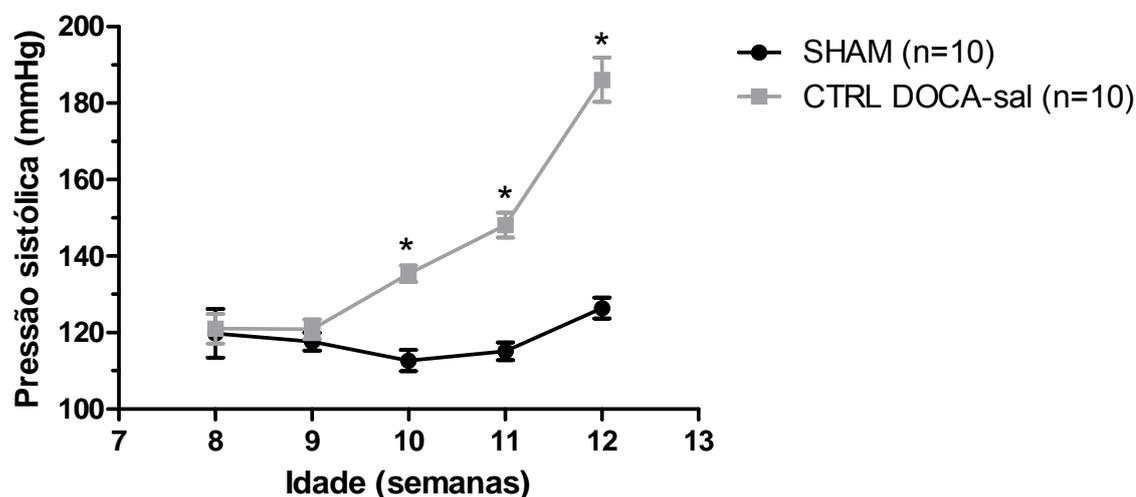
A substituição do iECA enalapril pelo captopril foi feita porque o tratamento com o primeiro reduziu os índices de ereção (razão PIC/PAM), como demonstrado no gráfico 6.

Os ratos controles tratados com captopril apresentaram uma redução significativa na pressão arterial sistólica, nas semanas 10 e 11, em relação aos ratos controles. Já os ratos controles tratados com candesartana apresentaram uma redução significativa nas semanas 10, 11 e 12, em relação ao grupo controle (GRAF. 9).



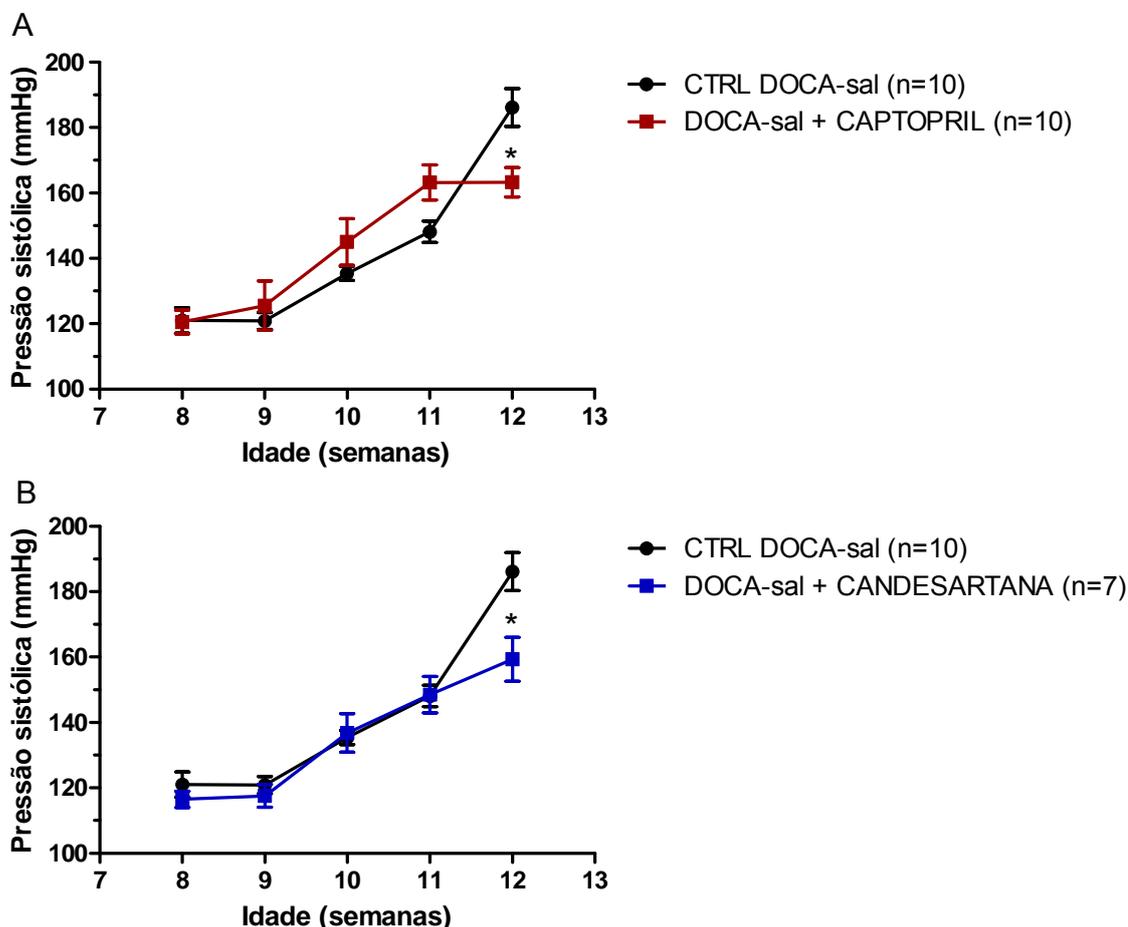
**Gráfico 9** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles, ratos tratados com captopril (25 mg/kg/dia) e ratos tratados com candesartana (2 mg/kg/dia). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

Os ratos controles DOCA-sal apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistólica, em relação ao grupo sham, nas semanas 10, 11 e 12 (GRAF. 10).



**Gráfico 10** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles DOCA-sal (“pellet” contendo 200mg/kg e suplementação na água de beber de NaCl 1% / KCl 0,2%) e ratos sham (cirurgia fictícia). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao sham (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

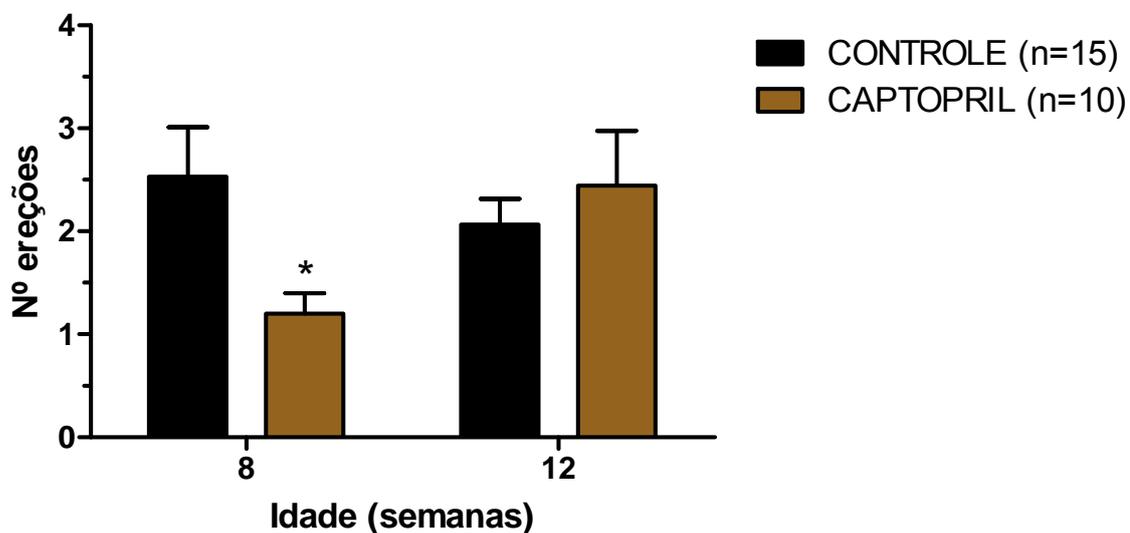
Os ratos DOCA-sal tratados com captopril ou candesartana apresentaram uma redução significativa na pressão arterial sistólica na semana 12, em relação ao grupo controle DOCA-sal (GRAF. 11).



**Gráfico 11** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles DOCA-sal (“pellet contendo 200mg/kg e suplementação na água de beber de NaCl 1% / KCl 0,2%) e ratos DOCA-sal tratados com captopril (25mg/kg/dia) (A) ou tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (B). Cada ponto representa a média ± EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle DOCA-sal (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

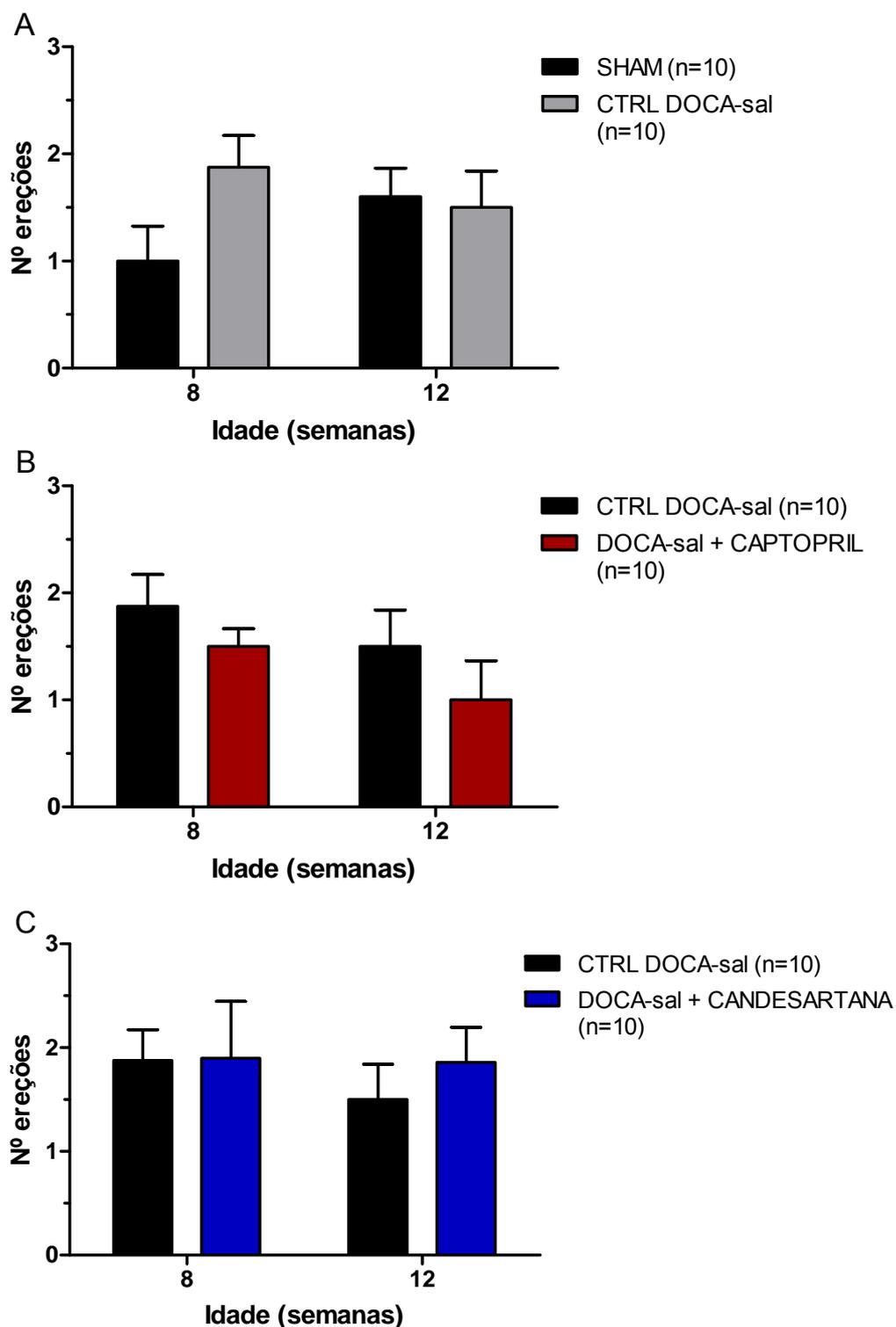
No modelo de ereção em ratos acordados (conscientes), não foi observada diferença significativa no número de ereções entre os ratos tratados com captopril (GRAF. 12) ou candesartana (GRAF. 4A) por 4 semanas (correspondente à 12 semanas de idade). Inesperadamente, foi observada uma diferença significativa no número de ereções na semana 0, antes do início do tratamento (idade de 8

semanas) para os ratos tratados com captopril, em relação aos ratos controles (GRAF. 12).



**Gráfico 12** – Nº de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com captopril (25 mg/kg/dia), acompanhados durante 4 semanas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Não foi observada diferença significativa no número de ereções nos grupos avaliados: sham e controle DOCA-sal (GRAF. 13A), controle DOCA-sal e DOCA-sal + captopril (GRAF. 13B) e controle DOCA-sal e DOCA-sal + candesartana (GRAF. 13C).

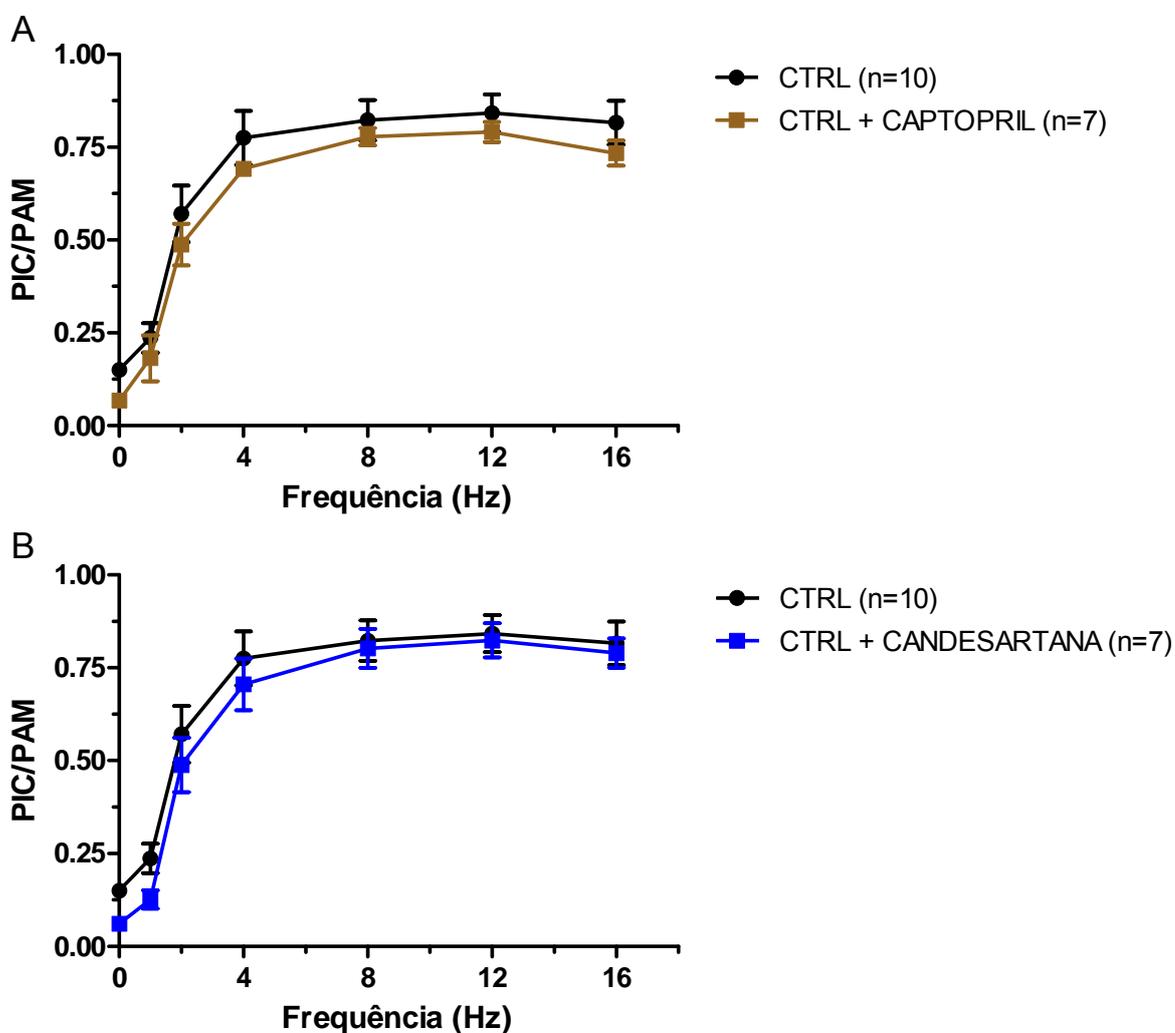


**Gráfico 13** – Nº de ereções induzidas por apomorfina em ratos sham e ratos controles DOCA-sal (“pellet” contendo 200mg/kg e suplementação na água de beber de NaCl 1% / KCl 0,2%) (A), ratos controles DOCA-sal e DOCA-sal tratados com captopril (25mg/kg/dia) (B) e DOCA-sal e DOCA-sal tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (C), acompanhados durante 4 semanas. Cada ponto

representa a média  $\pm$  EPM (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).  
Legenda: CTRL = controle.

Utilizando o modelo de ereção *in vivo* em ratos anestesiados pela mistura quetamina/xilasina, foi avaliado o efeito da estimulação elétrica do GPM (estimulação ganglionar), numa voltagem fixa (4 V) e frequências crescentes (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 Hz) sobre o índice de ereção (estimado a partir da razão PIC/PAM).

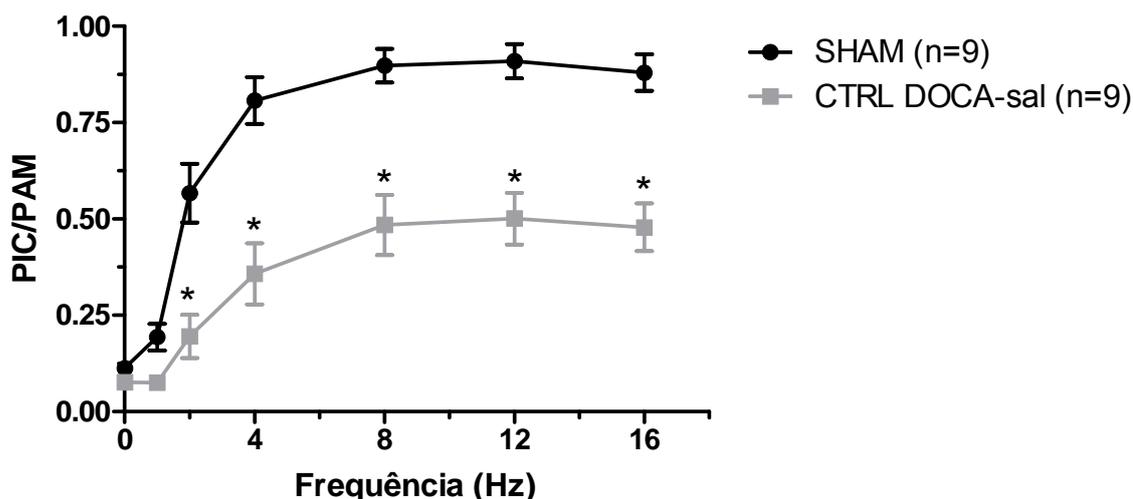
Os ratos tratados com captopril (GRAF. 14A) ou tratados com candesartana (GRAF. 14B) não apresentaram diferença significativa no índice de ereção, em relação aos ratos controles.



**Gráfico 14** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles, tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A) e tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) (B), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com

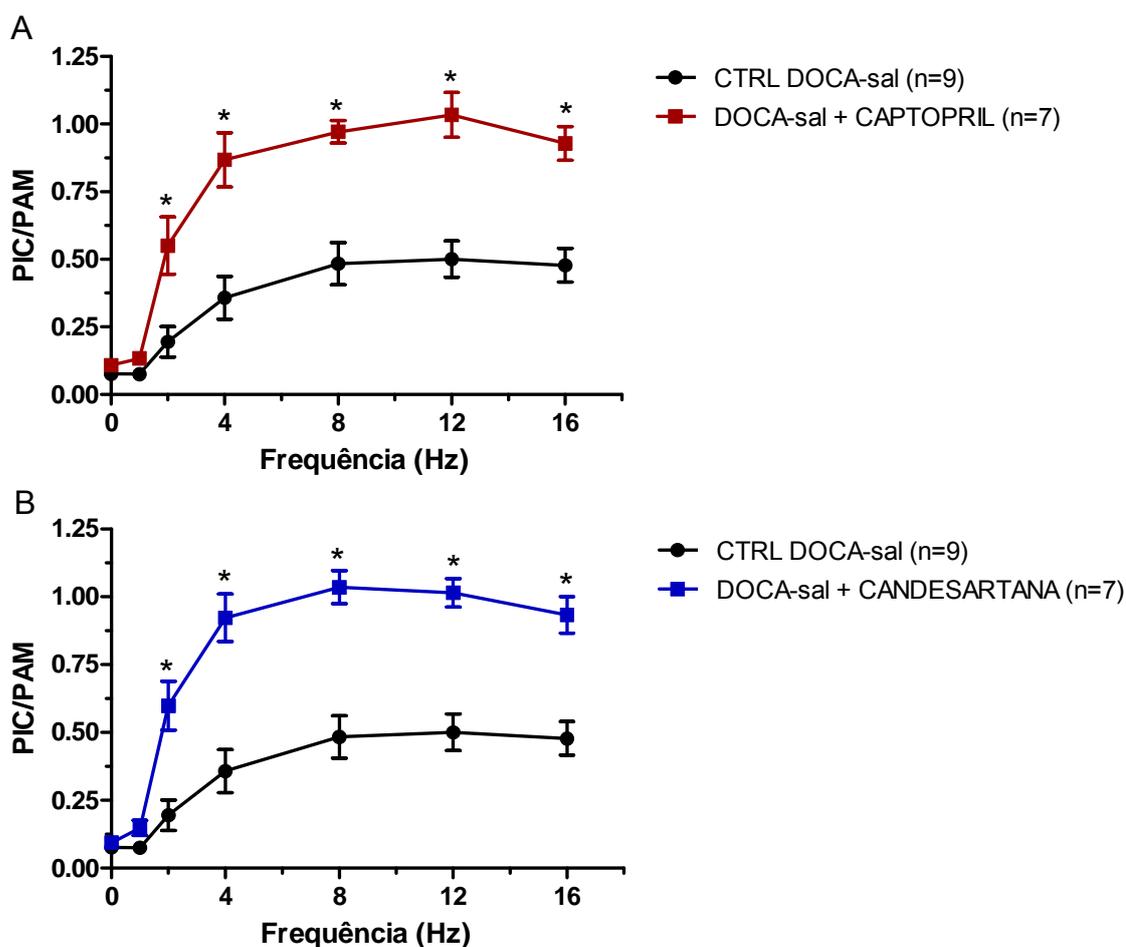
frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

Os ratos controle DOCA-sal apresentaram uma redução significativa no índice de ereção, a partir da frequência de 2 Hz, em relação aos ratos sham (GRAF. 15).



**Gráfico 15** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles DOCA-sal (“pellet” contendo 200mg/kg e suplementação na água de beber de NaCl 1% / KCl 0,2%) e ratos sham, induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao sham (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

O tratamento dos ratos DOCA-sal com captopril (GRAF. 16A) ou com candesartana (GRAF. 16B) promoveu um aumento do índice de ereção, a partir da frequência de 2 Hz, em relação aos ratos controles DOCA-sal.

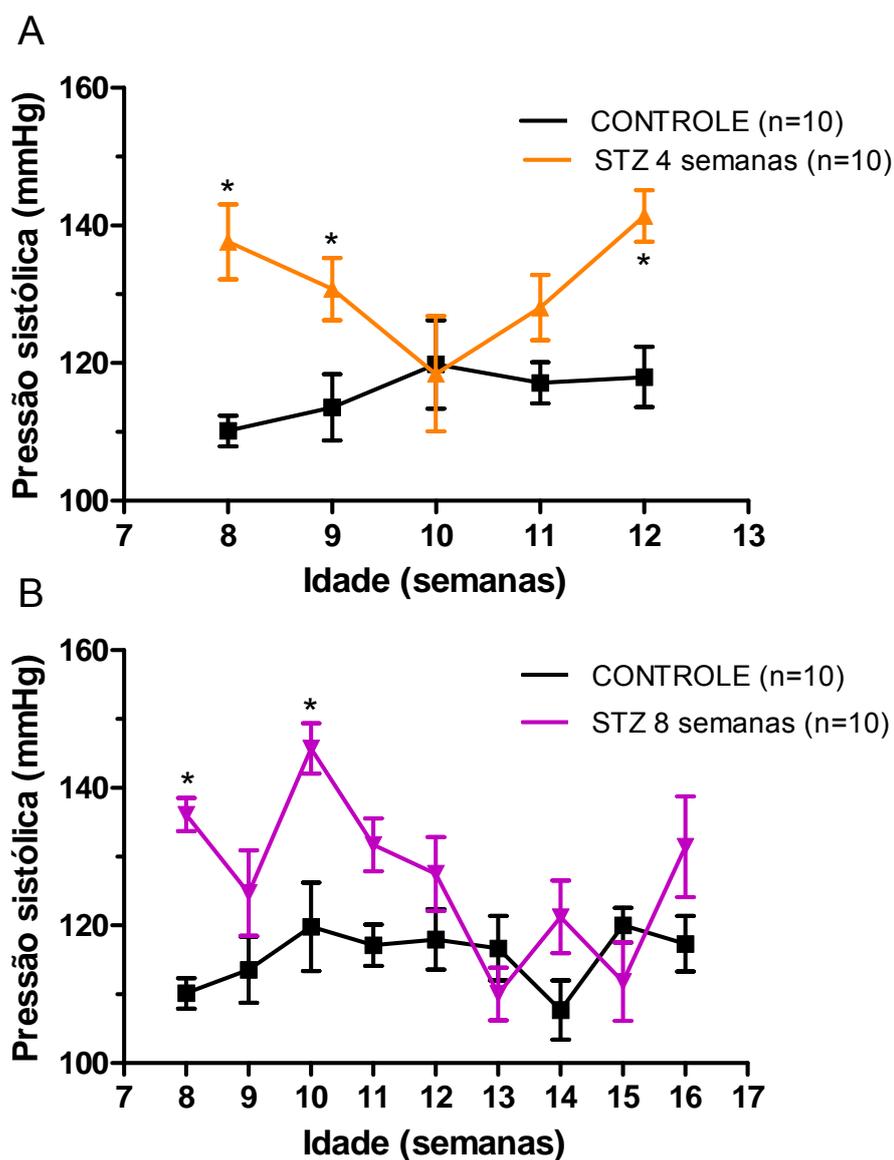


**Gráfico 16** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles DOCA-sal (“pellet” contendo 200mg/kg e suplementação na água de beber de NaCl 1% / KCl 0,2%), ratos DOCA-sal tratados com captopril (25mg/kg/dia) (A) ou tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (B), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle DOCA-sal (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

#### 4.3 Grupo com diabetes induzida por estreptozotocina

O monitoramento da pressão arterial sistólica foi realizado nos ratos controles e diabéticos induzidos por STZ, durante 4 e 8 semanas, a partir da 8ª semana de idade (GRAF. 17).

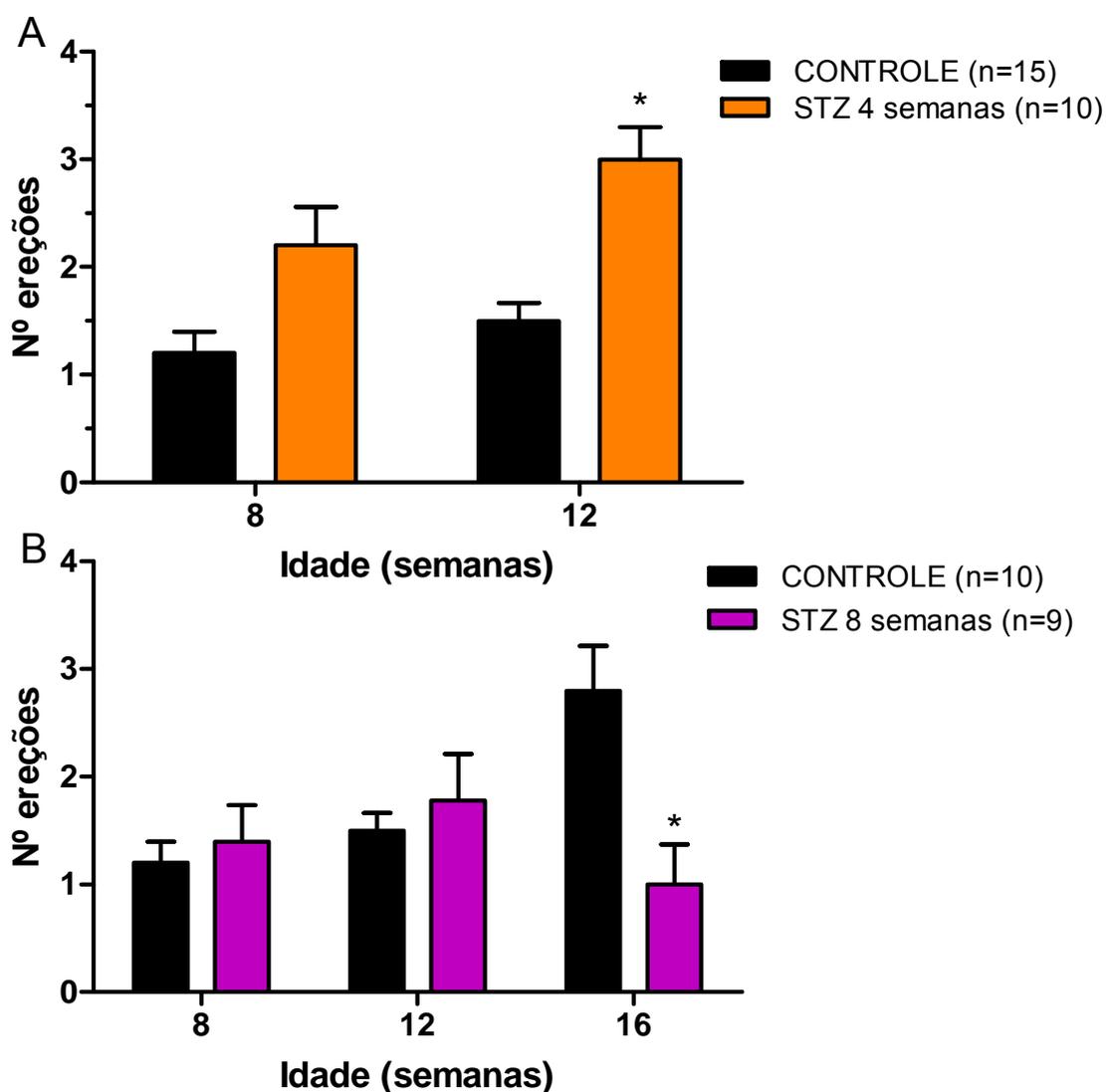
O tratamento crônico com estreptozotocina promoveu diferença significativa na pressão arterial sistólica em relação aos valores observados para os ratos controles nas semanas 8, 9 e 12 para os ratos acompanhados durante 4 semanas (GRAF. 17A) e nas semanas 8 e 10 para os ratos acompanhados durante 8 semanas (GRAF. 17B).



**Gráfico 17** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles e ratos tratados com estreptozotocina (40 mg/kg), acompanhados por 4 semanas (A) e 8 semanas (B). Cada ponto representa a média ± EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Para se avaliar a função erétil em ratos conscientes (acordados), os animais foram submetidos ao modelo de ereção induzida por apomorfina (80µg/Kg, SC).

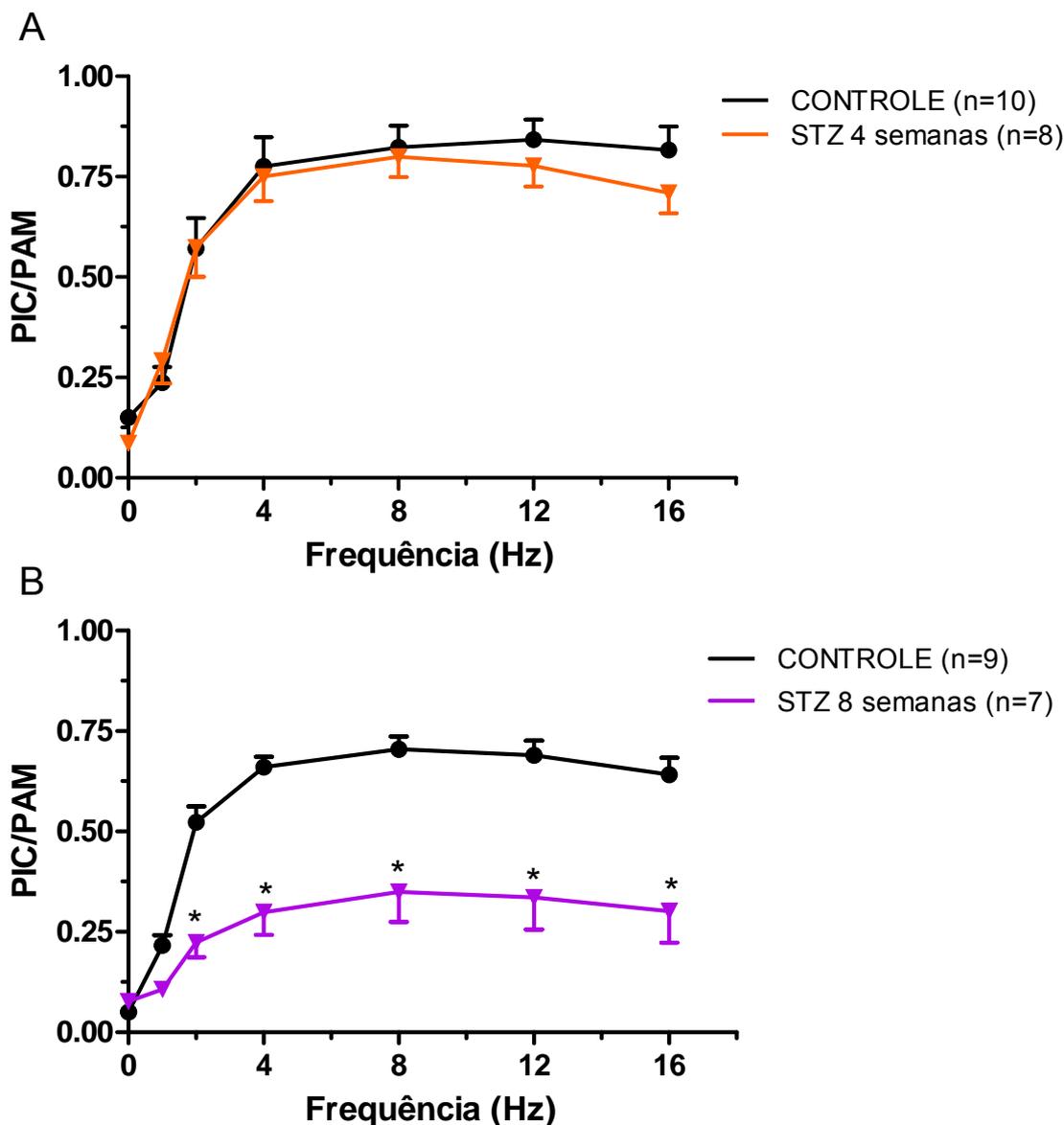
O grupo com diabetes induzida por estreptozotocina acompanhado durante 4 semanas apresentou um aumento significativo no número de ereções induzidas por apomorfina na 12ª semana, em relação aos ratos controles (GRAF. 18A). Já o grupo acompanhado durante 8 semanas apresentou uma queda significativa no número de ereções na 16ª semana, em relação aos ratos controles (GRAF. 18B).



**Gráfico 18** – Nº de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com estreptozotocina (40 mg/kg), acompanhados durante 4 semanas (A) e 8 semanas (B). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Usando o modelo de ereção *in vivo* em ratos anestesiados pela mistura quetamina/xilasina, foi avaliado o efeito da estimulação elétrica do GPM (estimulação ganglionar), numa voltagem fixa (4 V) e frequências crescentes (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 Hz) sobre o índice de ereção (estimado a partir da razão PIC/PAM).

Os ratos com diabetes induzida por estreptozotocina acompanhados por 4 semanas não apresentaram diferença significativa do índice de ereção em relação ao observado para os ratos controles (GRAF. 19A). Já os ratos diabéticos acompanhados durante 8 semanas apresentaram uma redução significativa do índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação aos índices observados para os ratos controles (GRAF. 19B).

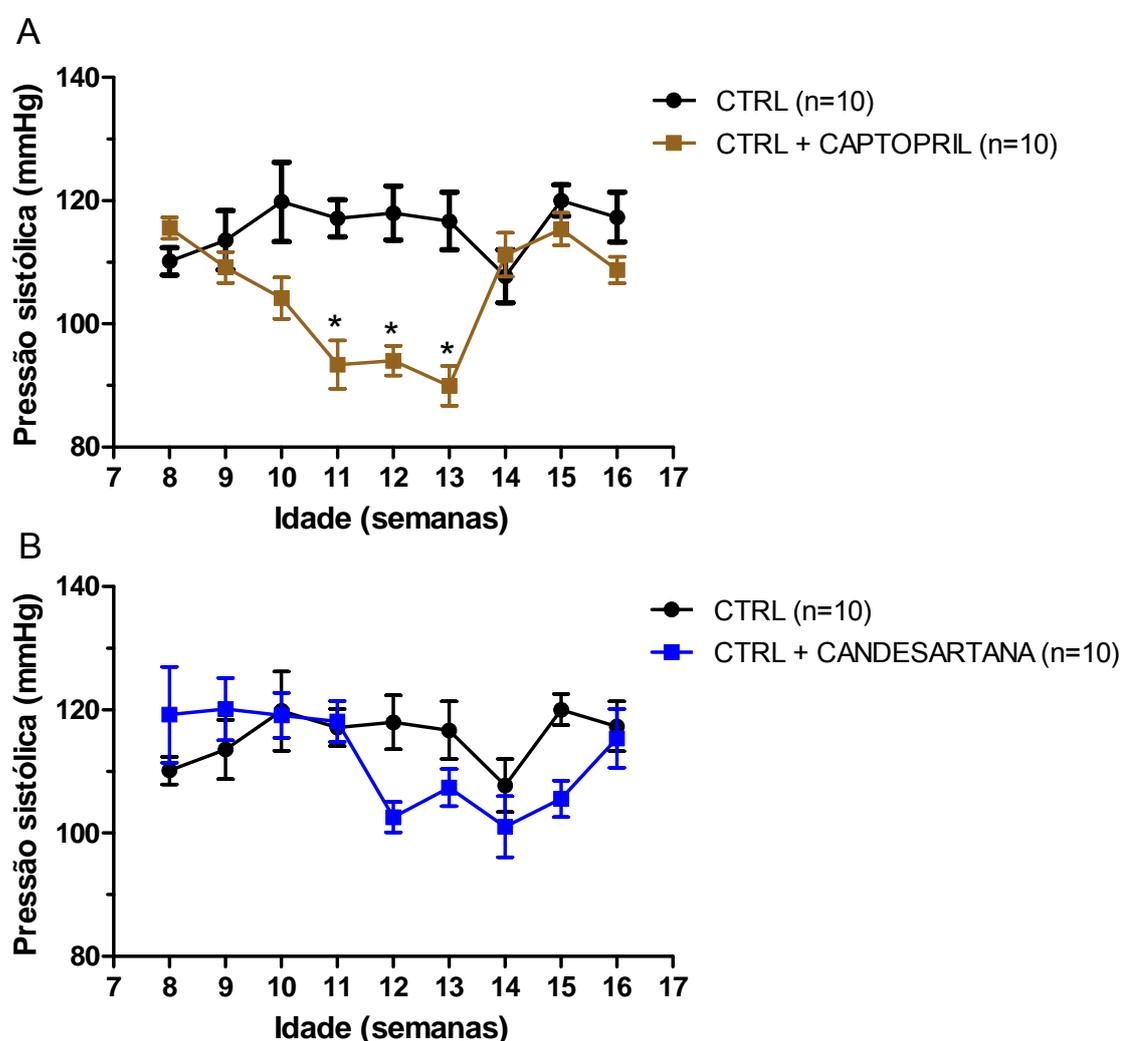


**Gráfico 19** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles e ratos tratados com estreptozotocina (40 mg/kg), acompanhados durante 4 (A) e 8 (B) semanas, induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI).

Pelo fato de ter havido diferença estatística somente nos ratos com diabetes induzida por STZ acompanhados durante 8 semanas, estes grupos foram selecionados para os tratamentos posteriores com captopril e candesartana.

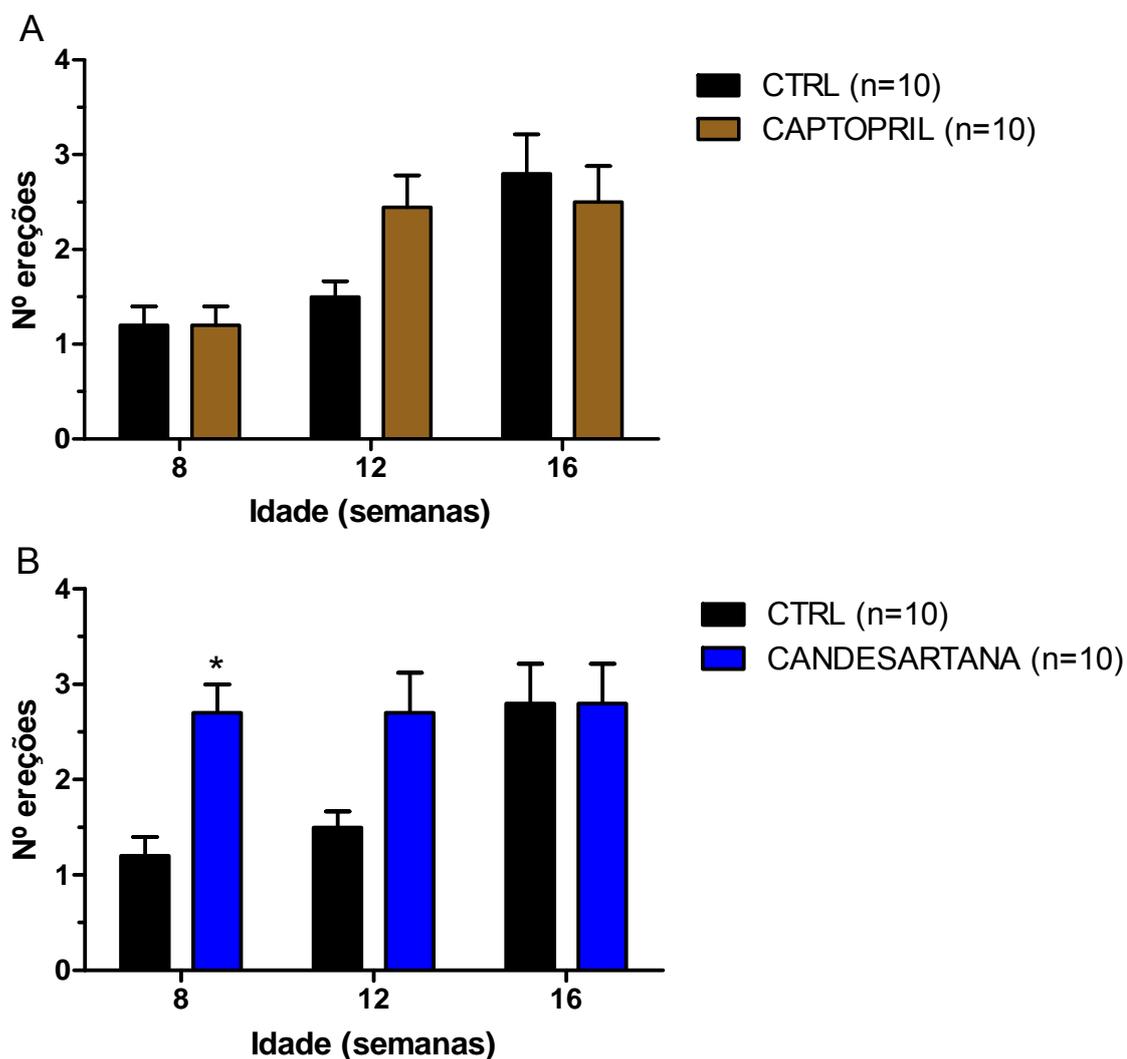
A substituição do iECA enalapril pelo captopril foi feita porque o tratamento com o primeiro reduziu os índices de ereção (razão PIC/PAM), como demonstrado no gráfico 6.

O tratamento dos ratos com captopril promoveu uma redução significativa da pressão arterial sistólica nas semanas 11, 12 e 13, em relação aos ratos controles (GRAF. 20A). Já o tratamento com candesartana não promoveu diferença significativa nos valores pressóricos nas semanas de acompanhamento, em relação aos ratos controle (GRAF. 20B).



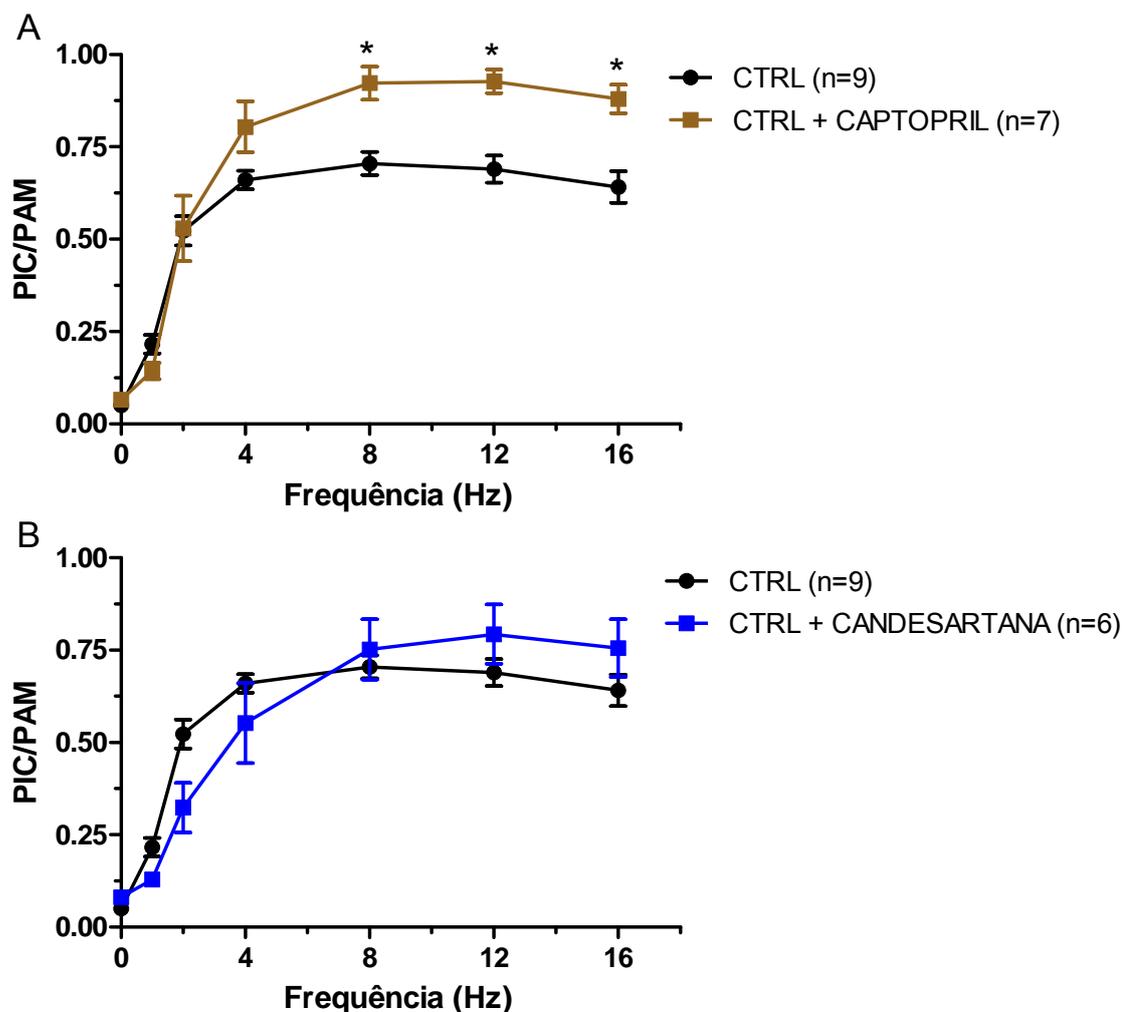
**Gráfico 20** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos controles e ratos tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A) e ratos tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) (B). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

Os ratos controles não apresentaram diferença significativa no número de ereções induzidas por apomorfina na 4ª ou 8ª semana após o início do tratamento com captopril, quando comparados aos ratos controles (GRAF. 21A). Inesperadamente, os ratos que receberam candesartana apresentaram diferença significativa na semana 0 antes do início do tratamento (correspondente a 8 semanas de idade), em relação aos ratos controles (GRAF. 21B).



**Gráfico 21** – Nº de ereções induzidas por apomorfina em ratos controles e ratos tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A) e ratos controles e tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (B), acompanhados durante 8 semanas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

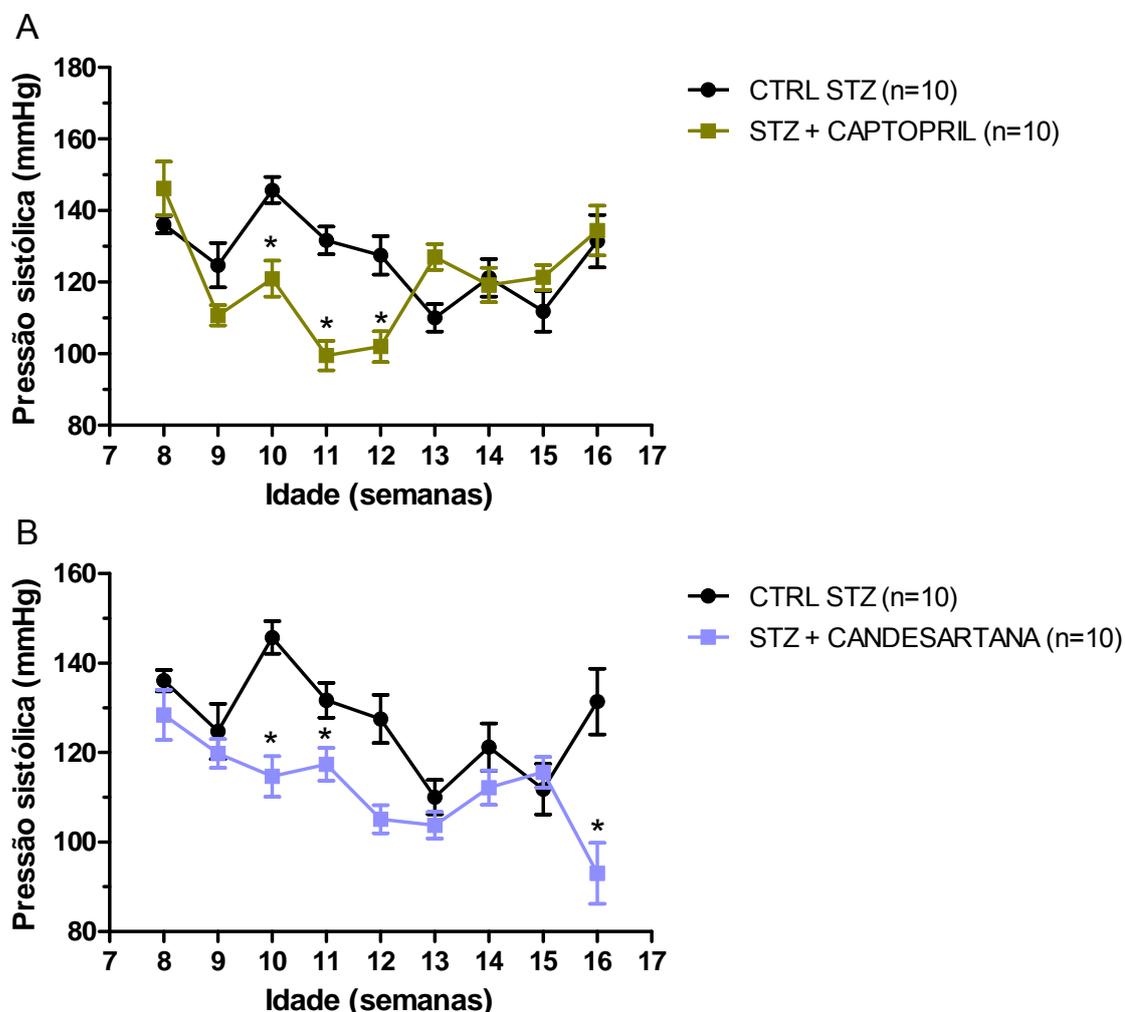
O tratamento com captopril promoveu um aumento significativo do índice de ereção, a partir da frequência de 8 Hz, em relação aos ratos controle (GRAF. 22A). Já o tratamento com candesartana não promoveu diferença significativa em relação aos ratos controle (GRAF. 22B).



**Gráfico 22** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos controles e ratos tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A), e ratos tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (B), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

Comparando-se a pressão arterial sistólica dos ratos com diabetes induzida por STZ tratados com captopril, observou-se uma redução significativa nas semanas 10, 11 e 12, em relação ao grupo com diabetes induzida por STZ (CTRL STZ) (GRAF. 23A).

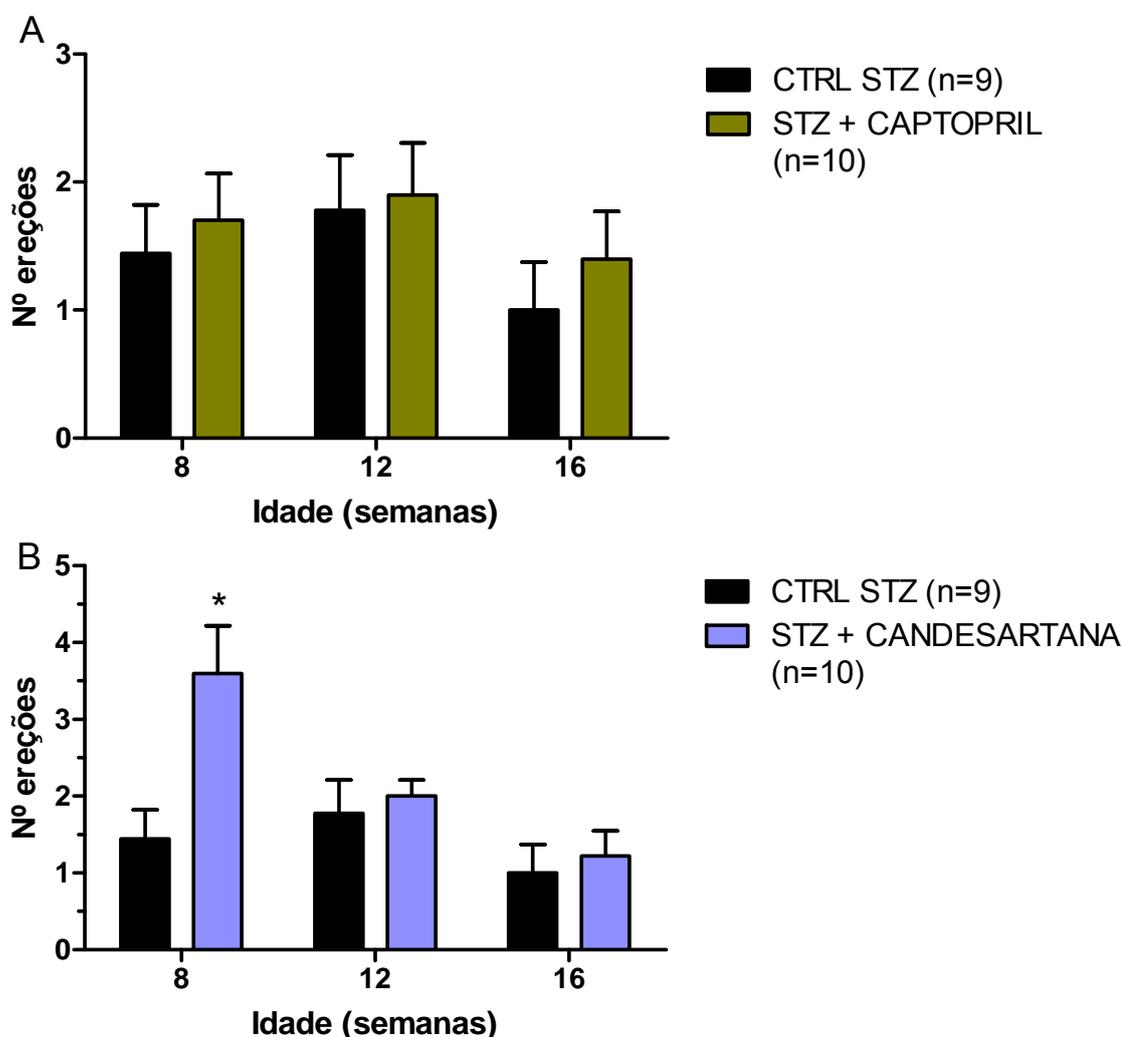
No grupo dos ratos com diabetes induzida por STZ tratados com candesartana, houve uma redução significativa nas semanas 10, 11 e 16, em relação ao grupo CTRL STZ (GRAF. 23B).



**Gráfico 23** – Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) (CTRL STZ) e ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) tratados com captopril (25 mg/Kg/dia) (A), e ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) (B). Cada ponto representa a média ± EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao diabético controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

Com relação à função erétil avaliada em ratos conscientes (modelo de ereção induzida por apomorfina), o tratamento dos ratos com diabetes induzida por STZ com captopril ou candesartana não promoveu diferença significativa no número de ereções, em relação aos ratos diabéticos controle (GRAF. 24). Inesperadamente, os

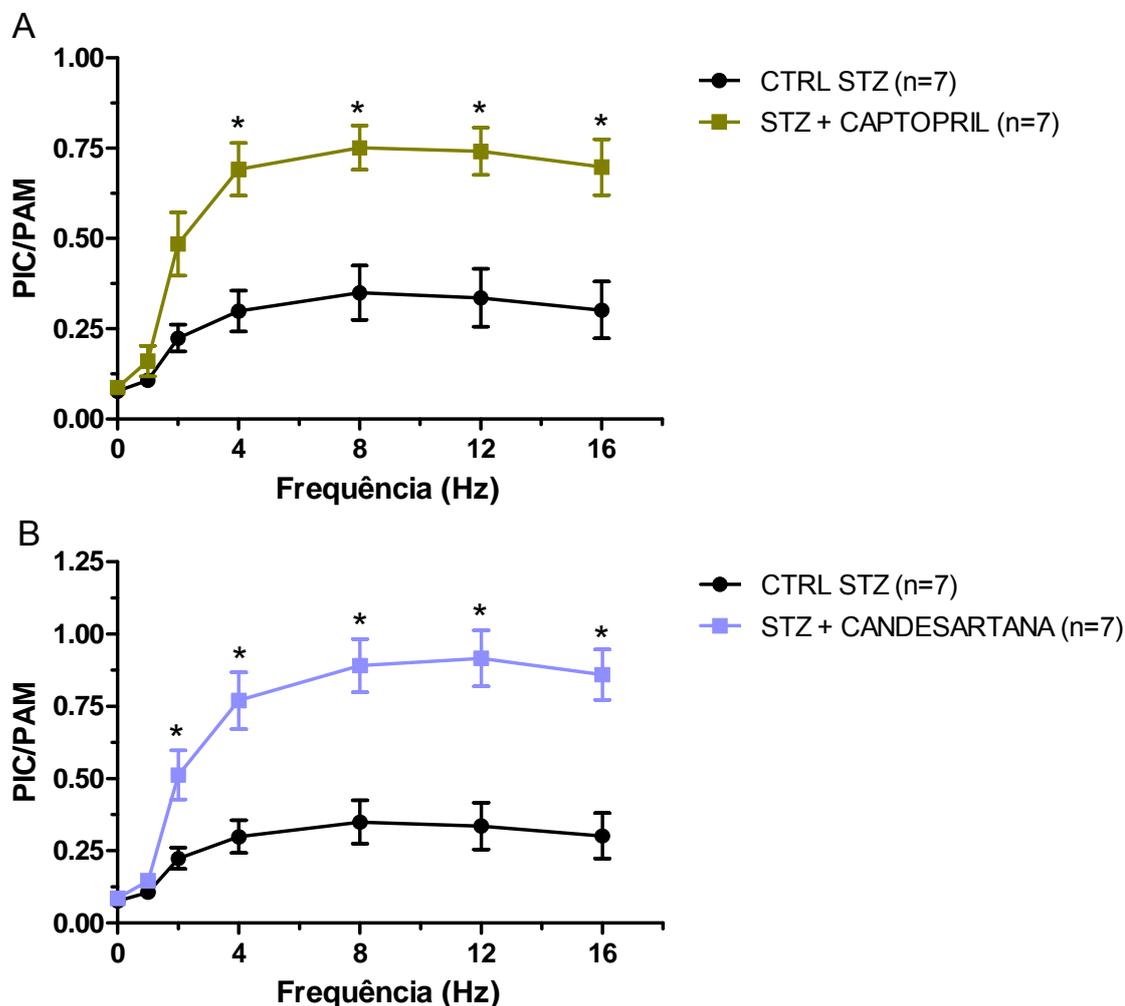
ratos diabéticos tratados com candesartana apresentaram diferença significativa na semana 0 antes do início dos tratamentos (correspondente a 8 semanas de idade), em relação aos ratos diabéticos controles (GRAF. 24B).



**Gráfico 24** – N° de ereções induzidas por apomorfina em ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) e ratos com diabetes induzida por STZ tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A) e tratados com candesartana (2mg/kg/dia) (B), acompanhados durante 8 semanas. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM e (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao controle diabético (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

No modelo de ereção em ratos anestesiados, o tratamento do grupo diabético com captopril promoveu um aumento significativo do índice de ereção, a partir da frequência de 4 Hz, em relação ao grupo diabético controle (GRAF. 25A). No grupo diabético tratado com candesartana, foi observado um aumento significativo do

índice de ereção a partir da frequência de 2 Hz, em relação ao grupo diabético controle (GRAF. 25B).



**Gráfico 25** – Índice representativo da ereção (razão entre pressão intracavernosa e pressão arterial média – PIC/PAM) de ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) (CTRL STZ) e ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) tratados com captopril (25 mg/kg/dia) (A), e ratos com diabetes induzida por STZ (40mg/kg) tratados com candesartana (2 mg/kg/dia) (B), induzida por estimulação ganglionar numa tensão fixa (4 V), com frequências crescentes (0-16 Hz). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM, (\*) representa diferença significativa ( $p < 0.05$ ) em relação ao diabético controle (one-way ANOVA com comparação pós-teste de BONFERRONI). Legenda: CTRL = controle.

## 5 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) regula a ereção peniana através da manutenção do tônus cavernosal e promoção de detumescência peniana via ação da ANG II em receptores ( $AT_1$ ) (BECKER e cols., 2001). No entanto, outros peptídeos do SRA, incluindo o vasodilatador ANG-(1-7), são liberados no corpo cavernoso (KIFOR e cols., 1997).

Estudos prévios demonstraram que as células endoteliais são capazes de sintetizar ANG-(1-7) a partir de seus precursores ANG I e ANG II, por expressarem as enzimas conversoras requeridas para tal (SANTOS e cols., 1992). Muita atenção tem sido dada com relação à formação deste peptídeo através da hidrólise da ANG II pela isoforma 2 da ECA (ECA2) (OUDIT e cols., 2003) pela sua importante ação na facilitação da ereção, principalmente pelo mecanismo de relaxamento promovido pelo óxido nítrico (NO) (KANDEEL e cols., 2001).

A produção excessiva de ANG II tem sido associada ao desenvolvimento da disfunção erétil (BECKER e cols., 2001). Dessa forma, utilizando-se fármacos que reduzam a formação ou a ação da ANG II e, simultaneamente, aumentem a síntese da ANG-(1-7), espera-se que haja uma melhora na resposta erétil, em especial, em animais que apresentam uma disfunção erétil já caracterizada, como modelos de hipertensão e diabetes. Em animais, o fato de a inibição da ECA e o bloqueio dos receptores  $AT_1$  melhorarem a função erétil demonstra os efeitos patológicos da ANG II. Tratamentos realizados com o inibidor da ECA, captopril, reverteram parcialmente a DE e a hipertensão arterial de ratos espontaneamente hipertensos com tendência a acidente vascular cerebral (SHRSP) (DORRANCE e cols., 2002). Ainda, estudos têm demonstrado que o enalapril reduz significativamente a resistência vascular em leitos vasculares penianos isolados (HALE e cols., 2001). O tratamento com o bloqueador dos receptores  $AT_1$ , candesartana, não somente reduziu a pressão sanguínea como também preveniu as alterações morfológicas adversas no tecido peniano de SHR (TOBLLI e cols., 2004).

O tratamento com candesartana e enalapril foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica de ratos controles (GRAF. 1A) e ratos com hipertensão induzida por L-NAME (GRAF. 2 e 3).

No modelo de ereção induzido pela administração subcutânea de apomorfina, não foi observada alteração significativa no número de ereções, durante as 4 semanas de acompanhamento, nos grupos controles, tratados com candesartana ou tratados com enalapril (GRAF. 4). Esses resultados condizem com o esperado, visto que nesses 3 grupos a função erétil permanece preservada, sendo que os animais não apresentam disfunção erétil estabelecida. Quanto aos ratos com hipertensão induzida pelo L-NAME (GRAF. 5A), houve uma pequena redução no número de ereções, a partir da 12<sup>a</sup> semana de idade, comparados ao grupo controle, mas essa diferença não foi significativa para o número de animais observados. O tratamento com enalapril ou candesartana não melhorou o número de ereções nos animais com hipertensão induzida pelo L-NAME. Assim, a inibição da síntese de NO promovida pelo L-NAME prejudica a função erétil de tal forma que os tratamentos realizados com o inibidor da ECA (enalapril) e com bloqueador dos receptores AT<sub>1</sub> para ANG II (candesartana) não foram capazes de reverter a disfunção erétil instalada.

Ao contrário do que se esperava, o tratamento com enalapril na dose de 30 mg/Kg/dia reduziu o índice de ereção observado no modelo de estudo da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados (avaliado através do aumento da razão PIC/PAM, por estímulo do GPM), quando comparado ao índice observado para os ratos controles (GRAF. 6).

Por outro lado, inibidores da ECA que apresentam o grupo sulfidril, como o captopril, não somente promovem um aumento da vasodilatação dependente de endotélio, via potencialização da bradicinina, como também através da prevenção da inativação do NO por espécies reativas de oxigênio (ERO) (CREAGER & RODDY, 1994). Essa última propriedade não é atribuída ao enalapril, o qual não contém o grupo sulfidril em sua estrutura molecular (GOLDSCHMIDT & TALLARIDA, 1991). Essa diferença estrutural poderia explicar em parte as diferenças com relação à ereção observadas em ratos tratados com enalapril ou captopril.

Nos grupos de ratos hipertensos L-NAME, foi observada uma redução significativa do índice de ereção (razão PIC/PAM), demonstrando ser este um modelo crônico de disfunção erétil (GRAF. 7 e 8). Por outro lado, o tratamento desses ratos hipertensos com o enalapril e candesartana não foi capaz de reverter a disfunção erétil estabelecida pela inibição da síntese de NO. Isto pode ser facilmente explicado pelo fato de ser a via de relaxamento da musculatura lisa cavernosal dependente do mecanismo induzido pelo NO e também ser este o mecanismo pelo qual a ANG-(1-7) promove a facilitação da ereção peniana. Burnett e cols. (1992) demonstraram que, em ratos anestesiados, uma estimulação elétrica do nervo cavernoso promove ereção peniana por aumento da pressão intracavernosa e esta resposta foi dose-dependentemente inibida por inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), sugerindo ser o NO um importante mediador da ereção peniana.

O modelo de hipertensão DOCA-sal em ratos é caracterizado por uma disfunção endotelial, principalmente associada a um aumento na produção de ERO, como íons superóxido e peróxido de hidrogênio (TAKIMOTO & KASS, 2007). Pelo fato de o enalapril não prevenir a inativação do NO, principal fator relacionado com o relaxamento da musculatura lisa cavernosal e, conseqüentemente, um facilitador do processo de ereção peniana, foi feita a substituição pelo captopril, visto suas propriedades antioxidantes já descritas (CREAGER & RODDY, 1994; MASTAN e cols., 2011).

Os ratos tratados com captopril ou candesartana apresentaram uma redução significativa da pressão arterial sistólica, a partir da 10<sup>a</sup> semana, em relação aos ratos controles, conforme demonstrado no Gráfico 9.

Os ratos controles DOCA-sal apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistólica, em relação aos ratos submetidos à cirurgia fictícia, sham (GRAF. 10), confirmando o modelo de hipertensão.

Os ratos hipertensos DOCA-sal tratados com captopril ou candesartana apresentaram uma redução da pressão arterial sistólica na 4<sup>a</sup> semana de tratamento (GRAF. 11), demonstrando o potencial antihipertensivo desses fármacos.

Com relação ao modelo de estudo da ereção em ratos conscientes, foi observada uma redução no número de ereções nos ratos tratados com captopril, na semana 0 (8ª semana de idade), em relação aos ratos controles (GRAF. 12). Tal queda refere-se à variabilidade própria deste grupo, visto que a semana 0 corresponde à semana inicial de acompanhamento dos animais, não caracterizando uma relação direta com a administração do captopril.

Nos grupos sham, hipertensos DOCA-sal com ou sem tratamento com captopril ou candesartana, não foram observadas diferenças significativas com relação ao número de ereções induzidas por apomorfina. Tal fato é inesperado e não pode ser facilmente justificado, uma vez que a indução da ereção peniana, mesmo que iniciada pela ativação de receptores dopaminérgicos no núcleo paraventricular pela apomorfina (MEHTA e cols., 2008), também depende da integridade dos sistemas geradores de NO (neuronal e endotelial) nos tecidos cavernosos penianos que estariam comprometidos na hipertensão e diabetes. Assim, conforme demonstrado neste estudo, o modelo de avaliação da ereção em ratos conscientes não foi de grande valia para se determinar a importância das manobras que facilitam a produção da ANG-(1-7) no tratamento da DE associada à hipertensão e diabetes.

Nos ratos hipertensos DOCA-sal foi demonstrada uma redução significativa do índice de ereção (razão PIC/PAM), em relação aos ratos sham (GRAF.15), caracterizando a disfunção na produção e liberação de NO endotelial e/ou neuronal no tecido peniano.

Seguindo-se, portanto, a manipulação farmacológica, por meio do uso de captopril e ou candesartana que, respectivamente, diminuem a formação e ação da ANG II (DORRANCE e cols., 2002) e, conseqüentemente, aumentam a formação da ANG-(1-7) no tecido peniano, foi observado um aumento significativo no índice de ereção dos grupos DOCA-sal hipertensos tratados com captopril e candesartana, em relação aos ratos hipertensos DOCA-sal (GRAF. 16).

Nos ratos com diabetes induzida por estreptozotocina acompanhados durante 4 semanas, foi observado um aumento significativo na pressão arterial sistólica, em

relação aos ratos controles, nas semanas 1 e 4 após o início do tratamento (GRAF. 17A). Já os ratos acompanhados durante 8 semanas, apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistólica na 2ª semana (GRAF. 17B). A diabetes é comumente associada à comorbidades, dentre elas, a hipertensão, que caracterizam fatores de risco para o aparecimento da disfunção erétil (MALAVIGE e cols., 2009).

Comparando-se os ratos com diabetes induzida por STZ, acompanhados durante 4 semanas, foi observado um aumento no número de ereções, em relação aos ratos controles (GRAF. 18A), na semana 12. Já nos ratos com diabetes induzida por STZ, acompanhados durante 8 semanas, foi demonstrada uma redução no número de ereções na semana 16, em relação aos ratos controles (GRAF. 18B). Tal resultado pode ser justificado pelo fato de o período de 4 semanas de diabetes induzida por estreptozotocina não ter sido suficiente para se estabelecer um dano na produção de NO a partir das terminações nervosas e células endoteliais dos tecidos penianos, sem comprometimento, portanto, da função erétil. Assim, foram acompanhados ratos com diabetes induzida por estreptozotocina durante um período de 8 semanas para confirmar se, durante um período maior de diabetes instalada, poderia ser observado o aparecimento de uma disfunção erétil, decorrente de uma disfunção na produção do NO, hipótese essa confirmada. Na verdade, vários estudos que utilizam modelos de diabetes induzida por STZ demonstram um acompanhamento superior a 4 semanas, para que os danos vasculares provenientes da diabetes sejam instalados (TRONCHINI e cols., 2010; BIVALACQUA e cols., 2004).

Da mesma forma, esses animais acompanhados por 4 semanas, não apresentaram nenhuma alteração significativa no índice de ereção induzida por estimulação ganglionar em relação aos ratos controles (GRAF. 19A). Assim, foram acompanhados ratos com diabetes induzida por estreptozotocina durante um período de 8 semanas para confirmar se, durante um período maior de diabetes instalada, poderia ser observado o aparecimento de uma disfunção erétil, decorrente de uma disfunção na produção do NO. Nesses animais, como discutido anteriormente, foi observada uma redução significativa no índice de ereção (estimado pela razão PIC/PAM) quando comparados com os índices observados para os ratos controles (GRÁF. 19B) e com os ratos diabéticos acompanhados

durante 4 semanas. Tais resultados indicam que o modelo de diabetes crônica (8 semanas) induzida por STZ é um modelo adequado para o estudo da disfunção erétil em animais hiperglicêmicos.

Os ratos controles tratados com captopril apresentaram uma redução significativa da pressão arterial sistólica na 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas após o início do tratamento, em relação aos ratos controles (GRAF. 20A), ambos acompanhados durante o período de 8 semanas. Já no tratamento com candesartana, não foi observada uma redução significativa na pressão arterial sistólica, em relação aos ratos controles (GRAF. 20B).

No modelo de ereção em ratos conscientes, o tratamento com captopril ou candesartana não promoveu diferença significativa quanto ao número de ereções. Tais resultados condizem com o esperado, visto que nesses 3 grupos a função erétil permanece preservada.

Na determinação do índice de ereção em modelos de ratos anestesiados, o tratamento com captopril aumentou significativamente a razão PIC/PAM, a partir da frequência de 8 Hz, como demonstrado no Gráfico 22A. Já o tratamento com candesartana manteve os índices de ereção semelhantes aos dos ratos controles (GRAF. 22B).

Na determinação da pressão arterial sistólica, os ratos diabéticos tratados com captopril e tratados com candesartana apresentaram, respectivamente, uma redução na pressão arterial sistólica nas semanas 10, 11,12 e 10, 11 e 16 (GRAF. 23), comparados aos ratos diabéticos controles.

O tratamento dos ratos diabéticos com captopril ou candesartana promoveu, de maneira geral, uma redução da pressão arterial sistólica ao longo das 8 semanas avaliadas. Esses achados confirmam dados da literatura que mostram a eficácia de iECA ou BRAs no controle da pressão arterial de pacientes diabéticos, principalmente devido ao seu efeito protetor renal (KAPLAN, 2001<sub>a,b</sub>). Ainda, estudos demonstram que a inibição do SRA por esses agentes podem reduzir

significativamente a incidência de diabetes mellitus tipo 2 em pacientes com hipertensão arterial (PADWAL & LAUPACIS, 2004).

O tratamento dos ratos diabéticos com captopril não promoveu diferença significativa no número de ereções induzidas por apomorfina, em relação aos ratos diabéticos controles (GRAF. 24A). Os ratos nos quais a diabetes seria induzida por STZ e receberiam tratamento com candesartana apresentaram um número de ereções significativamente maior que o observado para os ratos que seriam usados como diabéticos controles sem tratamento (GRAF. 24B). Seguindo-se o mesmo raciocínio descrito anteriormente, tais resultados não podem ser facilmente justificados e colocam em questão a validade desse modelo em nosso estudo.

O tratamento dos ratos diabéticos com captopril ou candesartana apresentaram um aumento do índice de ereção (aumento da razão PIC/PAM induzida por estimulação ganglionar), em relação aos ratos diabéticos controles (GRAF. 25), demonstrando, mais uma vez, que a utilização de fármacos que reduzem a formação e ação da ANG II e, conseqüentemente, aumentam a formação da ANG-(1-7), favorecem a ereção peniana.

## 6 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste estudo nos permite estabelecer que os tratamentos com candesartana ou enalapril foram eficazes para produzir uma melhora na hipertensão desenvolvida nos ratos por indução por L-NAME. Por outro lado, o tratamento com enalapril na dose de 30 mg/Kg/dia reduziu a razão PIC/PAM quando comparados aos animais controles. Estudos adicionais envolvendo doses menores ou outros representantes da classe dos inibidores da ECA podem ser necessários para se estabelecer se existe melhora da função erétil entre esses agentes.

Com relação à razão PIC/PAM, foi observado que o modelo de hipertensão induzido por L-NAME na dose de 25 mg/Kg/dia não é um modelo ideal para se estudar a função erétil desses animais, visto que sua ação inibitória não específica da enzima óxido nítrico sintase (NOS) prejudica tanto a formação de NO de terminações nervosas (NO sintase neuronal – nNOS) quanto NO endotelial (NO sintase endotelial – eNOS). Fato este também demonstrado durante o acompanhamento do número de ereções em ratos acordados, onde não foi observada uma melhora significativa na função erétil dos ratos com hipertensão induzida por L-NAME, após o tratamento com os mesmos fármacos. Dessa forma, o tratamento desses animais com candesartana ou enalapril não foi capaz de reverter a disfunção erétil estabelecida, uma vez que o seu mecanismo de ação na melhora da função erétil é dependente da formação de NO. Por esta razão, foi utilizado um segundo modelo de hipertensão, hipertensão DOCA-sal, onde foi comprovada a eficácia desses agentes em melhorar a disfunção erétil estabelecida nesses animais. Da mesma forma, os tratamentos com candesartana ou captopril foram eficazes para produzir uma melhora na hipertensão arterial desenvolvida.

Nos animais com diabetes induzida por estreptozotocina, foi observada a necessidade de um acompanhamento durante um período superior ao de 4 semanas para se confirmar o estabelecimento de uma disfunção erétil e, assim, obtermos um modelo de ratos diabéticos com prejuízo dessa função. Fato este que foi comprovado quando realizado o acompanhamento durante o período de 8

semanas, onde foi observada uma redução do índice de ereção (avaliado através da razão PIC/PAM), em relação aos ratos controles e diabéticos acompanhados durante 4 semanas, bem como uma redução no número de ereções na 16ª semana de idade desses animais. Com relação à pressão arterial sistólica, os ratos diabéticos acompanhados durante 8 semanas apresentaram uma leve hipertensão, quando comparados aos ratos controles. Hipertensão esta revertida pelo tratamento desses ratos diabéticos com captopril ou candesartana. No modelo de ereção em ratos anestesiados, mais uma vez foi demonstrada a eficácia desses fármacos em melhorar os índices de ereção, determinados pela razão PIC/PAM.

Nossos dados sugerem que a utilização crônica de captopril ou candesartana, manobras que sabidamente aumentam os níveis circulantes de ANG-(1-7), apresentam um potencial no tratamento da disfunção erétil de pacientes hipertensos e/ou diabéticos.

## REFERÊNCIAS

- AYTAC, I.A., MCKINLAY, J.B. & KRANE, R.J. (1999). The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences, *Brit J Urol International*, 84, 50-56.
- BASU, A. & RYDER, R.E. (2004). New treatment options for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Drugs*, 64, 2667-2688.
- BECKER, A.J., UCKERT, S., STIEF, C.G., TRUSS, M.C., MACHTENS, S., SCHELLER, F., KNAPP, W.H., HARTMANN, U. & JONAS, U. (2001). Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology*, 57, 193-198.
- BECKER, A.J., UCKERT, S., STIEF, C.G., SCHELLER, F., KNAPP, W.H., HARTMANN, U. & JONAS, U. (2001). 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, 805-810.
- BIVALACQUA, T. J., CHAMPION, H. C., HELLSTROM, W. J. G. & KADOWITZ, P. J. (2000). Pharmacotherapy for erectile dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 484-489.
- BIVALACQUA, T. J., USTA, M. F., CHAMPION, H. C., LEUNGWATTANAKIJ, S., DABISCH, P. A., MCNAMARA, D. B., KADOWITZ, P. J. & HELLSTROM, W. J. G. (2004). Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int J Imp Res*, 16, 21-29.
- BURCHARDT, M., BURCHARDT, T., BAER, L., KISS, A. J., PAWAR, R. V., *et al.* (2000). Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol*, 164, 1188-1191.
- BURNETT, A. L., LOWENSTEIN, C. J., BREDT, D. S., CHANG, T. S. K. & SNYDER, S. H. (1992). Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, 257, 401-403.
- CREAGER, M. A. & RODDY, M. A. (1994). Effect of captopril and enalapril on endothelial function in hypertensive patients. *Hypertension*, 24, 499-505.
- DAVIES, K.P. & MELMAN, A. (2008). Markers of erectile dysfunction. *Indian J Urol*, 24, 320-328.
- DE TEJADA, I.S., GOLDSTEIN, I. & KRANE, R. J. (1988). Local control of penile erection. Nerves, smooth muscle, and endothelium. *Urol Clin North Am*, 15, 9-15.
- DE TEJADA, I.S. (2004). Therapeutic strategies for optimizing PDE-5 inhibitor therapy in patients with erectile dysfunction considered difficult or challenging to treat. *Int J Impot Res*, 16 Suppl 1, 40-42.

- DEAN, R.C., LUE, T.F. (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin N Am*, 32, 379-395.
- DORRANCE, A.M., LEWIS, R.W. & MILLS, T.M. (2002). Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res*, 14, 494-497.
- FELDMAN, H. A., GOLDSTEIN, I., HATZICHRISTOU, D. G., KRANE, R. J. & MCKINLAY, J. B. (1994). Impotence and its medical and psychosocial correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 151, 54-61.
- GOLDSCHMIDT, J. E. & TALLARIDA, R. J. (1991). Pharmacological evidence that captopril possesses an endothelium-mediated component of vasodilation: effect of sulfhydryl groups on endothelium-derived relaxing factors. *J Pharmacol Exp Ther*, 257, 1136-1145.
- GOLDSTEIN, I., LUE, T. F., PADMA-NATHAN, H., ROSEN, R. C., STEERS, W. D. & WICKER, P. A. (1998). Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N Engl J Med*, 338, 1397-1404.
- GRAY, D.J. Região Perineal e Órgãos Genitais Externos. In: GARDNER, E., GRAY, D. J., RAHILLY, R. Anatomia. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1988. cap.47 p. 485-495.
- GUAY, A.T. (2007). ED2: erectile dysfunction = endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 36, 453-463.
- HAKIM, L. S. & GOLDSTEIN, I. (1996). Diabetic sexual dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25, 379-400.
- HALE, T.M., OKABE, H., HEATON, J.P. & ADAMS, M.A. (2001). Antihypertensive drugs induce structural remodeling of the penile vasculature. *J Urol*, 166, 739-745.
- HATZIMOURATIDIS, K. & HATZICHRISTOU, D.G. (2005). A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient? *Drugs*, 65, 1621-1650.
- HATZIMOURATIDIS, K. & HATZICHRISTOU, D.G. (2008). Looking to the future for erectile dysfunction therapies. *Drugs*, 68, 231-250.
- HEITSCH, H., BROVKOVYCH, S., MALINSKI, T. & WIEMER, G. (2001). Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*, 37, 72-76.
- IYER, S.N., FERRARIO, C.M. & CHAPPELL, M.C. (1998). Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 31, 356-361.

- IUSUF, D.; HENNING, R.H.; VAN GILST, W.H. & ROKS, A.J. (2008). Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol*, 585, 303-312.
- IWAI, M. & HORIUCHI, M. (2009). Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research*, 32, 533-536.
- JACKSON, G. (2007). The importance of risk factor reduction in erectile dysfunction. *Curr Urol Rep*, 8, 463-466.
- JIN, L., LINDER, A.E., MILLS, T.M. & WEBB, R.C. (2003). Inhibition of the tonic contraction in the treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin Ther Targets*, 7, 265-276.
- JIN, L. (2009). Angiotensin II signaling and its implication in erectile dysfunction. *J Sex Med*, 6, 302-310.
- KANDEEL, F. R., KOUSSA, V. K. T. & SWERDLOFF, R. S. (2001). Male sexual function and its disorders: physiology, pathophysiology, clinical investigation, and treatment. *Endocr. Rev.* 22, 342-388.
- KAPLAN, N.M. (2001) Treatment of coexisting diabetes and hypertension. *Curr Cardiol Rep.* (6):498-503.
- KAPLAN, N.M. (2001). Management of hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: guidelines based on current evidence. *Ann Intern Med.* 135(12):1079-83.
- KEARNEY, P. M., WHELTON, M., RAYNOLDS, K., MUNTNER, P., WHELTON, P. K. & HE, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, 365, 217-223.
- KEATON, A.K. & CLARK, J.T. (1998). Effects of angiotensin II on sexual function, blood pressure, and fluid intake are differentially affected by AT-1 receptor blockade. *Physiol Behav*, 64, 339-346.
- KIFOR, I., WILLIAMS, G.H., VICKERS, M.A., SULLIVAN, M.P., JOBERT, P. & DLUHY, R.G. (1997). Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J Urol*, 157, 1920-1925.
- KUCHAREWICZ, I., PAWLAK, R., MATYS, T., PAWLAK, D. & BUCZKO, W. (2002). Antithrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 40, 774-779.
- LAU, D.H., KOMMU, S., MUMTAZ, F.H., MORGAN, R.J., THOMPSON, C.S. & MIKHAILIDIS, D.P. (2006). The management of phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor failure. *Curr Vasc Pharmacol*, 4, 89-93.

- LLISTERRI, J.L., LOZANO-VIDAL, J.V., AZNAR-VICENTE, J., ARGAYA-ROCA, M., POL-BRAVO, C., SANCHES-ZAMORANO, M.A. & FERRARIO, C.M. (2001). Sexual dysfunction in hypertensive patients treated with losartan. *Am J Med Sci*, 321, 336-341.
- MAIA, L.G., RAMOS, M.C., FERNANDES, L., DE CARVALHO, M.H., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. & SOUZA DOS SANTOS, R.A. (2004). Angiotensin-(1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43, 685-691.
- MALAVIGE, L. S. & LEVY, J. C. (2009). Erectile dysfunction in diabetes mellitus. *J Sex Med*, 6, 1232-1247.
- MANCIA, G., DE BACKER, G., DOMINICZAK, A., CIFKOVA, R., FAGARD, R., GERMANO, G. *et al.* (2007). ESH-ESC Practice guidelines for the management of arterial hypertension: ESH-ESC task force on the management of arterial hypertension. *J Hypertens*, 25, 1751–1762.
- MANOLIS, A. & DOUMAS, M. (2008). Sexual dysfunction: the “prima ballerina” of hypertension-related quality-of-life complications. *Journal of Hypertension*, 26, 2074-2084.
- MASTAN, R. Y., APARNA, L. I. & SAROJA, M. (2011). Effect of ACE inhibitors on antioxidant status in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian J Pharm Clin Res*, 4, 134-137.
- MASTERS, W. & JOHNSON, V. Human sexual response. Boston: Little Brown; 1970.
- METHA, N. B. S., SIKKA, S. & RAJASEKARAN, M. (2008). Rats as an animal model for male erectile function evaluation in sexual medicine research. *J Sex Med*, 5, 1278-1283.
- MCMAHON, C.N., SMITH, C.J. & SHABSIGH, R. (2006). Treating erectile dysfunction when PDE5 inhibitors fail. *Bmj*, 332, 589-592.
- MOREIRA, E.D. Jr, LOBO, C.F., DIAMENT, A., NICOLOSI, A. & GLASSER, D.B. (2003). Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a population-based cohort study in Brazil. *Urology*, 61, 431-436.
- NAKAMURA, S., AVERILL, D.B., CHAPPELL, M.C., DIZ, D.I., BROSNIHAN, K.B. & FERRARIO, C.M. (2003). Angiotensin receptors contribute to blood pressure homeostasis in salt-depleted SHR. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R164-173.
- NIH Consensus Conference on Impotence (1993). NIH Consensus Development Panel on Impotence. *J Am Med Assoc*, 270, 83–90.
- OUDIT, G.Y., CRACKOWER, M.A., BACKX, P.H. & PENNINGER, J.M. (2003). The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med*, 13, 93–101.

- PADWAL R, LAUPACIS A. (2004) Antihypertensive therapy and incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 27(1):247-55.
- PINHEIRO, S.V., SIMOES E SILVA, A.C., SAMPAIO, W.O., DE PAULA, R.D., MENDES, E.P., BONTEMPO, E.D., PESQUERO, J.B., WALTHER, T., ALENINA, N., BADER, M., BLEICH, M. & SANTOS, R.A. (2004). Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, 44, 490-496.
- RHODEN, E.L., TELÖKEN, C., SOGARI, P.R. & VARGAS SOUTO, C.A. (2002). The use of the simplified International Index of Erectile Function (IIEF-5) as a diagnostic tool to study the prevalence of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 14, 245-250.
- SANTOS, R.A.S., BROSNIHAN, K. B., JACOBSEN, D. W., DICORLETO, P. E. & FERRARIO, C. M. (1992). Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*, 19, 1156 –1161.
- SANTOS, R.A.S., SIMÕES E SILVA, A.C., MARIC, C., SILVA, D.M., MACHADO, R.P., BUHR, I. *et al.* (2003). Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8258–8263.
- SANTOS, R.A.S., FERREIRA, A.J., & SIMÕES E SILVA, A.C. (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*, 93, 519–527.
- TAKIMOTO, E. & KASS, D. A. (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*, 49, 241-248.
- TELES, A.G., CARREIRA, M., ALARCÃO, V., SOCIOL, D., ARAGÜÉS, J.M., LOPES, L., MASCARENHAS, M. & COSTA, J.G. (2008). Prevalence, severity, and risk factors for erectile dysfunction in a representative sample of 3,548 portuguese men aged 40 to 69 years attending primary healthcare centers: results of the Portuguese erectile dysfunction study, *J Sex Med*, 5(6), 1317-1324.
- TOBLLI, J. E., STELLA, I., MAZZA, O. N., FERDER, L. & INSERRA, F. (2004). Candesartan cilexetil protects cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Int J Impot Res*, 16, 305–312.
- TRONCHINI, E. A., MARCILIO-NETO, M. H. & ZANONI, J. N. (2010). Vitamin e ( $\alpha$ -tocoferol) supplementation enhances nitric oxide production in penile tissue of diabetic rats. *BJU Int*, 106, 1788-1793.
- VAN DE GRAAFF. Anatomia humana. 6. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 711.
- WIEMER, G., DOBRUCKI, L.W., LOUKA, F.R., MALINSKI, T. & HEITSCH, H. (2002). AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*, 40, 847-852.

YOUSIF, M.H.M., KEHINDE, E.O. & BENTER, I.F. (2007). Different responses to Angiotensin-(1-7) aged and diabetic rabbit corpus cavernosum. *Pharmacological Research*, 56, 209-216.