

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)

POSSÍVEL INTERAÇÃO DO EIXO
“ECA2/ANG-(1-7)/RECEPTOR MAS”
COM RECEPTORES
MUSCARÍNICOS, B₂ E AT₂ NA
FUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS

Eduardo Damasceno Costa

OURO PRETO
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)

POSSÍVEL INTERAÇÃO DO EIXO
“ECA2/ANG(1-7)/RECEPTOR MAS”
COM RECEPTORES
MUSCARÍNICOS, B₂ E AT₂ NA
FUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Romulo Leite

OURO PRETO
2011

C837p

Costa, Eduardo Damasceno.

Possível interação do eixo “ECA2/ANG–(1-7)/receptor MAS” com receptores muscarínicos, B₂ e AT₂ na função erétil de ratos [manuscrito] / Eduardo Damasceno Costa – 2011.

xi, 75 f.: il. color.; grafs.

Orientador: Prof. Dr. Romulo Leite.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Disfunção erétil - Teses. 2. Sistema renina-angiotensina - Teses. 3. Membranas (Biologia) - Teses. 4. Proteínas da membrana - Teses. 5. Hipertensão - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.69:616.12-008.331.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Agradecimentos

Aos meus pais, Acílio e Izabel, de quem Deus me deu a honra de ser filho, responsáveis pela minha formação, pelo meu caráter, meus exemplos e meus maiores incentivadores. Meu amor por vocês é eterno.

Ao meu irmão Acílio e ao meu tio Ivan pela participação efetiva em toda a minha trajetória acadêmica.

Ao professor Romulo Leite pela oportunidade e por compartilhar comigo, parte da sua experiência e conhecimento.

A Kamila, Nívea e Gizele por dividirem comigo a chance de aprender um pouco sobre ciência.

A Danielle, Bruna e Mariana pela verdadeira amizade, companheirismo, ensinamentos preciosos e pela diversão.

A professora Célia Maria Correa pela amizade, ensinamentos e pela parceria.

Aos professores Homero Nogueira Guimarães e Andrea Grabe Guimarães pela contribuição efetiva para realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Ouro Preto, gratuita e de qualidade, por todos os ensinamentos.

Às instituições de apoio à pesquisa (CNPq, FAPEMIG, CAPES e Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UFOP), que proporcionaram condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas de mestrado, do laboratório de Farmacologia Experimental, aos professores e funcionários do CIPHARMA pelo convívio e auxílio.

“Tudo é possível. O impossível só leva mais tempo.”
Lema da Agência Americana de Segurança (NSA)

ÍNDICE

LISTA DE DROGAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
I-RESUMO.....	12
II-ABSTRACT.....	15
III-RELEVÂNCIA.....	18
1- OBJETIVOS	20
1.1- Objetivo Geral	21
1.2-Objetivos específicos	21
2--REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1-Mecanismos fisiológicos da ereção peniana	23
2.2-Participação do NO na ereção.....	25
2.3-O Sistema renina-angiotensina (SRA)	27
2.4- Angiotensina-(1-7)	28
2.5- Receptores da Angiotensina-(1-7).....	29
2.6- Sistema Colinérgico.....	31
2.7- Sistema Cinina Calicreina	33
2.8-Interação do eixo ECA 2/Ang (1-7)/receptor Mas e Bradicینina	35
2.9- Potencial do eixo “ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas”, dos receptores B ₂ para bradicینina, AT ₂ para angiotensina II e muscarínicos (M2 e/ou M3) para a acetilcolina na função erétil	37
3- MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1- Animais	41
3.2 - Método de avaliação da função erétil em animais conscientes.....	41
3.3- Protocolo experimental utilizado na avaliação da função erétil em modelo consciente	42
3.4- Método de avaliação do índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados	44
3.5 - Protocolo experimental utilizado na avaliação da função erétil em modelo anestesiado	45
3.6- Analise Estatística	49
5- RESULTADOS	50
5.1- Estudo da resposta erétil em ratos conscientes (modelo de ereção induzida por apomorfina).....	51
5.1.1- Efeito da administração subcutânea de Ang-(1-7) na dose de 31,5pmol/ 100g sobre a função erétil de ratos conscientes	51
5.1.2- Efeito da administração subcutânea de Ang-(1-7) na dose de 80 pmol/100g sobre a função erétil de ratos conscientes	52
5.1. 3- Efeito da administração subcutânea de sulfato de atropina sobre a função erétil de ratos conscientes	53

5.2- Estudo da resposta erétil em ratos anestesiados (modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar)	55
5.2.1- Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados	55
5.2.2- Efeito da administração intravenosa de atropina (antagonista de receptores muscarínicos) sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados.....	57
5.2.3- Efeito da administração intravenosa de atropina sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados	59
5.2.4- Efeito da administração intravenosa de PD123319 (antagonista dos receptores AT ₂) sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados.....	60
5.2.5- Efeito da administração intracavernosa de Bradicinina sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados	61
5.2.6- Efeito da infusão intracavernosa de Bradicinina sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados	62
5.2.7- Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista dos receptores B ₂ para bradicinina) sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados	63
5.2.8- Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista dos receptores B ₂ para bradicinina) sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados.....	64
6- DISCUSSÃO.....	65
7- SUMÁRIO E CONCLUSÕES	71
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE DROGAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Ácido Ascórbico	Proquimios
Acetilcolina	Sigma
Angiotensina-(1-7)	Tocris (USA)
Apomorfina	Sigma (EUA)
Bradicinina	Phoenix Pharmaceuticals (USA)
Cloreto de Potássio	Synth
Cloreto de Sódio	Proquimios
Cloridrato de Cetamina	Syntec
DMSO	Vetec
Heparina	Hipolabor
PD123319	Sigma (EUA)
Sulfato de Atropina	Sigma (EUA)
WIN64338	Tocris (USA)
Xilazina	Agener União

LISTA DE ABREVIATURAS

A-779: antagonista do receptor Mas
ACh: Acetilcolina
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico
Ang I: Angiotensina I
Ang II: Angiotensina II
Ang III: Angiotensina-(2-8)
Ang IV: Angiotensina-(3-8)
Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9): Angiotensina-(1-9)
AT₁: subtipo 1 do receptor para Angiotensina II
AT₂: subtipo 2 do receptor para Angiotensina II
AVE-0991: agonista do receptor Mas
B1- subtipo 1 do receptor de bradicinina
B2- subtipo 2 do receptor de bradicinina
BK: bradicinina
Ca²⁺: Cálcio
CCA: Centro de Ciência Animal
CEUA: Comitê de Ética para o Uso de Animais
CHO: células de ovário de hamster chinês
CHT: transportador de Colina
COS: células de rim de macaco verde africano
DE: Disfunção Erétil
dT/dt: derivada da tensão desenvolvida em função do tempo
ECA: Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2: isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina
eNOS ou NOS2: óxido nítrico sintase endotelial
GCs: guanilato ciclase solúvel
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
GPM: gânglio pélvico maior
iNOS ou NOS3: óxido nítrico sintase induzível
I.P.: intraperitoneal

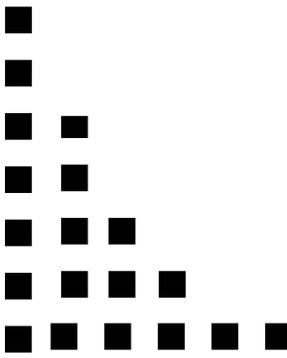
iPDE5: inibidores da fosfodiesterase do tipo 5
L-Arg: L-Arginina
Lis-BK: lisil bradicinina, calidina
mAChRs: receptores muscarínicos
Met-lis-BK: metionil-lisil-bradicinina
nAChRs: receptores nicotínicos
NaCl: cloreto de sódio
NANC: terminações nervosas não adrenérgicas e não colinérgicas
NEP: endopeptidase neutral
nNOS ou NOS1: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PAM: pressão arterial media
PCP: prolil-carboxipeptidase
PDE-5: fosfodiesterase do tipo 5
PEP: prolil-endopeptidase
PIC: pressão intracavernosa
PKG: proteína quinase dependente de GMPc
RNAm- ácido ribonucléico mensageiro
S.C.: subcutânea
SNC: Sistema nervoso central
SRA: Sistema renina angiotensina
vAChT: transportador vesicular de Acetilcolina
VIP- peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da estrutura peniana	23
Figura 2	Representação esquemática do mecanismo hemodinâmico da ereção peniana	24
Figura 3	Representação simplificada da participação do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos	26
Figura 4	Esquema ilustrando a cascata proteolítica de formação e de degradação dos principais peptídeos angiotensinérgicos biologicamente ativos	29
Figura 5	Esquema do Sistema Calicreína-Cininas	33
Figura 6	Prováveis mecanismos relacionados à interação da Ang-(1-7) com a bradicinina	36
Figura 7	Esquema do modelo usado para avaliação da função erétil em ratos conscientes	42
Figura 8	Protocolo Experimental utilizado na avaliação da resposta erétil em modelo consciente	43
Figura 9	Esquema do modelo usado de avaliação da função erétil em ratos anestesiados	45
Figura 10	Efeito da administração subcutânea de Angiotensina-(1-7) na dose de 31.5pmol/100g sobre a função erétil de animais conscientes (modelo com apomorfina)	51
Figura 11	Efeito da administração subcutânea de Angiotensina-(1-7) na dose de 80pmol/100g sobre a função erétil de animais conscientes (modelo com apomorfina)	52
Figura 12	Efeito da administração subcutânea de atropina sobre a função erétil de ratos conscientes (modelo com apomorfina)	54
Figura 13	Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados	56
Figura 14	Efeito da administração intravenosa de atropina (antagonista muscarínico) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados	58
Figura 15	Efeito da administração intravenosa de atropina sobre a	59

facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados

- Figura 16** Efeito da administração intravenosa do PD123319 (antagonista dos receptores AT₂) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar e sobre a facilitação dessa resposta mediada por Ang-(1-7) em ratos anestesiados 60
- Figura 17** Efeito da infusão intracavernosa de bradicinina sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados 61
- Figura 18** Efeito da infusão intracavernosa de bradicinina sobre a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados 62
- Figura 19** Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista de receptores B₂ para bradicinina) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados 63
- Figura 20** Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista dos receptores B₂ para a bradicinina) sobre a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados 64



I - RESUMO

A disfunção erétil é um problema mundial que interfere com a saúde física e psicossocial, prejudicando de forma significativa a auto-estima, os relacionamentos e a qualidade de vida dos pacientes e, até mesmo, de seus familiares. Apesar dos avanços trazidos pelo desenvolvimento dos inibidores da fosfodiesterase tipo-5 (iPDE5), uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na ereção peniana pode fornecer novas alternativas na terapêutica desta patologia.

No presente estudo analisamos a hipótese de que angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] potencializa a função erétil tanto em ratos anestesiados como em ratos conscientes. E ainda, que essa ação potencializadora parece envolver, além dos receptores Mas para a Ang-(1-7), outros receptores como o B₂ para bradicinina, o AT₂ para angiotensina, e os muscarínicos (M₂ e/ou M₃) para a acetilcolina, presentes nos corpos cavernosos.

Para analisar tal hipótese estudamos o efeito da Ang-(1-7) sobre a resposta erétil de ratos Wistar machos de 270-300g utilizando duas metodologias distintas: a avaliação da função erétil em ratos conscientes (modelo de ereção induzida por apomorfina) e a avaliação do índice de ereção (representado pela razão PIC/PAM) em ratos anestesiados (modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar).

Nossos resultados demonstraram que a Ang-(1-7) aumenta o índice de ereção (razão PIC/PAM) induzido por estimulação do gânglio pélvico maior (GPM) confirmando achados anteriores do laboratório (Costa-Gonçalves e cols., 2007). Também demonstramos que esse peptídeo é capaz de promover ereção por si só além de aumentar o número de ereções induzidas por estimulação central (apomorfina) em ratos conscientes.

Nós verificamos que o bloqueio de receptores muscarínicos pela atropina prejudica tanto o aumento na razão da PIC/PAM para estimulações ganglionares de alta frequência (12 Hz) em ratos anestesiados, como o número de ereções induzidas por apomorfina em ratos conscientes. A presença da atropina impede a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da resposta erétil induzida por apomorfina em ratos conscientes, mas não interfere na resposta facilitadora da Ang-(1-7) sobre a ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados.

Constatamos também que, em animais anestesiados, a resposta facilitadora da Ang-(1-7) é atenuada pela presença do bloqueador dos receptores AT₂ (PD123319).

Documentamos que a infusão intracavernosa de bradicinina diminui tanto o índice de ereção induzido por estimulação ganglionar numa situação controle, como a resposta facilitadora da Angiotensina-(1-7). Na presença de um antagonista específico dos receptores B₂ para bradicinina (WIN64338) foi verificado que a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar não foi significativamente afetada, ao passo que a facilitação dessa resposta pela Ang-(1-7) foi parcialmente atenuada.

Os dados obtidos nesse estudo demonstram que o efeito facilitador da resposta erétil induzido pela Ang-(1-7) parece envolver direta ou indiretamente a ativação dos receptores B₂ e AT₂. Nossos dados também indicam uma contribuição relevante do sistema colinérgico na resposta erétil peniana, especialmente naquela originária de estímulos centrais. Além disso, os resultados aqui apresentados sugerem que a bradicinina apresenta um efeito constritor quando infundida diretamente no corpo cavernoso de animais anestesiados. Nossos resultados confirmam o importante papel fisiológico do eixo “ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas” no processo de ereção peniana de ratos conscientes e anestesiados. Esses achados indicam um potencial terapêutico para manobras capazes de aumentar a produção da Ang-(1-7) e/ou para substâncias capazes de ativar os receptores específicos para esse peptídeo no tratamento da disfunção erétil.



II - ABSTRACT

Erectile dysfunction is a worldwide problem that affects physical and psychosocial health. It harms significantly male self-esteem, relationships and life quality of patients and their families. Despite the advances brought by the development of phosphodiesterase type-5 inhibitors (iPDE5), a better understanding of the mechanisms involved in penile erection can provide new alternatives for the treatment of this condition

In the present study we tested the hypothesis that angiotensin(1-7) [Ang- (1-7)] enhances erectile function in male anesthetized and conscious rats. Furthermore, that this potentiating response could involve the activation of other receptors such as the bradykinin type 2 (B_2), the angiotensin II subtype 2 (AT_2) and the M_2 and/or M_3 muscarinic types 2 and 3, all of them present in the corpus cavernosum.

To test these hypotheses we used male Wistar rats (270-300g) and two distinct methodologies: evaluation of erectile function in conscious rats (apomorphine-induced erection model) and evaluation of the erection index represented by the ratio of changes in ICP/MAP in anesthetized rats (ganglionic stimulation-induced erection model).

Our results demonstrated that Ang-(1-7) enhances ganglionic stimulation-induced erection in anesthetized rats (the increase in ICP/ MAP ratio) confirming previous findings of our laboratory (Costa and Goncalves et al., 2007). We also demonstrated that subcutaneous injection of Ang-(1-7), per se, causes erections as well as increases the number of erections induced by CNS dopaminergic stimulation with apomorphine in conscious rats.

We verified that muscarinic receptors blockade with atropine reduced both the ganglionic-induced erections (the increase in ICP/MAP ratio) at a high frequency of 12Hz in anesthetized animals, as well as the number of erections induced by apomorphine treatment of conscious rats. The presence of atropine impaired the potentiating effect of Ang-(1-7) on the apomorphine-induced erection model, but not on the ganglionic-induced erection model.

We documented that the intracavernosal infusion of bradykinin reduces both the ganglionic-induced ICP/MAP ratio increases (erection index) in the control situation, as well as the Ang-(1-7) potentiating effect of the erections induced by the stimulation of the major pelvic ganglia. In the presence of a specific antagonist for the bradykinin B_2 receptor (WIN64338) we observed no changes in the ganglionic

induced erectile responses. On the other hand, the facilitating response of the ganglionic stimulated erections mediated by Ang-(1-7) was partially attenuated in the presence of the B₂ receptor antagonist (WIN64338).

The data obtained in this study demonstrate that the potentiating effect of Ang-(1-7) on the erectile responses seems to involve direct or indirectly the activation of B₂ e AT₂ receptors. Our data also indicates a relevant contribution of the cholinergic system to the penile erections, especially the ones centrally originated. Additionally, the results presented here suggest that bradykinin shows a constrictor effect when directly infused into the cavernosal tissue of anesthetized rats. Our results confirm the important physiological role for the “ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor” axis in the process of penile erection. These findings indicate a potential therapeutic for approaches capable of enhancing the Ang-(1-7) production and/or for drugs capable of activating this specific peptide receptors in the treatment of erectile dysfunction.



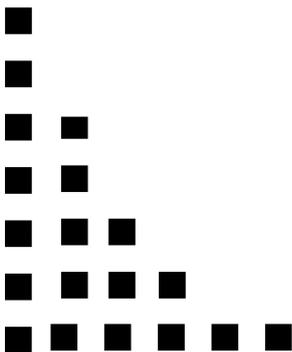
III - RELEVÂNCIA

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente ou recorrente de obter ou manter uma ereção suficiente para a atividade sexual (National Institutes of Health Consensus Statement, 1993). Estima-se que mais de 146 milhões de homens em todo mundo apresentem DE, e projeções para o ano de 2025 mostram uma prevalência superior a 322 milhões para esta patologia (Ayataç et al., 1999). O estudo da vida sexual do brasileiro realizado por Abdo e colaboradores (2006), revela que cerca de 45% da população apresenta algum grau de disfunção erétil. Essa enfermidade é comumente associada às doenças cardiovasculares, à hipertensão arterial, ao diabetes mellitus, à hipercolesterolemia, ao tabagismo, à aterosclerose e ao envelhecimento (Cirino et al., 2006; Jin et al., 2003).

Além da psicoterapia, a terapêutica oral apresenta-se como primeira linha de escolha para tratamento da DE. Entre os fármacos utilizados os inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 (iPDE5), tais como o sildenafil (Viagra®), vardenafil (Levitra®), tadalafil (Cialis®) e o lodenafil (Helleva®) (Toque et al., 2008), são aparentemente superiores aos agentes de ação central, com uso bastante restrito, como a apomorfina (agonista dopaminérgico) que não se encontra mais disponível no mercado e a ioimbina (agonista α_2 -adrenérgico).

No entanto, levantamentos clínicos recentes mostram que a farmacoterapia com iPDE5 não é efetiva em muitos casos. Aproximadamente 30-40% dos homens com DE não respondem ao tratamento com os inibidores de PDE-5, incluindo pacientes com danos neurológicos severos, diabetes mellitus ou doenças vasculares severas. Além disso, muitos pacientes desenvolvem tolerância a esses fármacos ou apresentam efeitos adversos como dor de cabeça, dispepsia, distúrbios do trato respiratório superior, vermelhidão e distúrbios epidérmicos (Basu et al., 2004; de Tejada, 2004; Hatzimouratidis et al., 2005; Lau et al., 2006; McMahon et al., 2006).

Uma melhor compreensão dos diversos mecanismos fisiológicos envolvidos na ereção peniana pode fornecer novas alternativas mais eficazes para o tratamento da DE.



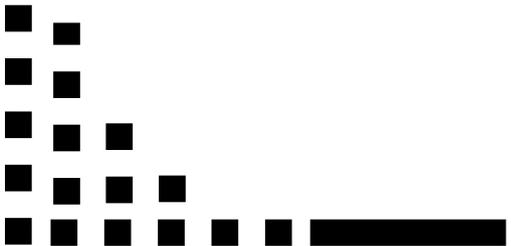
1 - OBJETIVOS

1.1 - Objetivo geral:

Testar a hipótese de que a Ang-(1-7) potencializa a função erétil de ratos e que essa resposta facilitadora da ereção envolve a ativação de receptores B₂ para bradicinina, receptores AT₂ para angiotensina, e receptores muscarínicos (M₂ e/ou M₃) para a acetilcolina, presentes nos corpos cavernosos.

1.2 - Objetivos específicos:

- Avaliar a facilitação da função erétil induzida por Ang-(1-7).
- Avaliar a participação dos receptores AT₂ para angiotensina II na facilitação da função erétil induzida por Ang-(1-7).
- Avaliar a participação dos receptores B₂ para bradicinina na facilitação da função erétil induzida por Ang-(1-7).
- Avaliar se a facilitação da resposta erétil induzida por Ang-(1-7) envolve a ativação de receptores muscarínicos no endotélio de vasos e tecido cavernoso penianos.
- Avaliar se a facilitação da resposta erétil induzida por Ang-(1-7) pode ser alterada na presença de bradicinina.



2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Mecanismos fisiológicos da ereção peniana

A ereção peniana ocorre em resposta ao relaxamento das células endoteliais presentes nos corpos cavernosos, ao aumento da circulação sanguínea do pênis e à restrição do efluxo venoso peniano (Moreland et al., 2001). O pênis é constituído por três segmentos cilíndricos: dois corpos cavernosos dorsais e o corpo esponjoso ventral, o qual envolve a uretra e forma a glânde na porção distal. Cada corpo cavernoso é envolto, pela túnica albugínea, formada principalmente por elastina e colágeno (Figura 1) (Andersson e Wagner, 1995). No interior dos corpos cavernosos existem diversos espaços lacunares através de muitas trabéculas. Essas estruturas são constituídas basicamente por músculo liso, fibras colágenas e elásticas, tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos que formam as paredes dos espaços sinusoidais. Estes espaços são irrigados por uma densa rede de arteríolas e nervos terminais que têm importância vital nos processos de ereção e flacidez (Lue, 2002).

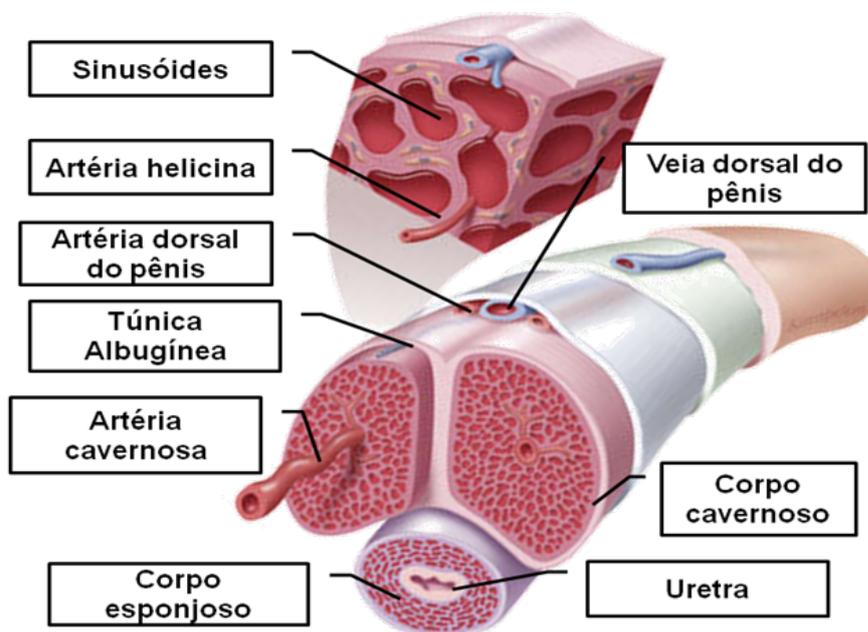


Figura 1: Representação esquemática da estrutura peniana.

No estado flácido, as arteríolas e os sinusóides encontram-se contraídos, devido principalmente, à ativação de receptores α -adrenérgicos, exercendo resistência máxima ao influxo arterial. Neste estado, o suprimento sanguíneo que adentra os corpos cavernosos tem apenas propósitos nutricionais (Figura 2) (Traish et al., 1999).

Durante o estado de excitação sexual, ocorre relaxamento muscular, influxo sanguíneo para os sinusóides e elevação gradativa da pressão nos corpos cavernosos. Esse aumento da pressão cavernosa promove ativação do mecanismo veno-oclusivo que impede a saída do sangue causando aumento ainda maior na pressão dentro dos corpos cavernosos. (Azadzoi et al., 1995; Fournier et al., 1987). À medida que a pressão aumenta observa-se a expansão da túnica albugínea, resultando no aumento da extensão e diâmetro do órgão sexual masculino, que são característicos da ereção (Fournier et al., 1987). Embora outros vasodilatadores tais como a acetilcolina (ACh) (Andersson et al., 1997; Burnett, 1995; Escrig et al., 1999; Okamura et al., 1998) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Ding et al., 1995; Hempelmann et al., 1995; Kim et al., 1995) também estejam implicados na resposta erétil, o óxido nítrico (NO) parece ser o principal estimulador da vasodilatação e da ereção peniana.

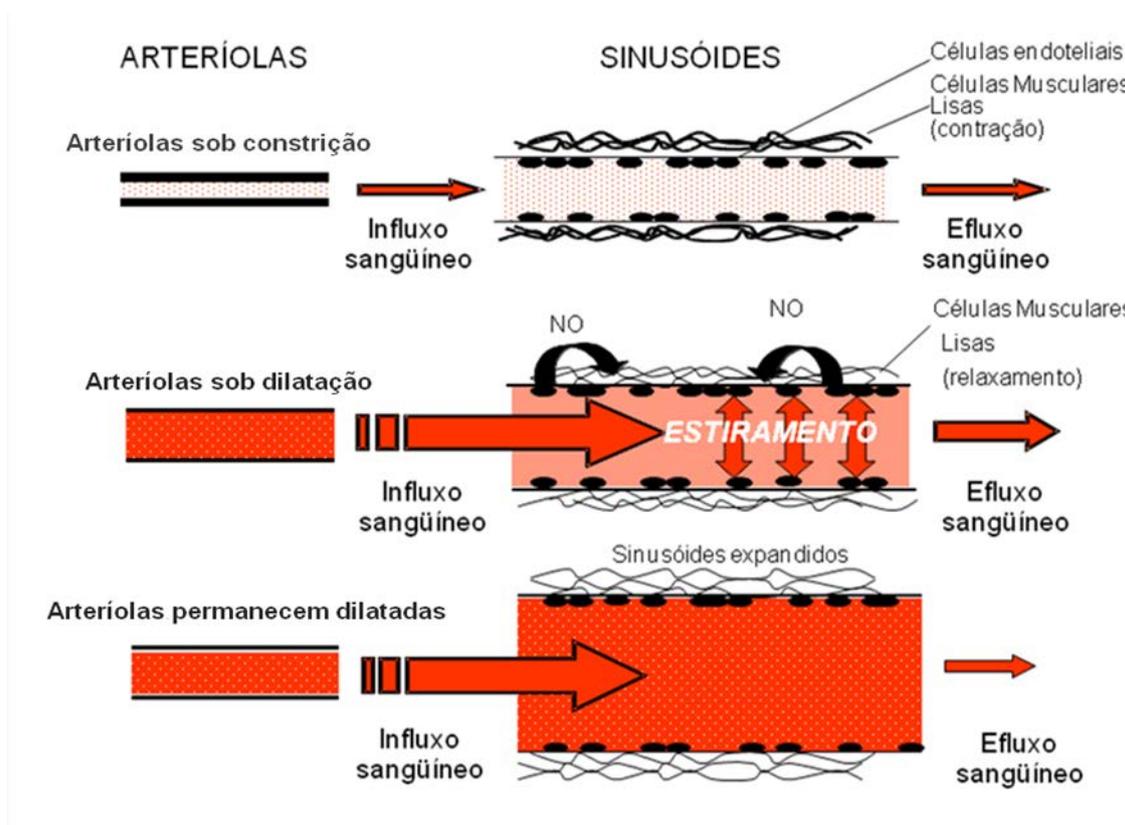


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo hemodinâmico da ereção peniana.

2.2- Participação do NO na ereção

O óxido nítrico (NO) está envolvido em uma série de funções no organismo, incluindo relaxamento do músculo liso e neurotransmissão tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto do sistema nervoso autônomo (Moncada et al., 1991; Garthwaite, 1995).

As enzimas responsáveis pela produção de NO são conhecidas como NO sintase (NOS) e são localizadas principalmente nas terminações nervosas não adrenérgicas, não colinérgicas (NANC), nas células dos sistemas imune e cardiovascular e em células endoteliais. São conhecidas três isoformas de NOS: a óxido nítrico sintase neuronal, (nNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2), e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3), cada uma sendo codificadas por genes diferentes.

Os nervos cavernosos possuem a isoforma nNOS que catalisa a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina (Kerwin et. al., 1995).

O NO liberado pelas fibras NANC ativam as guanilato ciclases solúveis (GCs) presentes no músculo liso das artérias e do tecido cavernoso, levando ao aumento da formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Esse aumento de GMPc provoca ativação da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que causa diminuição da concentração citosólica de cálcio (Ca^{2+}) e consequente relaxamento do músculo liso vascular e cavernosal, levando à ereção peniana (Figura 3) (Cellek e Moncada, 1997). O GMPc afeta a $[Ca^{2+}]$ por quatro vias diferentes: redução da entrada e aumento de saída de Ca^{2+} ; ativação da bomba Ca^{2+} ATPase e trocas de Na^+/Ca^{2+} ; aumento de sequestro de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS) e diminuição na mobilidade de Ca^{2+} através da inibição do receptor IP3 (trifosfato de inositol) no retículo sarcoplasmático. No pênis o GMPc é rapidamente inativado pelas fosfodiesterases do tipo 5 (PDE-5) facilitando o processo de detumescência e a volta ao estado de flacidez peniana (Turko et.al., 1999). Além das fibras NANC a acetilcolina (ACh), assim como outros neurotransmissores, é capaz de induzir a liberação de NO endotelial nos corpos cavernosos por meio da indução do aumento transitório da entrada de Ca^{2+} nas células endoteliais. O Ca^{2+} estimula a produção

de NO via eNOS promovendo o relaxamento das células musculares lisas e a ereção peniana. (Knispel et al.,1991).

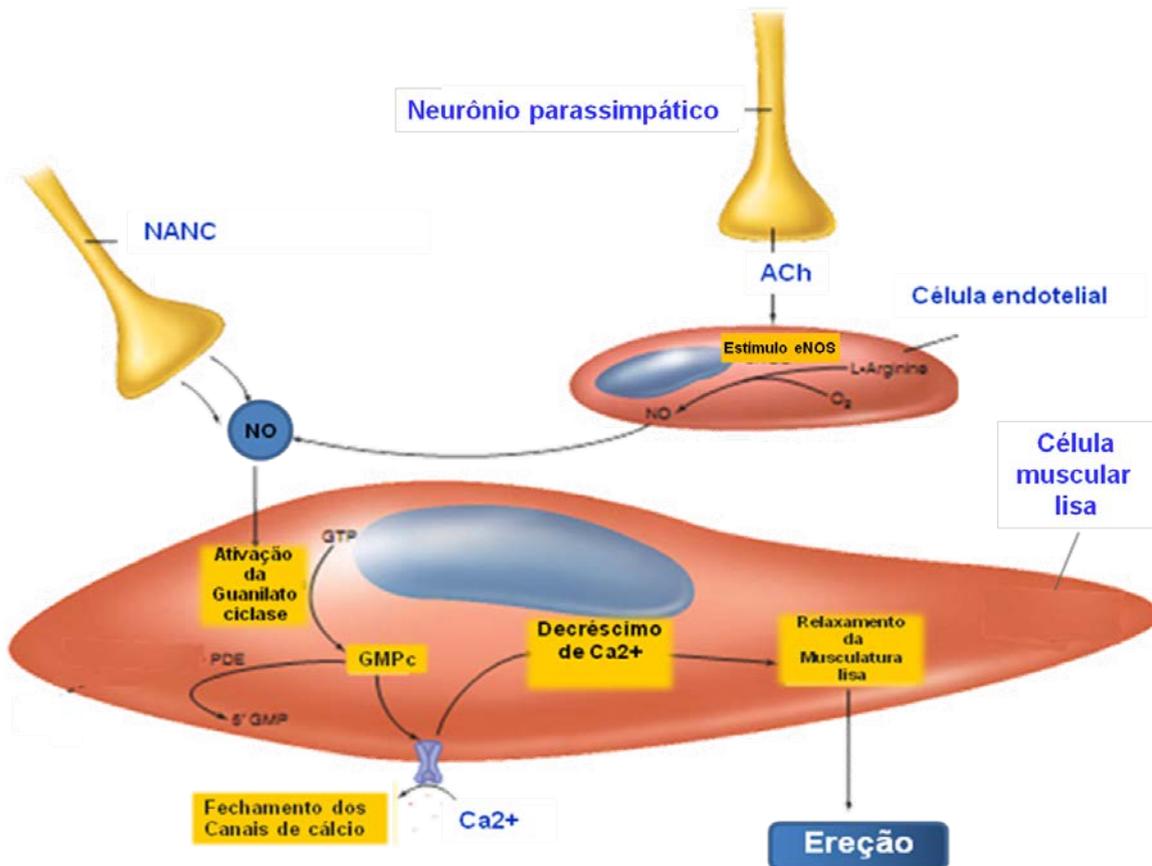


Figura 3: Representação simplificada da participação do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos.

Estudos realizados em camundongos desprovidos de NOS neuronal demonstram que esses animais ainda apresentam função erétil suficiente para copulação e reprodução (Burnett et al., 2002; Burnett et al., 1996; Cashen et al., 2002). Tais resultados contradizem a idéia de que a fonte primária de NO envolvido na ereção seja devido a um aumento na atividade apenas dessa isoforma e sugere que mecanismos compensatórios nitrérgicos ou não nitrérgicos mantêm a função erétil na ausência dessa enzima (Giuliano et al., 1995; Gonzalez-Cadavid et al., 1999). O envolvimento da NOS endotelial na função erétil normal ainda não está bem esclarecido. O relaxamento de corpo cavernoso humano induzido por estimulação elétrica não requer a presença de endotélio funcional (Sezen et al., 2000); no entanto, esta isoforma endotelial também está presente na célula

endotelial dos sinusóides (Podlasek et al., 2001; Rajasekaran et al., 1998), e estaria relacionada na ereção peniana. Contudo, camundongos desprovidos da NOS endotelial mantêm a função erétil com base em mecanismos não colinérgicos, porém dependentes de NO e apresentam função reprodutiva adequada (Burnett et al., 2002). Estudos conduzidos por Nangle e colaboradores (2004) mostraram que o relaxamento induzido por estimulação de campo elétrico em músculo liso de tecido cavernoso de camundongos *knock-out* para NOS neuronal foi inibido em cerca de 77%, quando comparado ao observado em animais controles, e que o relaxamento remanescente não era afetado por inibidores da NOS. Esses autores também mostraram que os tecidos cavernosos dos animais *knock-out* para NOS endotelial apresentavam relaxamento total frente à estimulação elétrica, sendo que esse relaxamento era abolido por inibidores da NOS.

2.3 - O Sistema renina-angiotensina (SRA)

Classicamente, o sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema peptídico que envolve a formação do octapeptídeo Angiotensina II (Ang II). A sua produção envolve o angiotensinogênio, uma alfa-globulina sintetizada no fígado, que sofre proteólise sequencial e controlada sendo convertido no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) pela ação da enzima renina. Posteriormente, a enzima conversora de angiotensina (ECA) cliva a Ang I resultando na formação da Ang II (Figura 4). Este octapeptídeo é um regulador importante do balanço de sódio, do crescimento celular e do remodelamento cardiovascular e do controle do tônus vascular.

A Ang II foi considerada por muitos anos o mediador único do SRA (Sigmund, 2001). Entretanto, essa visão clássica do SRA vem sofrendo alterações conceituais importantes nas últimas décadas (Campbell, 2003; Carey et al., 2003; Reudelhuber, 2005; Santos et al., 2000; Schmaier, 2003). Atualmente o SRA é visto como o principal sistema regulador da pressão arterial basal, sendo composto por peptídeos vasoativos com ações contra-regulatórias que envolvem a participação de vários hormônios efetores. Inúmeros estudos revelaram que a Ang II pode ser sintetizada a partir de angiotensinogênio ou da Ang I através de vias independentes da renina e da ECA, além do que tanto a Ang I quanto a Ang II podem ser convertidas em pequenos fragmentos de angiotensina que apresentam atividade biológica como a

Angiotensina III, Angiotensina IV, e Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (Ferrario et al., 1997; Santos et al., 2000). Muitos trabalhos demonstram que a Ang-(1-7), na maioria das vezes, exerce ações antagônicas às aquelas observadas para Ang II, indicando que o SRA é um sistema auto-regulável através da formação de peptídeos com ações opostas (Ferrario et al., 1997, Ferrario et al., 1997; Santos et al., 2000, Santos et al., 2003). Além disso, a identificação da ECA2, a isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina, que forma Ang-(1-7) a partir de Ang II (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000; Vickers et al., 2002), e do receptor para a Ang-(1-7), o receptor Mas, forneceram elementos importantes para um melhor entendimento das ações do SRA (Santos et al., 2003).

2.4 - Angiotensina (1-7)

A Ang-(1-7) é um heptapeptídeo biologicamente ativo. E age como importante produto vasoativo sendo formada por duas vias principais: uma em que a Ang-(1-7) é gerada diretamente a partir da Ang I pela hidrólise da ligação Pro7–Pro8 na porção C-terminal do peptídeo e outra em que ela é formada pela hidrólise da Ang II, via ação da mono-peptidase ECA2 (Figura 4). A formação de Ang-(1-7) a partir de Ang I pela endopeptidase neutra (EC 3.4.24.11; NEP), prolil-endopeptidase (EC 3.4.21.26; PEP), assim como a prolil-carboxipeptidase (EC 3.4.24.15; PCP), parece ser específica em diferentes sítios, sendo que a NEP seria primariamente responsável pela produção de Ang-(1-7) na circulação e no endotélio vascular, enquanto as duas vias enzimáticas alternativas seriam mais ativas em regiões como o cérebro, os rins, e o músculo liso (Ferrario et al., 2004; Welches et al., 1993; Welches et al., 1991; Yamamoto et al., 1992). A outra via desse eixo, que gera Ang-(1-7) pela hidrólise da Ang II via ECA2, uma enzima homóloga à ECA e membro da família M2 gluzincina (Donoghue et al., 2000; Turner et al., 2002), proporciona uma conexão entre os dois ramos ativos do SRA através da regulação da disponibilidade de Ang II e formação de Ang-(1-7). Na verdade, tanto a ECA quanto a ECA2 podem representar o ponto de conversão no qual o efeito biológico observado em função das ações opostas da Ang II e Ang-(1-7) é regulado, uma vez que a ECA metaboliza a Ang-(1-7) em Angiotensina-(1-5), enquanto a ECA2 é capaz de hidrolisar a Ang II em Ang-(1-7) e a Ang-(1-7) em Angiotensina-(1-4). Esse conceito pode ser reforçado pelos achados de que a disfunção cardíaca encontrada em camundongos *knock-out* para ECA2

pode ser evitada por bloqueio da ECA. (Crackower et al., 2002). Além disso, a Ang II diminui a expressão de RNA mensageiro (RNAm) em células neurais, enquanto antagonistas de receptor de Ang I (losartana e olmesartana) aumentam a expressão de RNAm para ECA2 em miocárdio isquêmico de rato (Ishiyama et al., 2004).

Tais vias bioquímicas estabeleceram recentemente a hipótese do mecanismo contra-regulatório ou das ações opostas da Ang II e Ang-(1-7) que ajustam a perfusão tecidual e a homeostase (Ferrario, 2002a; Ferrario, 2003a; Ferrario, 2003b; Ferrario, 2002b; Ferrario et al., 1998).

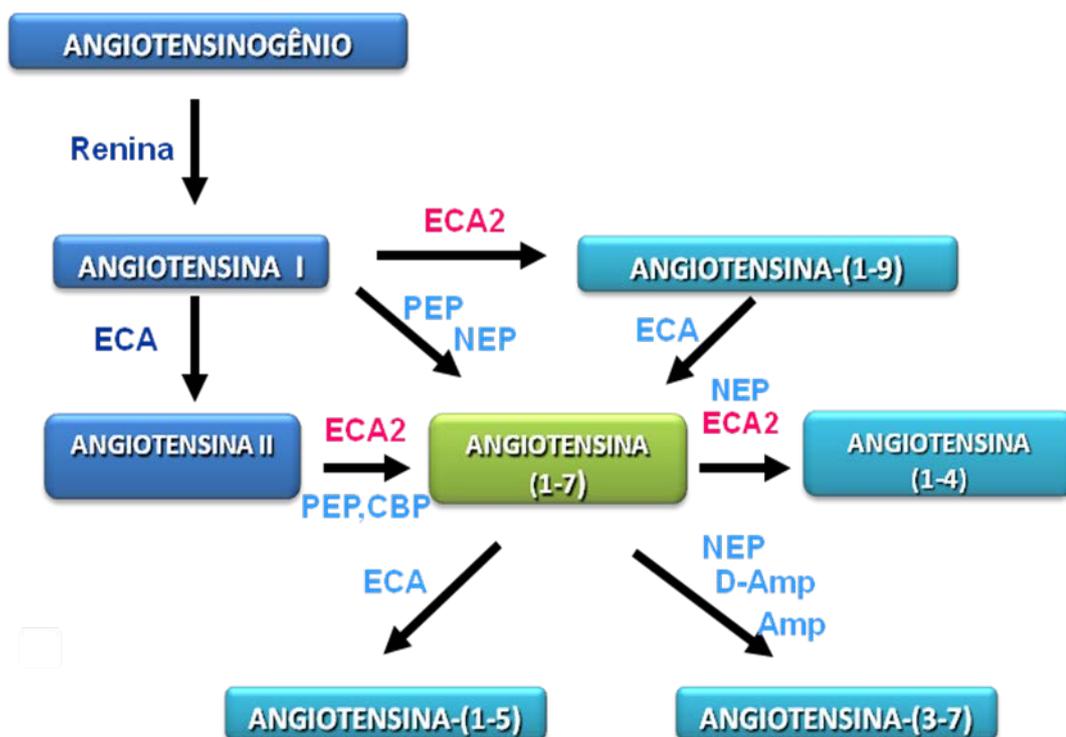


Figura 4: Esquema ilustrando a cascata proteolítica de formação e de degradação dos principais peptídeos angiotensinogênicos biologicamente ativos (Adaptado de Santos et.al., 2001).

ECA-Enzima conversora de angiotensina, ECA2-Isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina; Amp-aminopeptidase; Cbp-carboxipeptidase; D-Amp-Dipeptidil-aminopeptidase; NEP-endopeptidase neutra; PCP-prolil-carboxipeptidase; PEP- Prolil-endopeptidase.

2.5 - Receptores para a Angiotensina-(1-7)

Recentemente Santos e colaboradores (2003 e 2005) mostraram evidências de que a Ang-(1-7) age via receptor Mas. Esse receptor foi inicialmente caracterizado como um receptor órfão, com sete domínios transmembrana e baixa

atividade oncogênica (Young et al., 1986). Foi observado que a sua expressão leva a ativação da fosfolipase C, indicando que o receptor Mas estaria acoplado à família das proteínas G heterotriméricas do tipo G α q/11 (Canals et al., 2006; Kostenis et al., 2005; Zohn et al., 1998).

A ligação específica de Ang-(1-7) marcada isotopicamente com iodo radioativo [125 I-Ang-(1-7)] em cortes de tecido dos rins de camundongo foi abolida pela deleção genética do receptor Mas, ao passo que a ligação da 125 I-Ang II e da 125 I-Ang IV manteve-se intacta (Clark et al., 2003). Além disso, já foi demonstrado que 125 I-Ang-(1-7) se liga com alta afinidade ao receptor Mas transfectado em células de rim de macaco verde africano (COS), e que o tratamento com Ang-(1-7) causa liberação de ácido araquidônico em células de ovário de hamster chinês (CHO) (Clark et al., 2003). A ligação da 125 I-Ang-(1-7) e a liberação de ácido araquidônico foram bloqueadas pelo antagonista do receptor Mas, o composto A-779. O RNAm para o receptor Mas já foi detectado no coração, rins e cérebro (Metzger et al., 1995). Muitos dos efeitos cardiovasculares induzidos pela Ang-(1-7) são bloqueados pelo A-779, o antagonista seletivo do receptor da Ang-(1-7), sugerindo que no coração e nos vasos sanguíneos os efeitos da Ang-(1-7) são mediados por um receptor sensível ao bloqueio pelo A-779 (Almeida et al., 2000; Fernandes et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Ferreira et al., 2001; Ren et al., 2002; Sampaio et al., 2003). Em concordância com o potencial papel cardioprotetor da Ang-(1-7), corações isolados de camundongos *knock-out* para o receptor Mas apresentam mudanças significativas nas funções cardiovasculares como, por exemplo, a diminuição na tensão sistólica e dT/dt positivo e negativo. Também foram observadas evidências da participação do receptor Mas nos efeitos vasculares da Ang-(1-7). Experimentos em anéis de aorta retirados de camundongos com deleção genética do receptor Mas mostraram que o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela Ang-(1-7), desaparece completamente (Santos et al., 2003). Esses achados estão em concordância com os resultados observados em células CHO transfectadas com receptor Mas, em que a Ang-(1-7), assim como seu composto mimético de natureza não peptídica, AVE-0991 (Wiemer et al., 2002), causam um aumento da liberação de NO de maneira dose-dependente (Pinheiro et al., 2004). Esse efeito foi bloqueado pelo A-779, mas não pelos antagonistas dos receptores tipo AT $_1$ ou AT $_2$. Além disso, os receptores Mas parecem estar envolvidos com o efeito antiproliferativo da Ang-(1-

7) sobre as células de músculo liso vascular.

É importante considerar que além da interação Ang-(1-7)/receptor Mas, a ativação dos receptores do tipo AT₂ pode estar envolvida no efeito vasodilatador induzido pela Ang-(1-7) dependendo do diâmetro do vaso ou do leito vascular em questão (Sampaio et al., 2003). Considerando as ações da Ang-(1-7) já estudadas, podemos dividi-las em mediadas ou não pelo receptor Mas. O fato de que em alguns casos as ações da Ang-(1-7) podem ser bloqueadas por antagonistas de receptores AT₁ ou AT₂ (Ferrario, 2002b; Gironacci et al., 1994; Santos et al., 2003) favorecem essa hipótese e pode representar uma interação indireta da Ang-(1-7) com receptores AT₁ ou AT₂. Uma interação direta da Ang-(1-7) com receptores AT₁ ou AT₂, assim como ocorre com a ECA (Maia et al., 2004; Santos et al., 2000), não pode ser excluída, principalmente na presença de altas concentrações da Ang-(1-7). Recentes estudos também demonstraram evidências da existência de outros sítios de ligação para Ang-(1-7) além dos receptores Mas, AT₁ e AT₂, mediando efeito vasodilatador em aorta de ratos Sprague-Dawley (Silva et al., 2007). Neste estudo, o antagonista do receptor de Angiotensina-(1-7), D-Pro7Ang-(1-7) aboliu o efeito vasodilatador deste peptídeo, Porém, o uso de outro antagonista seletivo, o A-779, não alterou a vasodilatação induzida pela Ang-(1-7). Os resultados apresentados demonstram que na aorta de ratos Sprague-Dawley, o efeito vasodilatador de Ang-(1-7) é mediado pela ativação de receptores sensíveis ao D-pro7-Ang-(1-7), mas não ao A-779, o que sugere a existência de diferentes subtipos de receptores para Ang-(1-7).

2.6 - Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor clássico do sistema nervoso parassimpático. É liberada presente em todas as junções neuromusculares e também em neurônios do SNC. Além desses locais, foi demonstrado que em humanos, a acetilcolina e/ou a enzima da síntese de colina acetiltransferase, foi encontrada em células epiteliais (vias aéreas, trato digestivo, trato urogenital, epiderme), mesotélio (pleura, pericárdio), células musculares, endoteliais e células do sistema imune (células mononucleares, granulócitos, macrófagos, mastócitos). A expressão generalizada de acetilcolina não-neuronal é acompanhada pela presença ubíqua da colinesterase e também de seus receptores (nicotínicos e muscarínicos).

(Mesulam et al., 2002, Kirkpatrick et.al, 2000).

Sua síntese nas terminações nervosas ocorre a partir da enzima colina acetiltransferase e de dois precursores, a colina e a acetil-coenzima A fornecidas pela clivagem de fosfolipídios a partir do metabolismo oxidativo na mitocôndria. A acetilcolina sintetizada é então, armazenada em vesículas sinápticas, via um transportador vesicular-ACh (vAChT). Eventualmente, a despolarização induzida pelo influxo de íons Ca^{+2} , desencadeia a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Nessa região a acetilcolina pode interagir com duas classes de receptores: os receptores colinérgicos nicotínicos de ação ionotrópica, e os receptores colinérgicos muscarínicos, de ação metabotrópica (Sarter e Parickh, 2005).

Os receptores nicotínicos (nAChRs) atuam como canais iônicos regulados por ligante com alta permeabilidade ao Na^{+2} , e são constituídos por cinco subunidades denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ e δ (Racké e Matthiesen, 2004).

Os receptores muscarínicos (mAChRs) são pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G que se caracterizam por sete domínios transmembrana. Esse sistema é composto de cinco subtipos de receptores (M1 a M5), cada qual codificado por um gene específico (Kimura e Baughman, 1997). São geralmente divididos em duas classes distintas com base na transdução de sinal: (M_1 , M_3 e M_5) relacionados via Gq/11 via ativação de fosfolipase C e mobilização intracelular de Ca^{+2} e, (M_2 e M_4) relacionados à via Gi/o com inibição da adenilato ciclase e redução de AMPc. Esses receptores são proteínas que medeiam a neurotransmissão entre neurônios e órgãos efetores, como coração, fibras musculares lisas e glândulas. (Soreq & Seidman, 2001).

A acetilcolina que chega na fenda sináptica é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase presente na própria fenda, liberando acetato e colina. A colina, por sua vez, é em sua maioria recaptada por um transportador de colina (CHT) para o terminal pré-sináptico, onde atua como precursor na síntese de uma nova molécula de acetilcolina (Sarter e Parickh, 2005).

Já foi demonstrado que a atividade parassimpática pode causar tumescência peniana, por meio da inibição da liberação de noradrenalina pela ação da ACh em receptores muscarínicos em terminais nervosos adrenérgicos (Klinge e Sjostrand, 1977), ou pela liberação de NO e peptídeos vasoativos das terminações NANC e do endotélio vascular (Anderson e Wagner, 1995).

2.7 – Sistema Cinina-Calicreína

O Sistema Cinina-Calicreína é um sistema endógeno envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a regulação da pressão arterial, a homeostase eletrolítica, a inflamação e a dor. É constituído pelas cininas, um grupo potente de peptídeos vasodilatadores, que são formados a partir da ação das calicreínas sobre os precursores protéicos denominados cininogênios (Figura 5).

Os cininogênios são proteínas envolvidas em reações de cascata durante processos de inflamação e coagulação sanguínea. Existem basicamente dois tipos de cininogênios: o de alto peso molecular e o de baixo peso molecular. Ambos são sintetizados no fígado e são produtos de um gene comum que produz dois diferentes RNAm (Kitamura et al., 1986).

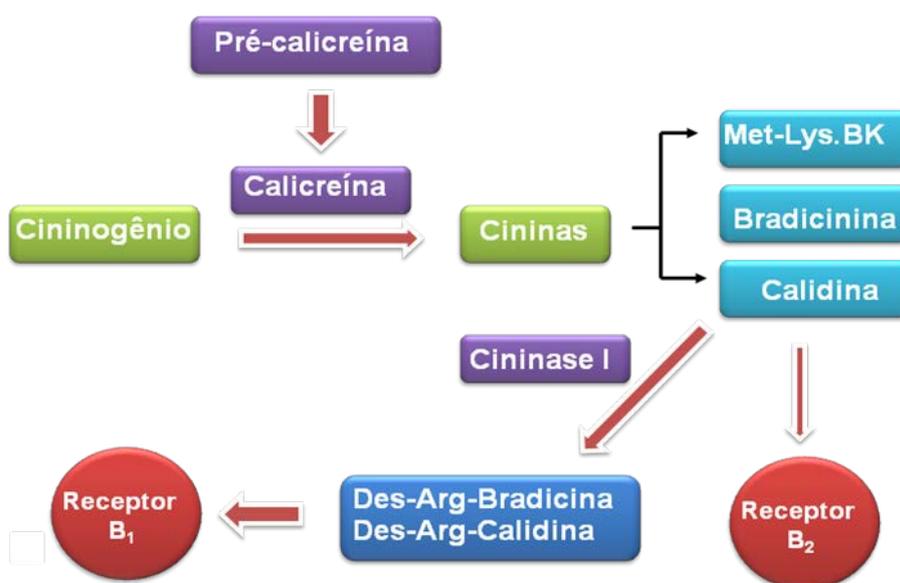


Figura 5: Esquema do Sistema Calicreína-Cininas (Adaptado de Ramalho, 2000).

As calicreínas são serino-proteases encontradas em células glandulares, fluídos biológicos e neutrófilos sendo divididos em dois grupos: as plasmáticas e as teciduais. Esses dois tipos diferem quanto ao peso molecular, características imunológicas, ponto isoeletrico, especificidade de substrato e importância funcional. As calicreínas plasmáticas são sintetizadas no fígado, sendo codificadas por um único gene e circulam no sangue em sua forma pró-enzimática, a pré-calicreína. Sua função primordial é a síntese de bradicinina (BK) a partir do cininogênio de alto peso

molecular (Bhoola et al., 1992). As calicreínas teciduais são expressas, em células endoteliais, em células musculares lisas vasculares e em leucócitos, e são codificados por vários genes com diferentes padrões de expressão. Têm como papel, a clivagem seletiva do cininogênio de baixo peso molecular e do cininogênio de alto peso molecular, ambos levando a formação de um produto comum: o decapeptídeo vasoativo calidina (Bhoola et al., 1992).

As três cininas presentes nos mamíferos são a BK, a calidina (Lis-BK) e a metionil-lisil-bradicinina (Met-Lis-BK). Estudos farmacológicos realizados demonstraram que as cininas promovem suas atividades biológicas pela ativação de pelo menos de dois subtipos de receptores: subtipo 1 para BK (B_1) e subtipo 2 para BK (B_2). A BK e a Lis-BK interagem especificamente com os receptores B_2 e, seus metabólitos (desArg8-bradicinina e a desArg8-lisilbradicinina) interagem com os receptores B_1 (Regoli & Barabe, 1980; Burch & Kyle, 1992).

Os receptores B_1 são menos frequentes que os B_2 , pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G, com sete domínios transmembrânicos e agem via fosfolipase C (Menke et al., 1994; Schneck et al., 1994). Evidências demonstram sua relação com a inflamação crônica, com a dor (Margolius, 1995, Marceau, 1998) e, sob condições patológicas, com efeitos contráteis na musculatura lisa visceral (Feres e Paiva, 1992).

Os receptores B_2 são expressos constitutivamente no endotélio, no músculo liso vascular e em cardiomiócitos (Marceau, 1998), e participam da maioria das ações biológicas das cininas. São também receptores metabotrópicos e agem através da ativação da fosfolipase C e/ou fosfolipase A2. Alguns autores demonstraram que esse receptor pode estar relacionado à resposta inflamatória aguda (McLean et al., 2000), no controle de funções cardíacas e vasculares (Bhoola et al., 1992; Busse e Fleming 1996; Lin et al., 1995), no aumento da sensibilidade ao cloreto de sódio (NaCl) e aumento da PA (Maddedu et al., 1997), além do remodelamento ventricular e prejuízos funcionais ao coração (Emanuelli et al., 1999).

A BK e seus análogos liberam NO e/ou prostaciclina de células endoteliais (De Nucci et al., 1988), levando a um relaxamento de diferentes vasos via ativação de receptores B_1 ou B_2 (Regol et al., 1990). Estudos *in vitro* também demonstraram que esse peptídeo é capaz de causar relaxamento endotélio-dependente de corpo

cavernoso de coelho (Kimoto et al., 1990) e de humanos (Kimoto et al., 1992).

No entanto, outros estudos, têm mostrado que a BK também pode aumentar a PA ou causar resposta bifásica. No leito vascular mesentérico de rato a BK relaxa as artérias e constrixe as veias (Northover e Northover, 1970). No rim e nas artérias da orelha de coelho a BK provoca vasoconstrição (Barabe et al., 1979). Apesar do efeito vasorelaxante bem documentado das cininas, a natureza e o papel de seu efeito vasoconstritor na regulação do tônus vascular estão longe de ser claros.

2.8- Interação do eixo ECA 2/Ang-(1-7)/receptor Mas e Bradicinina

Diversos estudos indicam que a Ang-(1-7) pode interagir com cininas e aumentar a resposta vasodilatadora da BK (Figura 6). Foi demonstrado por Brosnihan e cols., (1996) e Santos e cols., (2000) que a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) pode ser bloqueada pelo composto Hoe 140, um antagonista de receptor de BK (B_2), embora não fosse observada nenhuma evidência de ligação da Ang-(1-7) a este receptor.

Li e cols., (1997) mostraram que a Ang-(1-7) interage com a BK induzindo a vasodilatação de artérias coronarianas de cães. Também, foi mostrado que a Ang-(1-7) potencializa o efeito vasodilatador e hipotensor da BK em ratos normotensos (Paula et al., 1995) e hipertensos (Fernandes et al., 2001), nas artérias do antebraço humano (Ueda et al., 2001), e em vasos coronarianos de porcos (Tom et al., 2001), cães (Brosnihan et al., 1996) e ratos (Almeida et al., 2000).

Carvalho e cols. (2007) demonstraram que o análogo não peptídico da Ang-(1-7), o composto AVE-0991, induz potencialização da ação vasodilatadora da BK em ratos normotensos. Além disso, um estudo mostrou que a comunicação entre Ang II e BK na vasodilatação dependente de endotélio, parece envolver receptores sensíveis ao bloqueio com o antagonista de receptor AT_2 (PD123319) e antagonista do receptor Mas (A-779) (Soares de Moura et al., 2004).

são metabolizadas pela ECA . Nessa hipótese existiria uma competição pelo mesmo substrato sendo que enquanto a Ang-(1-7) estaria sendo metabolizada pela ECA, a BK estaria ativa pra agir em receptores B₂ e promover a liberação de NO e de produtos da ciclooxigenase que promoveriam efeito vasodilator. Outra hipótese sugerida seria a interação não hidrolítica “cross talk” entre a ECA e o receptor B₂. (Erdos et al., 2002), e até mesmo mudanças no acoplamento e/ou sinalização da BK mediadas pelo receptor Mas da Ang-(1-7) que induziriam uma interação mais eficiente entre a BK e o receptor B₂. (Fernandes et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Paula et al., 1995; Santos et al., 2000) (ver figura 3).

A observação recente de que o antagonista de receptor de Ang-(1-7), o composto A-779 [D-Ala⁷-Ang-(1-7)] reverte a ação vasodilatadora da BK induzida por inibidores da ECA em microvasos mesentéricos (Fernandes et al., 2001), além de atenuar a potencialização da resposta hipotensora induzida por BK em ratos tratados com inibidor da ECA (Maia et al., 2004) indica que um mecanismo relacionado à ação da Ang-(1-7) está envolvido nos efeitos dos inibidores da ECA (iECA). Ainda, as ações vasculares da Ang-(1-7) podem envolver modulação da resistência vascular induzidas por Ang II (Roks et al., 1999; Stegbauer et al., 2004).

2.9- Potencial endotelial do eixo “ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas”, dos receptores B₂ para bradicinina, AT₂ para angiotensina II e muscarínicos (M₂ e/ou M₃) para a acetilcolina na função erétil

É bastante claro que a DE afeta a qualidade de vida de milhões de homens e de seus familiares. Assim, a compreensão dos diversos mecanismos fisiológicos envolvidos na ereção peniana pode fornecer novas alternativas de tratamento da DE. Como discutido anteriormente, o eixo ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas parece um candidato em potencial para manipulações farmacológicas que favoreceriam o processo de ereção peniana. Muitos estudos sugerem que as ações vasculares da Ang-(1-7) envolvem aumento na produção de prostanóides vasodilatadores, EDHF e principalmente NO (Brosnihan et al., 1996; Heitsch et al., 2001; Muthalif et al., 1998). Existem algumas evidências de que a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) envolve de alguma forma a ativação de receptores B₂, assim como a potencialização da resposta da BK induzida por iECA parece envolver a participação da Ang-(1-7) e

provavelmente do receptor Mas (Brosnihan et al., 1996; Fernandes et al., 2001; Santos et al., 2000).

O bloqueio da geração ou da ação Ang II com o uso de iECAs ou antagonistas de receptor AT₁, respectivamente, está associado ao aumento na atividade e/ou expressão da ECA2 e ao aumento nos níveis de Ang-(1-7) tanto no plasma como em vários tecidos (Ferrario et al., 2005; Lyer et al., 1998). A contribuição da Ang-(1-7) para o efeito cardiovascular 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 et al., 2003). Além disso, a infusão de A-779 reverte à ação antitrombótica do captopril e da losartana (Kucharewicz et al., 2002), e atenua a atividade potencializadora da BK induzida por inibidores da ECA em ratos (Maia et al., 2004). Esses efeitos podem estar associados ao fato de que inibição da ECA causa aumento nos níveis plasmáticos e teciduais de Ang-(1-7) (Lyer et al., 1998). Ainda, muitos peptídeos do SRA, incluindo o vasodilatador Ang-(1-7), são liberados no corpo cavernoso (Kifor et al., 1997). Esses achados sugerem que o efeito benéfico da modulação do SRA sobre a função erétil pode ser mediado pela Ang-(1-7). A via que envolve a formação e ação da Ang-(1-7) é um potencial candidato para o desenvolvimento de regimes terapêuticos para tratamento de doenças cardiovasculares tais como hipertensão e DE devido a habilidade da Ang-(1-7) em induzir a liberação de NO e prostaglandina I₂ (prostaciclina), assim como a 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 et al., 2001). No entanto, a contribuição da Ang-(1-7) como um agente antioxidante e/ou antiinflamatório que se opõe à sinalização da Ang-II no tecido cavernoso ainda não é bem esclarecida. Recentemente, Yousif e cols. (2007) mostraram que Ang-(1-7) causa relaxamento de tiras de tecido 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 em células endoteliais aórticas bovinas com um mimético da Ang-(1-7), o agonista não peptídico AVE-0991 (Wiemer et al., 2002; Pinheiro et al., 2004), faz com que esse agonista dos receptores Mas se apresente como uma

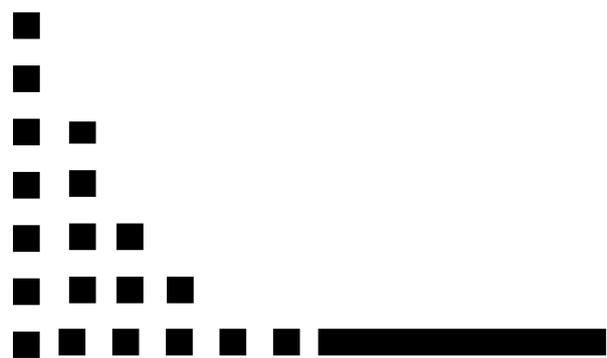
ferramenta bastante promissora para o tratamento da DE.

Evidências também mostram que a interação da BK com a Ang-(1-7) pode envolver ação vasodilatadora de receptores AT₂. Estudos realizados por Gorelik e cols. (1998) (Gorelik et al., 1998) mostraram que o bloqueio de receptores AT₂ por meio do antagonista de receptores AT₂ (PD123319) diminuiu o relaxamento induzido pela aplicação de Ang-(1-7) posteriormente a BK em artéria coronária isolada de porcos. Outros estudos também apontam que o tônus cavernoso é parcialmente regulado por relaxamento via BK e contraído via Ang II (Becker et al., 2001).

Quanto à participação da ACh no processo de ereção, a importância dos nervos parassimpáticos já é bem estabelecida (Andersson & Wagner, 1995). O tecido peniano humano e também o de diversas espécies de animais apresentam rica inervação colinérgica (Hedlund et al. 2000). Também foi verificado que 4 subtipos de receptores muscarínicos (M₁-M₄) são expressos no corpo cavernoso humano (Traish et al., 1995), sendo que o receptor relacionado ao relaxamento muscular parece ser o subtipo M₂ (Toselli et al., 1994) e que o subtipo M₃ encontra-se em maior proporção no endotélio. (Traish et al., 1995). Além disso, estudos apontam que a atividade parassimpática pode produzir tumescência dos corpos cavernosos através da estimulação de receptores muscarínicos, por meio da inibição da liberação de noradrenalina, um importante fator constritor no processo de ereção, ou pela liberação de um fator de relaxamento como o NO. É importante salientar aqui que a atividade parassimpática não é equivalente às ações da ACh; porque outros transmissores podem ser liberados por nervos colinérgicos (Lundberg, 1996).

Apesar de não existir evidência científica, consideramos que a Ang-(1-7) possa de alguma forma interagir com receptores muscarínicos ou interferir na produção de ACh neuronal e não neuronal, com consequente aumento na produção de fatores de relaxamento e melhora do processo erétil.

Embora os trabalhos acima citados sugiram a participação do eixo “ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas, de receptores B₂ para BK, de receptores AT₂ para angiotensina e da possível contribuição dos receptores M₂ e/ou M₃ para ACh em outros leitos vasculares, pouco se sabe sobre a participação dessa via na modulação dos mecanismos fisiológicos da ereção peniana.



3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Ratos Wistar machos 270-300g foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12h) recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Todos os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (protocolo CEUA-UFOP n°. 53/2010).

3.2 - Método de avaliação da função erétil em animais conscientes

Nesse método de avaliação da função erétil, os ratos foram colocados individualmente em caixas de madeira, com a frente e o fundo de vidro transparente, onde foram filmados por intervalos de 30 minutos com o auxílio de duas câmeras digitais colocadas em frente e embaixo da caixa. Tais procedimentos foram realizados em uma sala silenciosa e com luminosidade semelhante àquela do biotério. Os animais receberam inicialmente um treinamento (ambientação na caixa por 30 minutos) antes da realização dos experimentos e respectivas filmagens. Os ratos conscientes receberam uma injeção subcutânea (S.C.) (num volume de 0,01/mL/100g, na região dorsal) contendo veículo ou substância teste e foram recolocados nas caixas e filmados por 30 minutos. Em seguida, os mesmos ratos foram retirados das caixas e receberam uma injeção subcutânea (num volume de 0,01 mL/100g, na região dorsal) de um agonista dopaminérgico - apomorfina (25,5 nmol/100g), preparada em solução salina (0,9 g/100mL) contendo ácido ascórbico (100 µg/mL). Os ratos foram novamente colocados nas caixas e filmados por mais 30 minutos. A partir dos filmes obtidos foram contadas as ereções para cada período específico. Uma ereção típica constitui o momento em que os ratos apóiam-se nas patas traseiras e curvam-se em direção ao pênis, segurando e lambendo o membro por tempo superior a 5 segundos (Figura 7). Foram também observados os efeitos decorrentes da administração da apomorfina como bocejos, lambedura das patas dianteiras e 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.

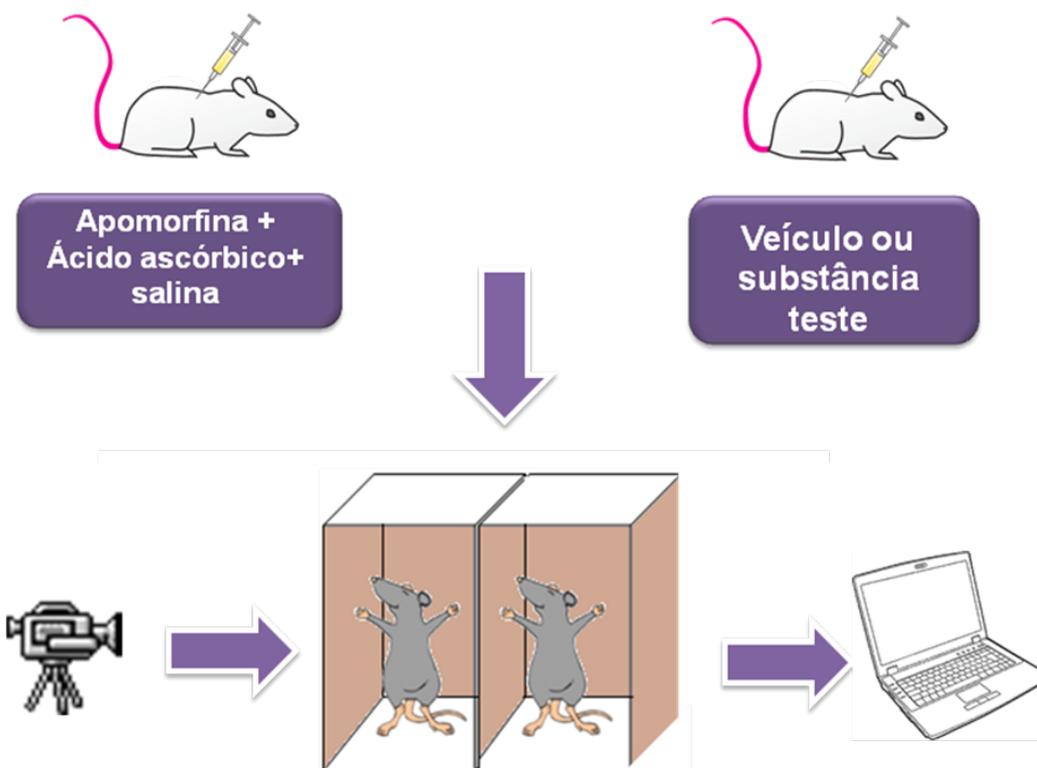


Figura 7: Esquema do modelo usado para avaliação da função erétil em ratos conscientes. Uma ereção típica constitui o momento em que os ratos apóiam-se nas patas traseiras e curvam-se em direção ao pênis, segurando e lambendo o órgão.

3.3 - Protocolo experimental utilizado na avaliação da função erétil em modelo consciente:

Protocolo 1: Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos. Cada grupo recebeu injeção S.C. de veículo (salina e ácido ascórbico), 31,5pmol/100g de Ang-(1-7), 25,5nmol/100g de apomorfina (agonista dopaminérgico não seletivo) ou a combinação de Ang-(1-7) e apomorfina (Figura 8a).

Protocolo 2: Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos. Cada grupo recebeu aplicação S.C. de veículo (salina mais ácido ascórbico), 80pmol/100g Ang-(1-7), 25,5 nmol/100g de apomorfina ou a combinação de Angiotensina-(1-7) e apomorfina (Figura 8a) .

Protocolo 3: Ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos. Cada grupo recebeu administração S.C. de veículo, 25,5 nmol/100g de apomorfina ou a combinação de apomorfina e 31,5 pmol/100g de Angio-(1-7), nas situações controle ou na presença de atropina, bloqueador dos receptores muscarínicos (em duas doses diferentes: 0,72 μ mol/100g e 2,9 μ mol/100g S.C., 60 minutos antes) (Figura 8b).

a)



b)

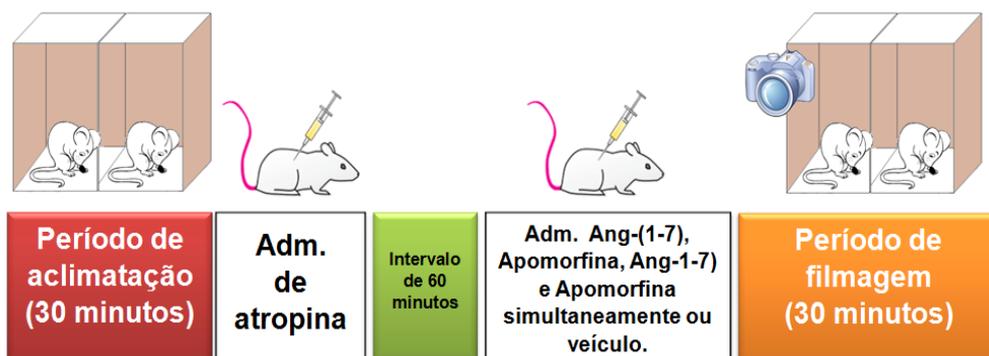


Figura 8: Protocolo Experimental utilizado na avaliação da resposta erétil em modelo consciente. O protocolo (a) foi utilizado para avaliação da facilitação da função erétil usando Angiotensina-(1-7) em duas diferentes doses. O protocolo (b) foi utilizado para avaliar o papel do sulfato de atropina na resposta erétil e a possível participação de receptores muscarínicos na facilitação da resposta da Angiotensina-(1-7) na ereção.

3.4 - Método de avaliação do índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados

Os animais foram anestesiados usando uma injeção intraperitoneal (I.P.) da mistura de Quetamina (100mg/kg) e Xilasina (14 mg/kg). A artéria e a veia femoral esquerda foram canuladas com um tubo de polietileno (PE-10) soldado a um polietileno (PE-50) contendo salina heparinizada (100 U/mL). A cânula inserida na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão para obtenção de sinal da pressão arterial média (PAM). Posteriormente uma incisão cirúrgica foi realizada na região dorsolateral direita da próstata para exposição do gânglio pélvico maior (GPM). Para registro da pressão intracavernosa (PIC), os corpos cavernosos do animal foram expostos e foi realizada a canulação do corpo cavernoso direito com uma cânula de polietileno PE-10 contendo salina heparinizada (100 U/mL) e uma agulha 30G em uma das suas extremidades. Essa cânula foi conectada também a um transdutor de pressão que estava ligado a um sistema de aquisição de dados computadorizado. Um eletrodo bipolar de platina conectado a um estimulador (Grass SD9 Quincy, MASS, EUA) foi posicionado sobre o GPM e devidamente ajustado. O ajuste adequado foi realizado verificando se a aplicação do estímulo na maior frequência utilizada, (12 Hz, para esse protocolo) promovia aumento significativo da PIC, fornecendo um índice de ereção (razão PIC/PAM) superior a 0,7. Estímulos elétricos caracterizados por pulso de 5ms, 4V, em diferentes frequências 1, 2, 4, 8 e 12 Hz foram então, aplicadas sobre o GPM. As alterações da pressão PIC e da PAM foram monitoradas continuamente durante a estimulação ganglionar e registradas utilizando-se do sistema DATAQ WinDaq® serial Acquisition version 2.63.

O índice de ereção foi expresso como a razão da PIC/PAM (magnitude da resposta máxima) para cada frequência utilizada para os estímulos do GPM. Ao final do experimento, esses animais ainda sob anestesia foram sacrificados em câmara de CO₂.

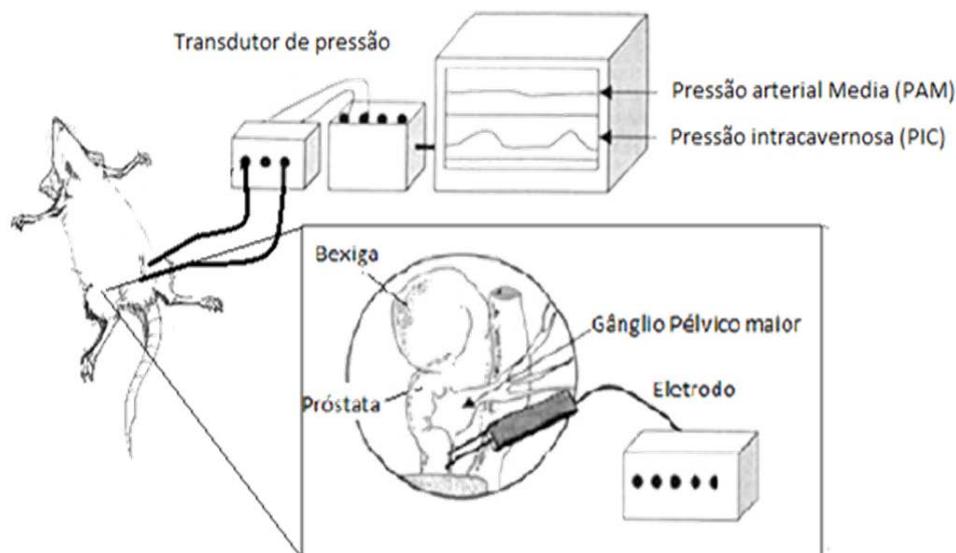
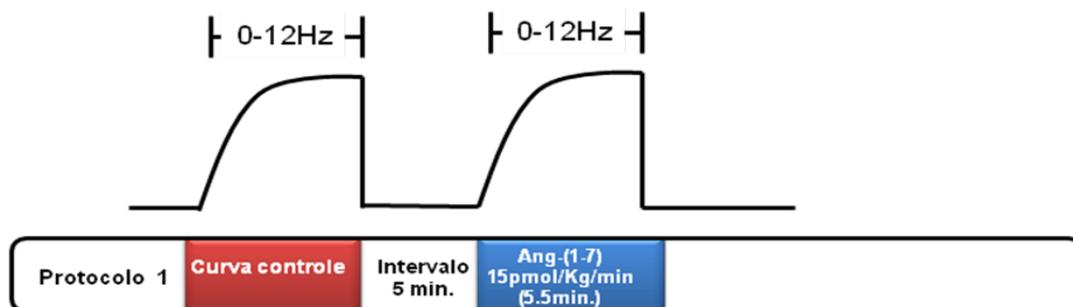


Figura 9: Esquema do modelo usado de avaliação da função erétil em ratos anestesiados. Os ratos tiveram a pressão arterial média (PAM) e a pressão intracavernosa (PIC) monitoradas através de cânulas inseridas na artéria femoral e no corpo cavernoso, respectivamente. Foram obtidas curvas de ereção (representadas pela razão PIC/PAM) através estimulação do gânglio pélvico maior (1-12 Hz, 4 V).

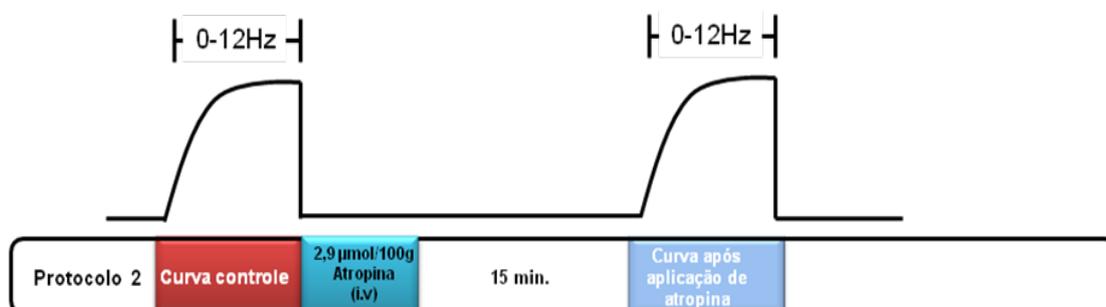
Em todos os casos seguintes foram aguardados no mínimo 5 minutos antes de uma nova curva estímulo resposta, ou antes, da administração de nova droga. A infusão de Ang-(1-7), numa taxa de 15 pmol/kg/min, foi feita utilizando uma microseringa (Hamilton, USA) conectada a uma bomba de infusão (Razel E99, USA). Essa infusão foi iniciada 3 minutos antes e continuou por 2,5 minutos durante a estimulação ganglionar para a obtenção dos sinais para a curva estímulo resposta.

3.5 - Protocolo experimental utilizado na avaliação da função erétil em modelo anestesiado

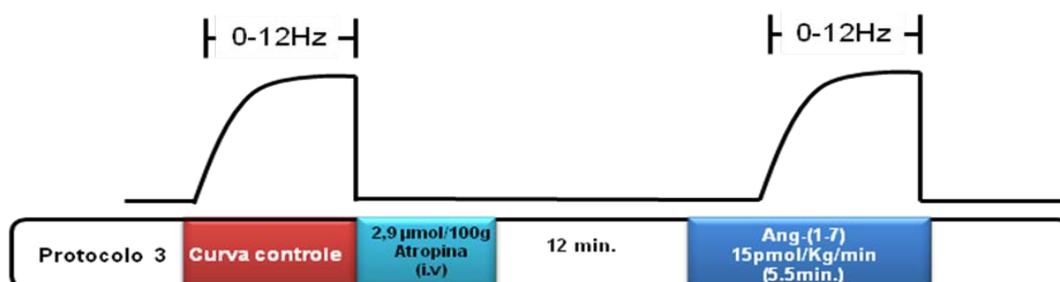
Protocolo 1: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle e na presença de Ang-(1-7). O mesmo protocolo foi realizado com a infusão apenas do veículo (solução fisiológica de NaCl 0,9%).



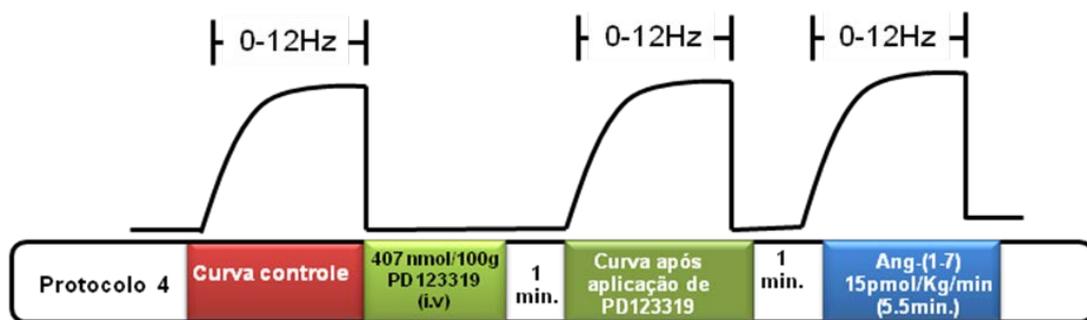
Protocolo 2: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle e 15 minutos após a aplicação intravenosa de 2,9 µmol/100g de sulfato de atropina.



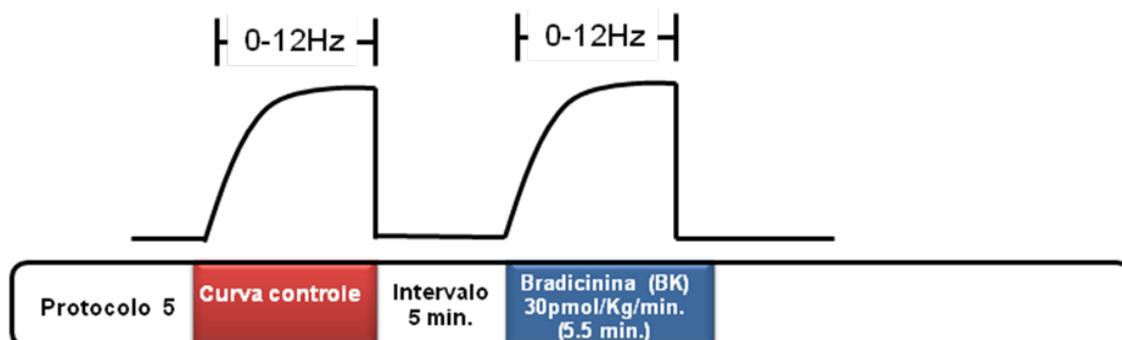
Protocolo 3: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na situação controle, 15 minutos após a aplicação intravenosa de 2,9 µmol/100g de sulfato de atropina, e na presença de uma infusão de Ang-(1-7).



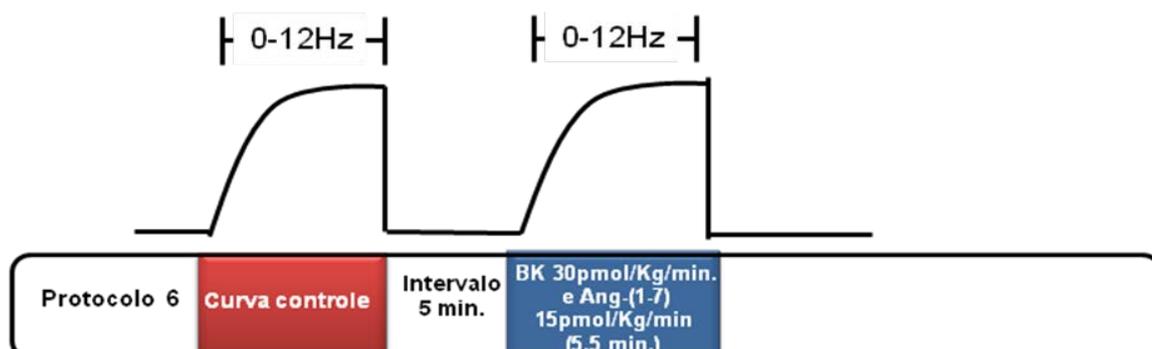
Protocolo 4: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle, 1 minuto após a aplicação intravenosa de 407nmol/100g de PD123319 isoladamente e 1 min. após, na presença da infusão de Ang-(1-7).



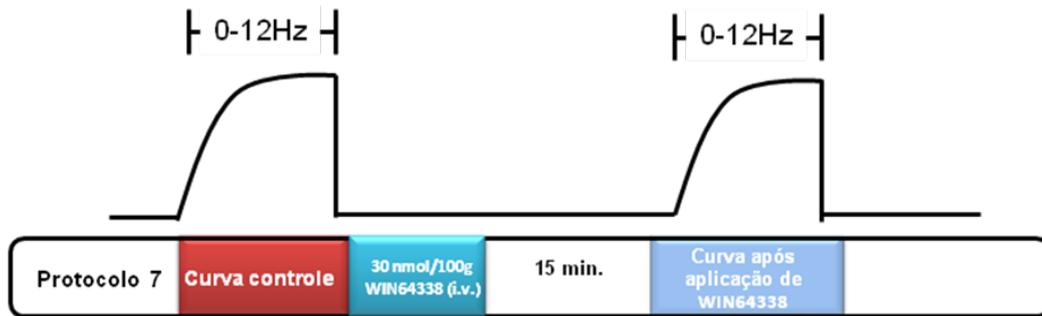
Protocolo 5: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle e durante a infusão de BK em duas doses diferentes: (15 e 30 pmol/Kg/min). A infusão de BK foi iniciada 3 minutos antes e continuou por 2,5 minutos durante a estimulação ganglionar para a realização da curva estímulo resposta.



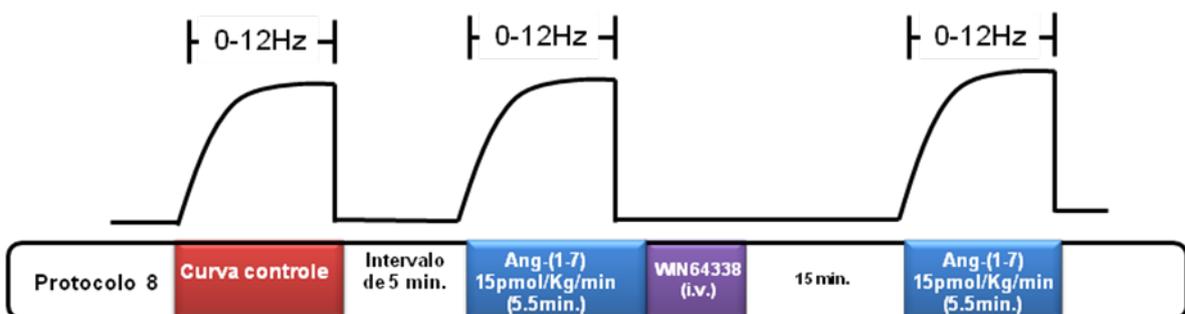
Protocolo 6: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle e durante a infusão simultânea de BK e Ang-(1-7). A dose de BK usada foi apenas de 30pmol/Kg/min nesse protocolo.



Protocolo 7: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na condição controle e 15 minutos após a administração intravenosa de 30 nmol/100g de WIN64338 (dissolvido em 1% DMSO seguido da adição de 0,9% salina, com volume de aplicação de 1 ml/kg).



Protocolo 8: Foram realizadas curvas estímulo-resposta (representadas pela razão PIC/PAM) através da estimulação do GPM (1-12 Hz, 4V) na situação controle, durante a infusão de Ang-(1-7) e durante a infusão de Ang-(1-7) em ratos previamente tratados com 30 nmol/100g de WIN64338 (administrado nas mesmas condições mencionadas no protocolo 7).



3.6- Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada pelo one-way ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.



5 - RESULTADOS

5.1 - ESTUDO DA RESPOSTA ERÉTIL EM RATOS CONSCIENTES (MODELO DE EREÇÃO INDUZIDA POR APOMORFINA)

5.1.1 - Efeito da administração subcutânea de Ang-(1-7) na dose de 31,5pmol/100g sobre a função erétil de ratos conscientes

Para a avaliação da função erétil de ratos sem tratamento prévio, 4 grupos de ratos controles conscientes receberam injeção S.C. de veículo (salina contendo ácido ascórbico), 31,5 pmol/100g de Ang-(1-7), 25,5 nmol/100g de apomorfina ou a combinação de Ang-(1-7) e apomorfina. Foi observado que houve diferença significativa entre o grupo que recebeu apenas apomorfina com o grupo que recebeu a aplicação de apomorfina mais Ang-(1-7), demonstrando que o peptídeo nesta dose aplicada potencializa a resposta erétil no modelo estudado. Quando se comparou o grupo tratado apenas com Ang-(1-7) e veículo foi verificado que apesar de uma tendência a facilitação não existiu diferença entre os mesmos. (Figura 11).

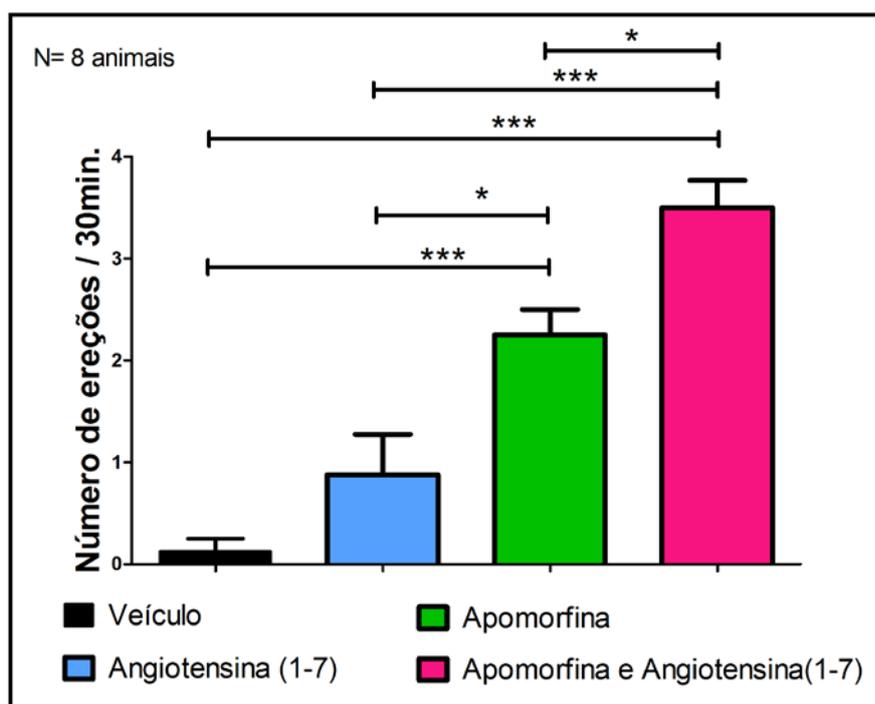


Figura 10: Efeito da administração subcutânea de Angiotensina-(1-7) na dose de 31.5pmol/100g sobre a função erétil de animais conscientes (modelo com apomorfina). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais (*) representa diferença significativa $p < 0,05$ e (***) representa diferença significativa $p < 0,001$. (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.1.2 - Efeito da administração subcutânea de Ang-(1-7) na dose de 80 pmol/100g sobre a função erétil de ratos conscientes

Para a avaliação da função erétil de ratos sem tratamento prévio, 4 grupos de ratos conscientes receberam injeção S.C. de veículo (salina contendo ácido ascórbico), 80 pmol/100g de Ang-(1-7), 25,5 nmol/100g de apomorfina ou a combinação de Ang-(1-7) e apomorfina. Foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (veículo) e os demais grupos. Não houve, no entanto, diferença significativa entre os grupos tratados com apomorfina, Ang-(1-7) na dose 80 pmol/100g e o grupo que recebeu a combinação de apomorfina e Ang-(1-7). Esses dados demonstram que nessa dose, a Ang-(1-7) foi capaz de promover uma resposta erétil semelhante a da apomorfina. E ainda, que nessa dose, a Ang-(1-7) não potencializa a resposta erétil induzida por estimulação central com apomorfina, como observado para a dose de 31,4 pmol/100g (Figura 12).

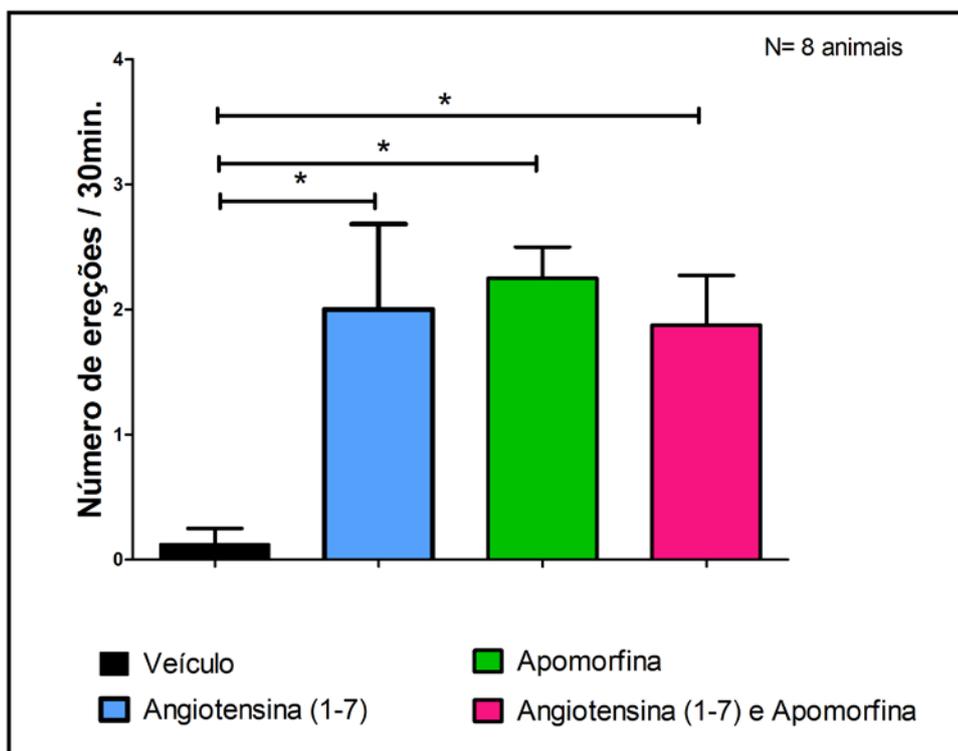


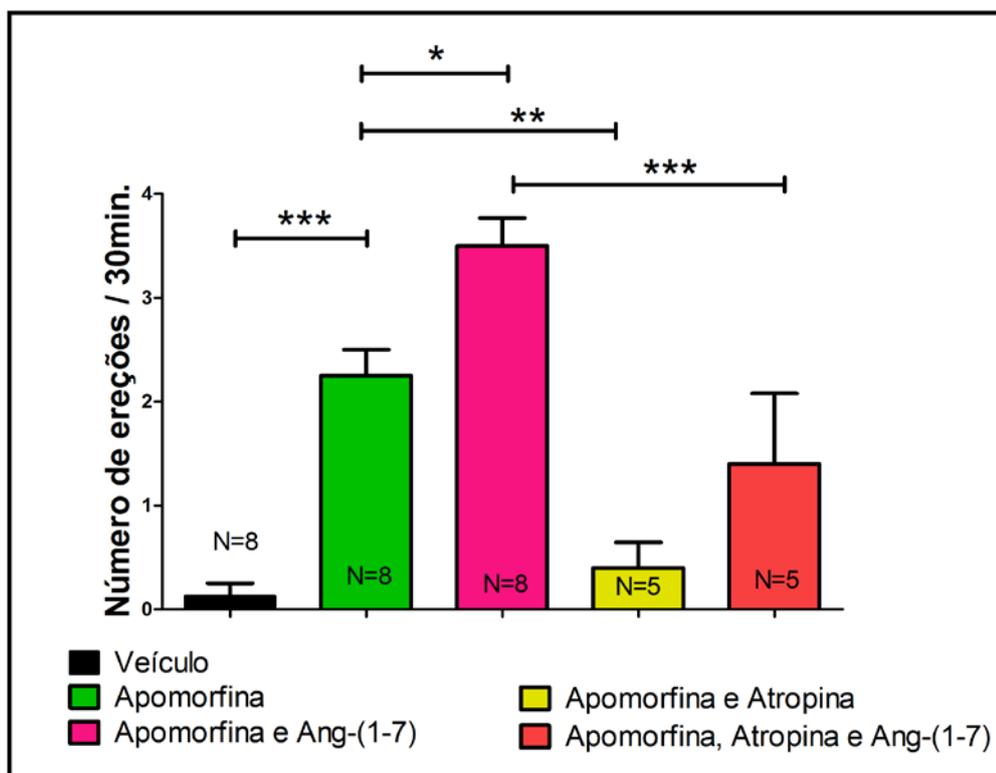
Figura 11: Efeito da administração subcutânea de Angiotensina-(1-7) na dose de 80pmol/100g sobre a função erétil de animais conscientes (modelo com apomorfina). Cada ponto representa a média ± EPM de 8 animais. (*) representa diferença significativa com $p < 0,05$. (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.1.3 - Efeito da administração subcutânea de sulfato de atropina sobre a função erétil de ratos conscientes

Para a avaliação da função erétil de ratos previamente tratados com atropina, 4 grupos de ratos controles conscientes, receberam injeção S.C. de veículo (salina mais ácido ascórbico), 25,5 nmol/100g de Apomorfina, a combinação de apomorfina e 31,5 pmol/100g de Ang-(1-7), nas situações controle ou na presença do bloqueador de receptores muscarínicos, atropina (em duas doses diferentes: 0,72 μ mol/100g e 2,9 μ mol/100g S.C., 60 minutos antes).

A administração de Ang-(1-7) em ratos conscientes potencializou a resposta erétil induzida pela apomorfina. O tratamento prévio com atropina reduziu significativamente o número de ereções induzidas por apomorfina (nas duas doses utilizadas), assim como reduziu a facilitação da resposta erétil induzida pela Ang-(1-7) (Figura 3 A e B).

A)



B)

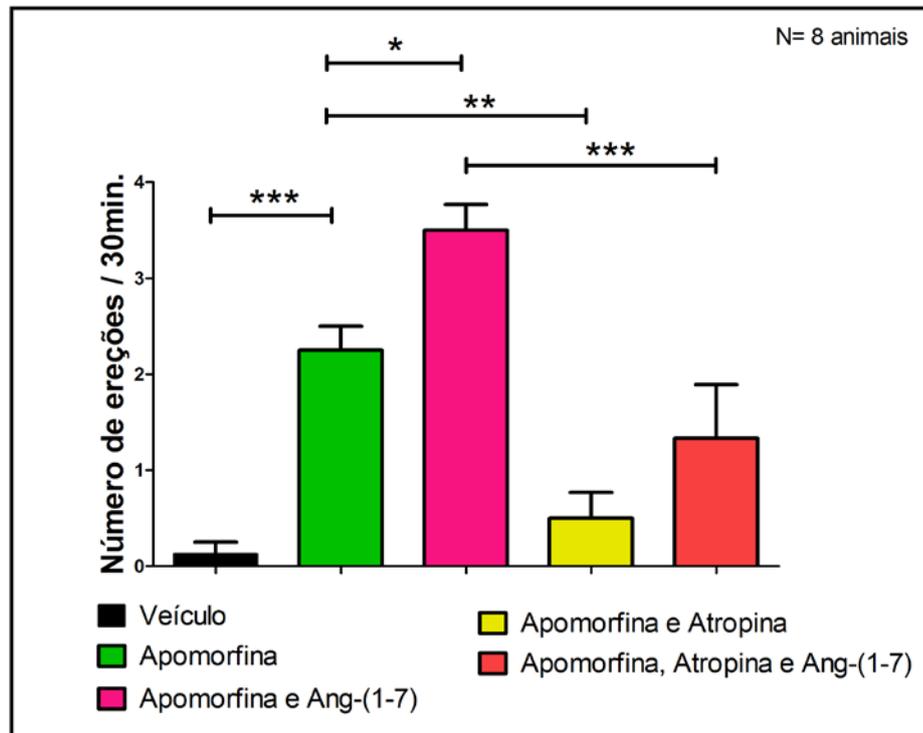


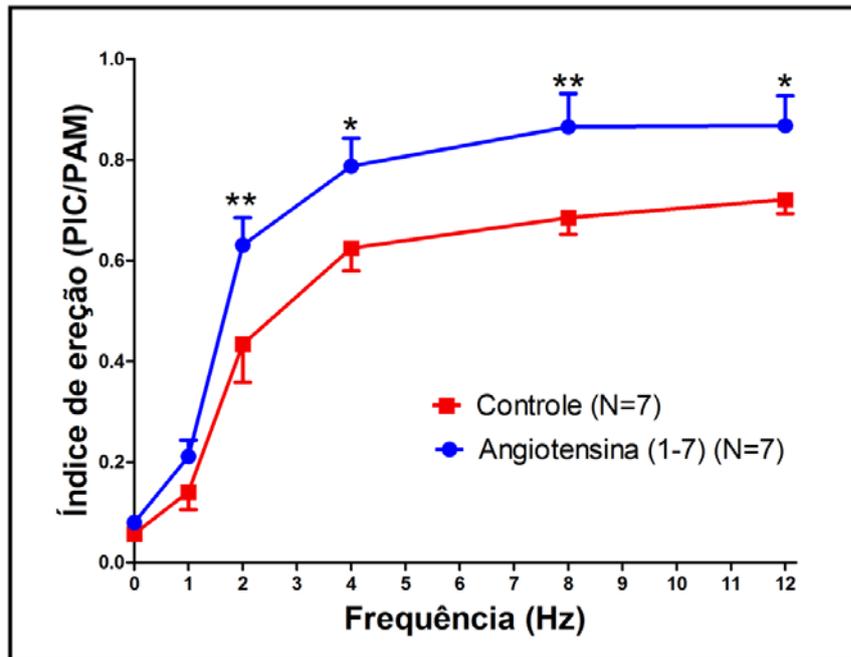
Figura 12: Efeito da administração subcutânea de atropina sobre a função erétil de ratos conscientes (modelo com apomorfina). Cada ponto representa a média \pm EPM de 8 animais. Asteriscos representam diferenças significativas (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.2 - ESTUDO DA RESPOSTA ERÉTIL EM RATOS ANESTESIADOS (MODELO DE EREÇÃO INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO GANGLIONAR)

5.2.1 - Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o gânglio pélvico maior (GPM) estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos do término da curva controle foi iniciada a infusão de 15pmol/Kg/min de Ang-(1-7). A infusão durou 5,5 minutos, sendo que 3 minutos de infusão antes e 2,5 minutos de infusão durante a estimulação ganglionar para a obtenção da curva de índice de ereção na presença de Ang-(1-7). Quando se comparou a curva realizada na presença de Angiotensina-(1-7) com aquela obtida na condição controle foi verificado que nas frequências de 2, 4, 8 e 12 Hz houve diferença significativa (Figura 14A). Os dados mostram que a Ang-(1-7) facilita a função erétil induzida por estimulação ganglionar em animais anestesiados. Quando o mesmo protocolo foi realizado apenas utilizando o veículo (solução fisiológica de NaCl 0,9%), usado para solubilizar a Ang-(1-7), não foi observada diferença significativa entre o índice de ereção do grupo controle com o grupo que recebeu a infusão de aproximadamente 6,2 µl/min de salina (Figura 14B).

A)



B)

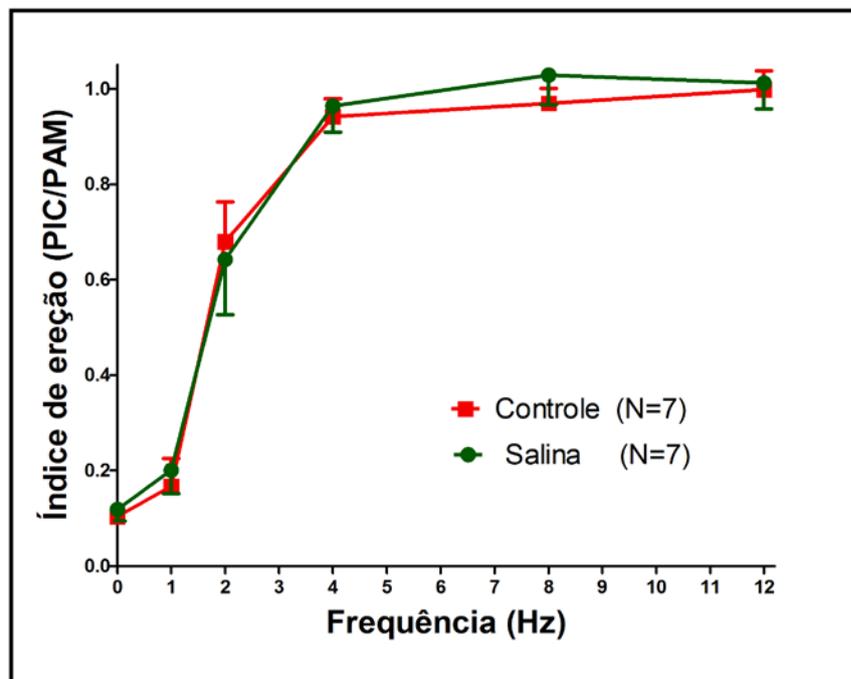


Figura 13: Efeito da infusão intracavernosa de Ang-(1-7) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e 5 minutos após o início da infusão intracavernosa de 15pmol/Kg/min de Ang-(1-7) (● painel A) ou de veículo (● painel B). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.2.2 - Efeito da administração intravenosa de atropina sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos foi feita a administração intravenosa de 2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de sulfato de atropina e 15 minutos depois foi construída uma nova curva do índice de ereção (razão PIC/PAM). Tal protocolo foi realizado com a verificação prévia da efetividade do bloqueio muscarínico. Para isso foram administrados 50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de ACh 5 minutos antes da realização da curva controle do índice de ereção (razão PIC/PAM). A administração dessa droga resultou em imediata diminuição da pressão arterial e redução considerável da frequência cardíaca. Depois, foi administrada a atropina (2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) e após 5 minutos aplicado uma segunda dose de ACh. Os efeitos característicos da ACh (redução da pressão arterial e da frequência cardíaca) não foram observados, demonstrando que a dose aplicada de atropina foi efetiva para o bloqueio colinérgico. Depois, foram aguardados 10 minutos para realização de uma nova curva (razão PIC/PAM), agora sob influência do bloqueio muscarínico. Posteriormente a construção da segunda curva do índice de ereção, uma última dose de ACh (20 $\mu\text{g}/100\text{g}$) foi administrada e novamente verificando que o bloqueio muscarínico se mantinha inalterado. A realização de tal procedimento foi importante pra verificar a eficácia da dose administrada de atropina no bloqueio dos receptores muscarínicos.

Quando se comparou a curva controle com a realizada após a aplicação de atropina foi verificado que houve redução do índice de ereção, embora a diferença tenha sido significativa somente na frequência de 12 Hz entre os dois grupos. (Figura 15).

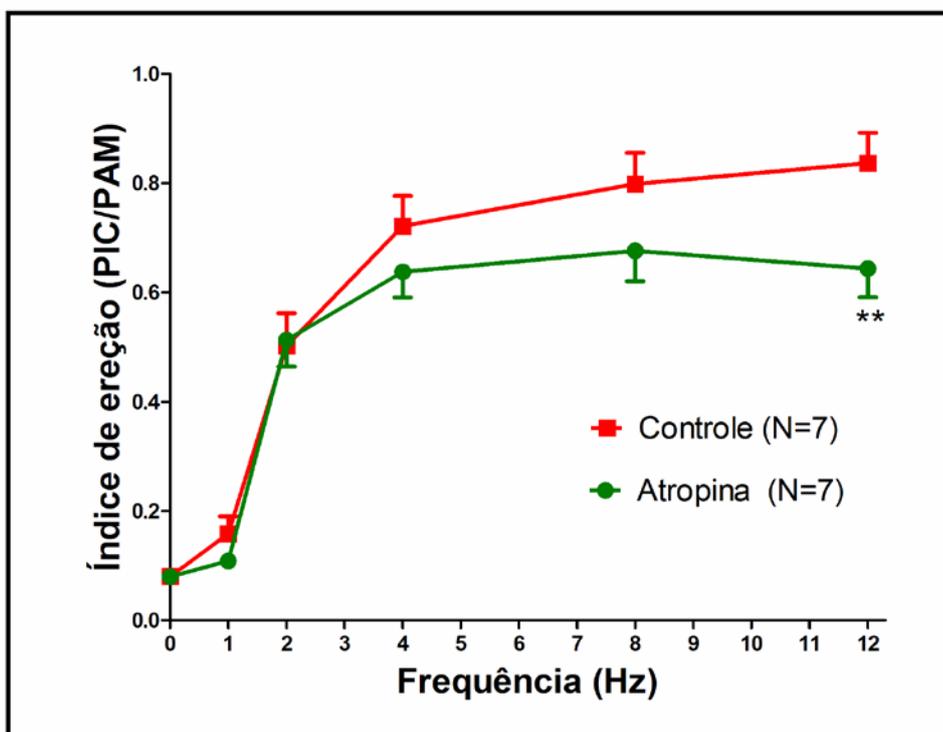


Figura 14: Efeito da administração intravenosa de atropina (antagonista muscarínico) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e 15 minutos após a injeção intravenosa de 2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de sulfato de atropina (●). Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais. Diferença significativa em relação ao controle $**p < 0.01$ (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.2.3 - Efeito da administração intravenosa de atropina sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos foi realizada administração intravenosa de 2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de sulfato de atropina e 12 minutos depois foi iniciada a infusão de 15 $\text{pmol}/\text{kg}/\text{min}$ de Ang-(1-7). Aos 3 minutos do início da infusão de Ang-(1-7) (15 minutos após a administração da atropina) o GPM foi estimulado para a obtenção de uma nova curva do índice de ereção. O índice de ereção observado durante a infusão de Ang-(1-7) na presença de sulfato de atropina foi significativamente maior que aquele observado na situação controle. Esses dados demonstram que a presença de atropina foi capaz de prejudicar a resposta facilitadora da Ang-(1-7) sobre a ereção (razão PIC/PAM) induzida por estimulação ganglionar (Figura 16).

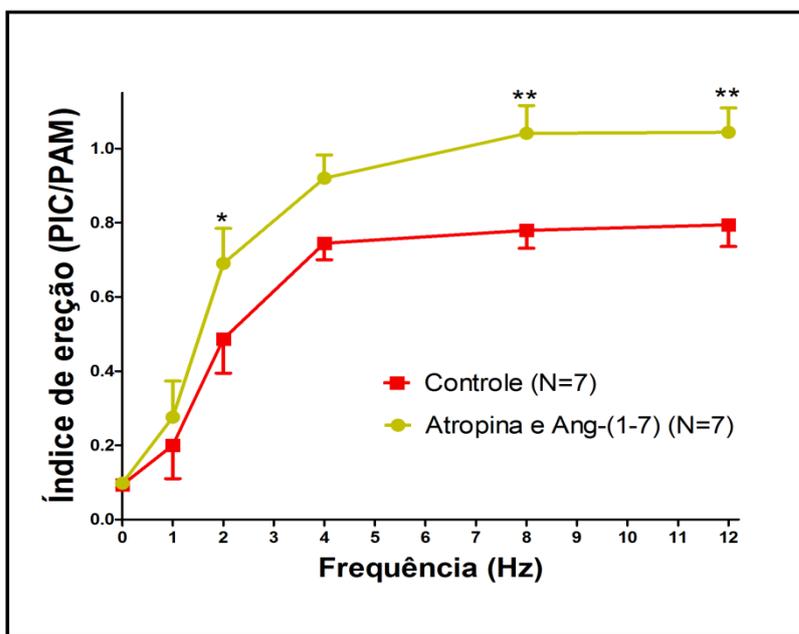


Figura 15: Efeito da administração intravenosa de atropina sobre a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e 15 minutos após a injeção intravenosa de 2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de sulfato de atropina e infusão de 15 $\text{pmol}/\text{kg}/\text{min}$ de Ang-(1-7) (●). Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.2.4 - Efeito da administração intravenosa de PD123319 (antagonista dos receptores AT₂) sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos foi feita administração intravenosa de 407 nmol/100g de PD123319 e logo após 1 minuto foi realizada uma nova curva do índice de ereção. Em seguida (intervalo de 1 minuto) foi iniciada a infusão de Ang-(1-7) 15 pmol/kg/min e aos 3 minutos iniciada uma nova série de estímulos do GPM para a obtenção de uma terceira curva do índice de ereção. A resposta erétil induzida por estimulação ganglionar não foi significativamente afetada pela presença do PD123319. No entanto, a resposta facilitadora da Angiotensina-(1-7) foi significativamente atenuada na presença do antagonista de receptores AT₂ (Figura 17).

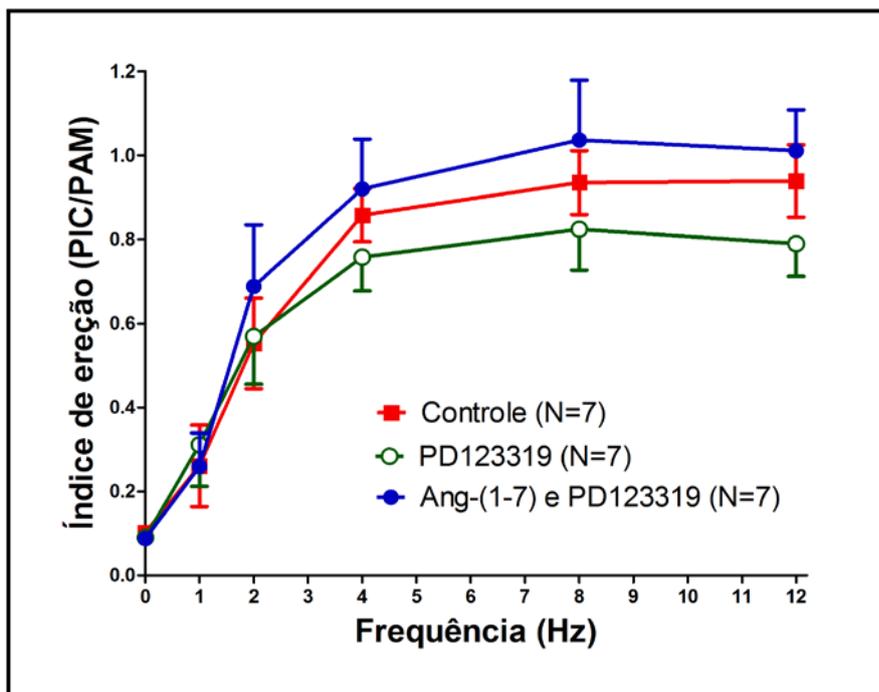


Figura 16: Efeito da administração intravenosa do PD123319 (antagonista dos receptores AT₂) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar e sobre a facilitação dessa resposta mediada por Ang-(1-7) em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■), 1 minuto após a injeção intravenosa de 407 nmol/100g de PD123319 (○) e na presença do PD123319 com infusão de 15pmol/Kg/min de Ang-(1-7) (●). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais.

5.2.5 - Efeito da administração intracavernosa de bradicinina sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos foi iniciada a infusão intracavernosa de 30 pmol/Kg/min de bradicinina e 3 minutos depois foi iniciada a construção de uma nova curva do índice de ereção (razão PIC/PAM) enquanto a bradicinina continuava a ser infundida por 2,5 minutos durante a série de estímulos do GPM. A infusão de bradicinina atenuou a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar. Essa redução no índice de ereção foi estatisticamente significativa nas frequências 2 e 4Hz (Figura 18).

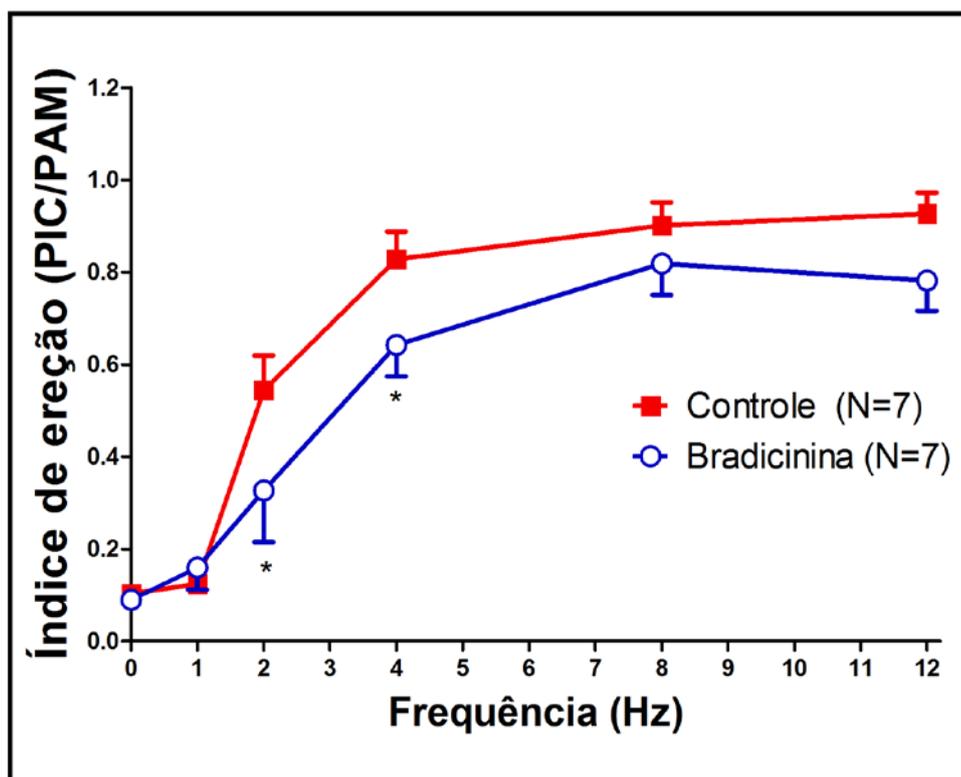


Figura 17: Efeito da infusão intracavernosa de BK sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e durante a infusão intracavernosa de 30 pmol/Kg/min de bradicinina (○). Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$ (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).

5.2.6 - Efeito da infusão intracavernosa de Bradicinina sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos do término da curva controle foi iniciada a infusão simulânea de 30 pmol/Kg/min de bradicinina e 15pmol/kg/min de Ang-(1-7). A infusão foi feita por 5,5 minutos (3 minutos antes e 2,5 minutos durante a estimulação ganglionar). As curvas de índice de ereção na situação controle e na presença da bradicinina não apresentaram diferença estatística significativa. Esses dados mostram que a bradicinina atenuou a resposta facilitadora da Ang-(1-7) sobre a ereção induzida por estimulação ganglionar (Figura 19).

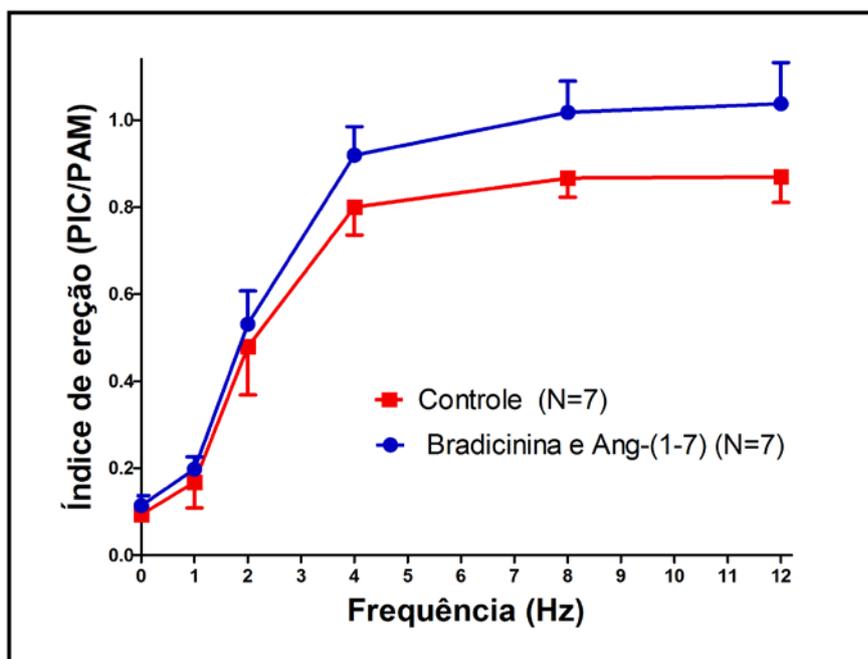


Figura 18: Efeito da infusão intracavernosa de bradicinina sobre a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e durante a infusão intracavernosa simulânea de 30 pmol/Kg/min de bradicinina e 15pmol/kg/min de Ang-(1-7) (●). Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais.

5.2.7 - Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista dos receptores B₂ para bradicinina) sobre o índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em frequências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Após 5 minutos foi realizada administração intravenosa de 30 nmol/100g de WIN64338 (solubilizados em 1% DMSO seguido da adição de solução NaCl 0,9%, volume de 1 ml/kg). Passados mais 15 minutos foi então realizado estímulo do GPM para obtenção de uma nova curva do índice de ereção. Quando se comparou a curva controle com a realizada após a aplicação de WIN64338 foi verificado que não houve diferença estatística entre os dois grupos. Esses dados mostram que o antagonista de receptores B₂ para bradicinina (WIN64338) na dose utilizada não afetou o índice de ereção obtido pela estimulação ganglionar de ratos anestesiados (Figura 20).

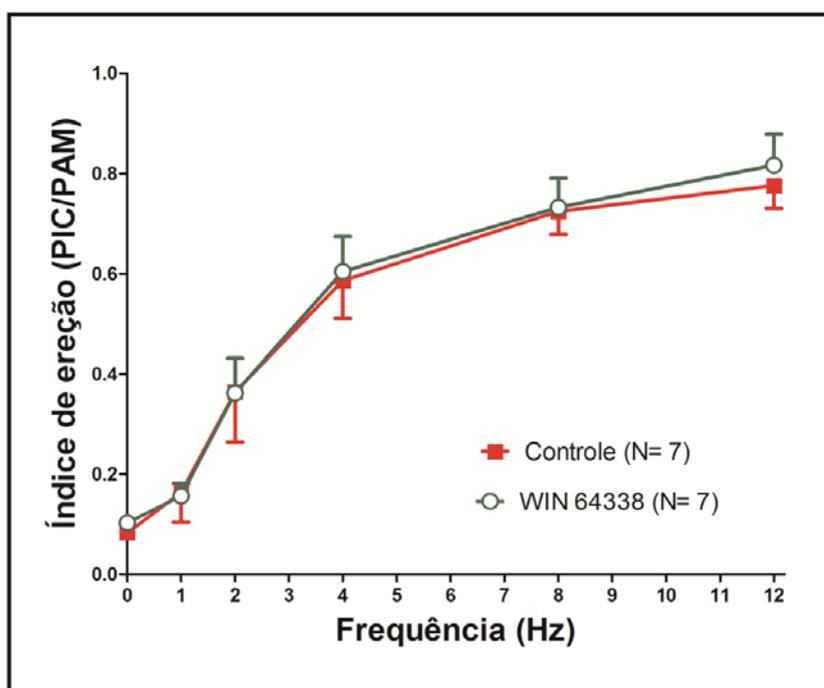


Figura 19: Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista de receptores B₂ para bradicinina) sobre a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■) e 15 minutos após a injeção intravenosa de 30 nmol/100g de WIN6438 (○). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais.

5.2.8 - Efeito do WIN64338 (antagonista dos receptores B₂ para bradicinina) sobre a facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos anestesiados

Inicialmente os animais tiveram o GPM estimulado em freqüências crescentes para obtenção da curva controle da razão PIC/PAM (índice de ereção). Duas outras curvas foram contruídas durante a infusão intracavernosa de 15 pmol/Kg/min de Ang-(1-7), uma na ausência e outra na presença 30 nmol/100g de WIN64338 (administrados intravenosamente 15 minutos antes). A infusão da Ang-(1-7) potencializou o aumento da razão PIC/PAM (índice de ereção). Essa facilitação foi atenuada nas freqüências mais altas pela presença do antagonista de receptores B₂ para a bradicinina (WIN64338). Esses resultados sugerem que os receptores B₂ participam da facilitação da resposta erétil mediada por Ang-(1-7) no modelo de ereção induzida por estimulação ganglionar de ratos anestesiados (Figura 21).

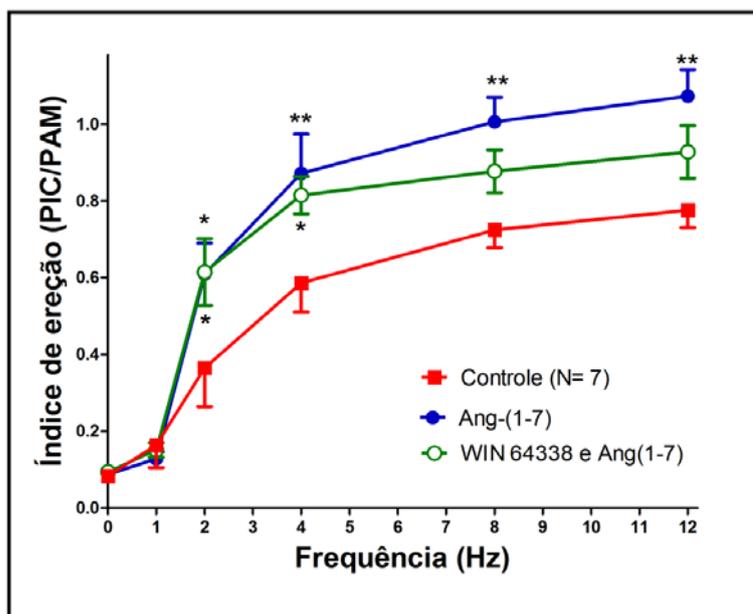


Figura 20: Efeito da administração intravenosa de WIN64338 (antagonista dos receptores B₂ para a bradicinina) sobre a facilitação mediada pela Ang-(1-7) da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados. Variação do índice de ereção (razão PIC/PAM) induzida pela estimulação elétrica do GPM nas situações controles (■), durante a infusão de 15pmol/Kg/min de Ang-(1-7) (●), e durante a infusão de Ang-(1-7) na presença de 30 nmol/Kg (I.V.) do antagonista de receptores B₂ para a bradicinina (WIN64338) (○). Cada ponto representa a média ± EPM de 7 animais. Diferença significativa em relação ao controle *p<0.05 e **p<0.01 (one-way ANOVA com comparação pós-teste de Bonferroni).



6- DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliado *in vivo* o possível envolvimento de diferentes receptores: muscarínicos (M_2 e/ou M_3), receptor do tipo B_2 para BK (B_2), e receptor AT_2 para Ang II, na facilitação da resposta erétil promovida pela Ang-(1-7) em ratos normotensos. Para isso foram utilizadas duas metodologias: avaliação do número de ereções induzidas por estimulação central pela apomorfina em animais conscientes e a medida do índice de ereção (razão PIC/PAM) em ratos anestesiados.

Estudos prévios do nosso laboratório (Costa-Gonçalves e cols, 2007) demonstraram que a Ang-(1-7) facilita a resposta erétil em ratos anestesiados e, que tal atividade é mediada pelos receptores Mas.

No presente estudo confirmamos que esse fragmento da angiotensina é capaz de potencializar a ereção (aumento na razão PIC/PAM) induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados quando infundido intracavernosamente. Demonstramos também, que a administração subcutânea de Ang-(1-7) por si só induz ereção em ratos conscientes, e na menor dose analisada facilita a resposta erétil induzida por estimulação central através da apomorfina administrada subcutaneamente.

A Ang-(1-7) é capaz de induzir ao relaxamento de vários leitos vasculares de animais normotensos e hipertensos (Fernandes et al., 2001; Ren et al., 2002; Sampaio et al., 2003, Santos et al., 2003,). Por outro lado, os resultados observados em vasos humanos, parecem controversos. Sasaki e cols. (2001) observaram vasodilatação de artérias do antebraço humano em presença de Ang-(1-7), enquanto Davie e Mc-Murray (1999) não observaram efeito algum quando os pacientes eram previamente tratados com inibidores da ECA. Em concordância com dados prévios (Ferrario et al., 2003, Nakamura et al., 2003), um papel da Ang-(1-7) na mediação do efeito hipotensor crônico da losartana em ratos normotensos também foi proposto por Collister e Hendel (2003). As ações vasculares da Ang-(1-7) parecem envolver o aumento na produção de prostanoídes vasodilatadores, NO e fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF) (Brosnihan et al., 1996; Heitsch et al., 2001; Muthalif et al., 1998).

Também já foi verificado que o corpo cavernoso produz e secreta quantidades significativas de Angiotensina II, principalmente no período de flacidez peniana (Kifor, et al., 1997). Embora não tenham sido realizadas dosagens específicas para outros peptídeos, esses pesquisadores demonstraram que a Ang-

(1-7), além de outros peptídeos do SRA, também são liberados intracavernosamente.

Nossos resultados evidenciam que a Ang-(1-7) contribui para a função erétil, facilitando a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar e aumento do número de ereções em ratos conscientes demonstrando que seu papel vai além de um mero metabólito presente no corpo cavernoso.

Investigamos então, o papel do Sistema Colinérgico na facilitação da função erétil promovida pela Ang-(1-7). O tratamento prévio com atropina subcutânea em duas doses diferentes (0,72 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ e 2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) reduziu o número de ereções induzidas por apomorfina em ratos conscientes, assim como reduziu a facilitação dessa resposta erétil induzida pela Ang-(1-7). A administração intravenosa de atropina (2,9 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) em animais anestesiados diminuiu o índice de ereção (PIC/PAM) (na frequência de 12Hz) em cerca de 20% em relação à situação controle, mas não afetou a facilitação da resposta erétil induzida pela Ang-(1-7).

Trabalho realizado por Trigo Rocha e cols. (1992) demonstrou que a administração intracavernosa de atropina diminuía de maneira significativa a pressão intracavernosa (PIC) em cães anestesiados. Já a aplicação de ACh intracavernosamente resultou num aumento de 65% a 100% a pressão intracavernosa, quando comparada àquela após estimulação elétrica dos nervos pélvicos. Vargas e cols. (2004) monitoraram os reflexos penianos em ratos que tiveram a coluna vertebral seccionada, e demonstraram que a injeção intraperitoneal de muscarina (agonista muscarínico) produzia facilitação desses reflexos. Blanco e cols. (1990) em estudo realizado em pacientes diabéticos concluíram que a condição funcional peniana neuropática dos nervos colinérgicos nos corpos cavernosos era responsável pela disfunção erétil.

Dail e cols. (1995) sugeriram que a maioria dos neurônios derivados do plexo pélvico, que são conectados com o pênis, apresenta características colinérgicas. A diminuição do número de ereções no modelo consciente com a administração subcutânea de atropina sugere o possível bloqueio de vias neurológicas descendentes, talvez relacionadas com esse plexo, importantes no processo de facilitação da ereção.

A atividade parassimpática pode causar tumescência peniana, inibindo a liberação de noradrenalina através da estimulação de receptores muscarínicos em

terminais nervosos adrenérgicos (Klinge, Sjostrand, 1997) ou pela liberação direta de NO e peptídeos vasodilatadores de fibras NANC e do endotélio vascular (Andersson, Wagner, 1995).

Os dados aqui obtidos sugerem uma contribuição importante dos mecanismos colinérgicos na resposta erétil. No entanto, parece que os receptores muscarínicos não estão envolvidos com a resposta facilitadora da Ang-(1-7), pelo menos com relação à facilitação da ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados.

Avaliamos também o papel do receptor AT_2 para Ang II na facilitação da função erétil promovida pela Ang-(1-7). A presença de PD123319, (antagonista do receptor AT_2) não afetou significativamente a resposta erétil induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados, mas reduziu a facilitação induzida pela Ang-(1-7).

Existem algumas evidências de que os efeitos da Ang-(1-7) podem ser bloqueados por PD123319 em certas condições. (Jaiswal et al., 1992 e Jaiswall et al. 1993). Muthalif e cols. (1998) relataram que a Ang-(1-7) é capaz de mediar à liberação de ácido aracdônico em aorta de coelhos e que esse efeito é inibido na presença de [D-Ala⁷]-Ang-(1-7) e PD123319. Castro e cols. (2005) constataram que em corações de camundongos a resposta vascular mediada pela interação Ang-(1-7)/receptor Mas é influenciada por mecanismos que envolvem tanto receptores AT_1 e AT_2 . A importância dos receptores AT_2 nas ações vasculares da Ang-(1-7) foi demonstrada por um aumento significativo na pressão de perfusão na presença de PD123319, sugerindo que a Ang-(1-7) estaria exercendo um efeito vasodilatador via receptores AT_2 para a Ang II.

Experimentos *in vitro* mostram também que a Ang II contrai tiras de tecido cavernoso tanto em humanos (Becker et al., 2000a) como em cães (Comiter et al. 1997). A aplicação intracavernosa de Ang II causou contração e aboliu as ereções espontâneas em cães anestesiados, enquanto a administração de losartana, (bloqueador seletivo de receptores AT_1), resultou em relaxamento da musculatura lisa e ereção (Kifor et al., 1997).

Estes dados, portanto, sugerem que a resposta facilitadora da Ang-(1-7) pode envolver a ativação de receptores AT_2 nos corpos cavernosos de ratos. Também, pode-se sugerir que o bloqueio dos receptores AT_2 favoreça o ramo pró-

detumescente mediado pela interação da Ang II com receptores AT₁.

Finalmente, foi avaliado o papel da BK e dos receptores B₂ e uma possível interação dos mesmos com a resposta facilitadora da Ang-(1-7). Surpreendentemente, quando foi comparado o índice de ereção na situação controle com o obtido após a aplicação intracavernosa da BK foi verificado que nas frequências 2 e 4Hz houve uma diminuição da razão (PIC/PAM). A infusão intracavernosa da mistura de BK com Ang-(1-7) causou redução da resposta facilitadora da ereção induzida por estimulação ganglionar mediada por Ang-(1-7) em ratos anestesiados. Quando foi infundido intracavernosamente um antagonista dos receptores B₂ (WIN64338) foi verificado que ele por si só não alterou o índice de ereção (razão PIC/PAM) na situação controle, e que a administração intracavernosa de WIN64338 diminuiu nas frequências maiores (8 e 12Hz) a resposta facilitadora da Ang-(1-7).

Uma série de estudos vem demonstrando que a BK pode aumentar a pressão arterial ou causar uma resposta bifásica (vasodilatadora e vasoconstritora). No leito vascular mesentérico de ratos a BK relaxa as artérias e promove constrição das veias (Northover e Northover, 1970). Em rins isolados e artérias da orelha de coelhos também foi demonstrado que a BK provoca tal efeito (Barabe et al., 1979). Também em coelhos, Yu e cols. (1998) mostraram que a BK apresenta efeito bifásico sobre as arteríolas aferentes. Fasciolo e cols. (1990) demonstraram que a BK induz vasoconstrição de artérias mesentéricas de ratos pré-contráidas com noradrenalina.

A ação potencializadora da Ang-(1-7) sobre o efeito vasodilatador da BK é controversa em leitos vasculares humanos. Ueda e cols. (2001) observaram potencialização ao passo que Wilsdorf e cols. (2001) mostraram que a Ang-(1-7) não potencializa o efeito vasodilatador ou ativador de plasminogênio tecidual induzido pela BK na vasculatura do antebraço humano.

Becker e cols. (2001) demonstraram em experimento realizado com tiras de corpo cavernoso humano que a bradicinina apresentava efeito vasodilatador.

Estes dados sugerem que a BK, diferentemente de estudos realizados *in vitro* por Becker e cols. (2001), apresenta efeito constritor em tecidos penianos de ratos anestesiados. A tentativa de correlacionar resultados obtidos *in vitro* com a clínica é tarefa difícil; por isso, metodologias *in vivo* são mais pertinentes para o estudo de

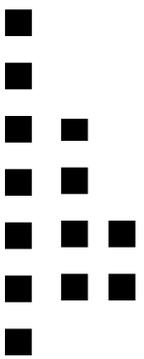
vias fisiológicas ou para efeito farmacológico de drogas, em que pesem as diferenças entre ensaios experimentais e clínicos. Também não foi encontrado relatos na literatura de efeitos vasodiladores da BK quando infundida diretamente no corpo cavernoso de animais.

Considerando a possível interação da Ang-(1-7) com receptores do tipo B₂ de BK alguns estudos demonstram que o efeito vasodilatador deste peptídeo está relacionado de alguma forma a esse sítio de ação. Em artérias coronárias de cães, o relaxamento induzido pela Ang-(1-7), foi diminuído na presença do icatibant (Hoe 140), um antagonista dos receptores de BK do tipo 2 (B₂) (Brosnihan et al., 1994; Seyedi et al., 1995). Pörsti e cols (1994) demonstram que o relaxamento induzido por Ang-(1-7) em artérias coronárias de porcos em preparação de leito perfundido era também substancialmente diminuído na presença de antagonista B₂ (icatibant).

Em nosso estudo, foi verificado que o uso de um antagonista do tipo B₂ para BK (WIN33648) interferiu na facilitação da função erétil promovida pela Ang-(1-7) nas frequências mais altas analisadas, sugerindo que esses receptores tenham um papel importante no efeito vasodilatador promovido pelo heptapeptídeo angiotensinérgico.

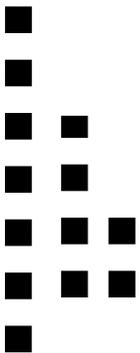
De acordo com Deddish e cols. (1998) algumas ações da Ang-(1-7) podem ser mediadas por potencialização de BK endógena através da facilitação de um mecanismo de “cross-talk” entre ECA e receptor do tipo 2 para BK. A ligação de Ang-(1-7) à ECA facilitaria a interação hidrolítica da ECA e receptor B₂, levando à potencialização de BK endógena, independente da interferência com a hidólise de BK.

Porém, mais estudos são necessários para elucidar que mecanismos estão envolvidos quando a BK e a Ang-(1-7) são administrados diretamente no corpo cavernoso de animais, de que maneira a Ang-(1-7) interage com os receptores B₂ e quais vias (dependentes de prostanóides, vasodiladores e NO) estão relacionadas com essa interação no corpo cavernoso peniano.



VII - A administração intravenosa do antagonista dos receptores B₂ para a bradicinina (WIN64338) não afetou a resposta erétil induzida por estímulo do GPM, mas atenuou a resposta facilitadora da Ang-(1-7) sobre a ereção induzida por estimulação ganglionar em ratos anestesiados.

Os dados obtidos nesse estudo demonstram que o efeito facilitador da resposta erétil induzido pela Ang-(1-7) parece envolver direta ou indiretamente a ativação dos receptores B₂ e AT₂. Nossos dados também indicam uma contribuição relevante do sistema colinérgico na resposta erétil peniana, especialmente naquela originária de estímulos centrais. Além disso, os resultados aqui apresentados sugerem que a bradicinina apresenta um efeito constritor quando infundida diretamente no corpo cavernoso de animais anestesiados. Nossos resultados confirmam o importante papel fisiológico do eixo “ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas” no processo de ereção peniana de ratos conscientes e anestesiados. Esses achados indicam um potencial terapêutico para manobras capazes de aumentar a produção da Ang-(1-7) e/ou para substâncias capazes de ativar os receptores seletivos para esse peptídeo no tratamento da disfunção erétil.



Abdo, C.H.N., Oliveira, W.M.Jr., Scanavino, M.T., Martins, F.G. (2006). Disfunção erétil-Resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. Rev Assoc Med Bras; 52(6): 424-9.

Aytaç 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. BJU Int.; 84: 50 -56.

Almeida, A.P., Frabregas, B.C., Madureira, M.M., Santos, R.J., Campagnole-Santos, M.J. & Santos, R.A. (2000). Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. Braz J Med Biol Res, 33, 709-13.

Andersson, K.E. & Stief, C.G. (1997). Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. World J Urol, 15, 14-20.

Andersson KE & Wagner G. (1995). Physiology of penile erection. Physiol. Rev. 75:191-236.

Azadzoi, K.M., Vlachiotis, J., Pontari, M. & Siroky, M.B. (1995). Hemodynamics of penile erection: III. Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. J Urol, 153, 521-6.

Barabe, J., Marceau, F., Theriault, B., Drouin, J.N. & Regolid, D. (1979) Cardiovascular actions of kinins in the rabbit. Can. J. Physiol. Pharmacol., 57, 78-91.

Basu, A. & Ryder, R.E. (2004). New treatment options for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. Drugs, 64, 2667-88.

Becker, A.J., Uckert, S., Stief, C.G., Scheller, F., Knapp, W.H, Hartmann, U., and Jonas U. (2000). Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. Int. J. Impot. Res. 18, 26-30.

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, 193-8.

Bhoola KD, Figueroa CD & Worthy K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, Kininogens and kininases. Pharmacological Reviews, 44: 1-80.

Blanco, R. Saenz de Tejada, I, Goldstein, I., Krame, R.J., Wotiz, H.H., Cohen, R.A. (1990). Dysfunctional penile cholinergic nerves in diabetic impotent men. J. Urol. 144 (2) 278-80.

Brosnihan, K.B., Li, P. & Ferrario, C.M. (1996). Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. Hypertension, 27, 523-8.

Burch, R.M. & Kyle, **8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

D.J. (1992) Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.*, 50: 829-38.

Busche, S., Gallinat, S., Bohle, R.M., Reinecke, A., Seebeck, J., Franke, F., Fink, L. Zhu, M., Summers, C., Unger, T (2000). Expression of Angiotensin AT1 and AT2 Receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. *Am. J. Pathol*, 157, p.605-611.

Burnett, A.L. (1995). Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod*, 52, 485-9.

Burnett, A.L., Chang, A.G., Crone, J.K., Huang, P.L. & Sezen, S.E. (2002). Noncholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *J Androl*, 23, 92-7.

Burnett, A.L., Nelson, R.J., Calvin, D.C., Liu, J.X., Demas, G.E., Klein, S.L., Kriegsfeld, L.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. & Snyder, S.H. (1996). Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med*, 2, 288-96.

Busse, R.; Fleming, I., (1996) Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes*, v.45, p. S8-S13.

Campbell, D.J. (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 784-91.

Canals, M., Jenkins, L., Kellett, E. & Milligan, G. (2006). Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS. *J Biol Chem*, 281, 16757-67.

Carey, R.M. & Siragy, H.M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*, 24, 261-71.

Carvalho, M.B.L.; Duarte, F.V.; Faria-Silva, R.; Fauler, B.; Da Mata Machado L;T.; De Paula, R. D.; Capagnole-Santos, M. J.; Santos, R.A.S. (2007). Evidence for Mas-Mediated Bradykinin Potentiation by the ANgiotensin-(1-7) Nonpeptide Mimic AVE 0991 in Normotensive Rats. *Hypertension* 50:762-767.

Castro, C.H., Santos, R.A., Ferreira, A.J., Bader, M. Alenina, N, Almeida, A.P. (2005). *Hypertension*, 46 (4): 937-42.

Cashen, D.E., MacIntyre, D.E. & Martin, W.J. (2002). Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 136, 693-700.

Clark, M.A., Tallant, E.A., Tommasi, E. Bosh, S., Diz, D.I. (2003) Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase dependent mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 41(2), 276-283.

Cellek, S., Moncada, S. (1997). Nitroergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:8226–8231.

Collister, J.P. & Hendel, M.D. (2003). The role of Ang (1-7) in mediating the chronic hypotensive effects of losartan in normal rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 4, 176-9.

Comiter, C.V., Sullivan, M.P., Yalla, S.V., Kifor, I. (1997) Effect of angiotensin II on corpus cavernosum smooth muscle in relation to nitric oxide environment: in vitro studies in canines. *Int. J. Impot. Res*. 9:135–140.

Costa-Gonçalves, A.C., Leite, R., Fraga-Silva, R., Pinheiro, S., Reis, A., Reis, F., Touyz, R., Webb, R.C., A Lenina, N., Bader, M. & Santos, R.A.S. (2007). Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. *Am J Physiol Heart and Circulatory Physiology*, 293:H2588-96.

Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S.E., Oliveira-dos-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y. & Penninger, J.M. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 417, 822-8.

Dail, W. G., Barba, V., Leyba, L. and Galindo, R. (1995) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*, 282: 109.

Davie, A.P. & McMurray, J.J. (1999). Effect of angiotensin-(1-7) and bradykinin in patients with heart failure treated with an ACE inhibitor. *Hypertension*, 34, 457-60.

De Nucci, G., Warner, T., Vane, J.R. (1988). Effect of captopril on the bradykinin-induced release of prostacyclin from guinea-pig lungs and bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol*, 95: 783-788.

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, S40-2.

Ding, Y.Q., Takada, M., Kaneko, T. & Mizuno, N. (1995). Colocalization of vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide in penis-innervating neurons in the major pelvic ganglion of the rat. *Neurosci Res*, 22, 129-31.

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E. & Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, E1-9.

Erdos, E.G., Jackman, H.L., Brovkovich, V., Tan, F. & Deddish, P.A. (2002). Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol*, 34, 1569-76.

- Escrig, A., Gonzalez-Mora, J.L. & Mas, M. (1999). Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J Physiol*, 516 (Pt 1), 261-9.
- Fasciolo, J.C., Vargas, L., Lama, M.C., Nolly, H. (1990). Bradykinin-induced vasoconstriction of rat mesenteric arteries precontracted with noradrenaline. *British J. Pharmacol.* 101, 344—348.
- Feres T, Paiva ACM & Paiva TB. (1992). BK1 and BK2 bradykinin receptors in the rat duodenum smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 107: 991-995.
- Fernandes, L., Fortes, Z.B., Nigro, D., Tostes, R.C., Santos, R.A. & Catelli De Carvalho, M.H. (2001). Potentiation of bradykinin by angiotensin-(1-7) on arterioles of spontaneously hypertensive rats studied in vivo. *Hypertension*, 37, 703-9.
- Ferrario, C.M. (2002). Angiotensin I, angiotensin II and their biologically active peptides. *J Hypertens*, 20, 805-7.
- Ferrario, C.M. (2003). Commentary on Tikellis et al: There is more to discover about angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, 41, 390-1.
- Ferrario, C.M. (2003a). Contribution of angiotensin-(1-7) to cardiovascular physiology and pathology. *Curr Hypertens Rep*, 5, 129-34.
- Ferrario, C.M. (2002a). Does angiotensin-(1-7) contribute to cardiac adaptation and preservation of endothelial function in heart failure? *Circulation*, 105, 1523-5.
- Ferrario, C.M. & Chappell, M.C. (2004). Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2720-7.
- Ferrario, C.M., Chappell, M.C., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B. & Diz, D.I. (1997). Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, 30, 535-41.
- Ferrario, C.M. & Iyer, S.N. (1998). Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul Pept*, 78, 13-8.
- Ferrario, C.M., Jessup, J., Chappell, M.C., Averill, D.B., Brosnihan, K.B., Tallant, E.A., Diz, D.I. & Gallagher, P.E. (2005). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation*, 111, 2605-10.
- Ferreira, A.J., Santos, R.A. & Almeida, A.P. (2002). Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*, 35, 1083-90.
- Ferreira, A.J., Santos, R.A. & Almeida, A.P. (2001). Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 38, 665-8.
- Fleming I. (2006) Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res* 98: 887-896.

Fournier, G.R., Jr., Juenemann, K.P., Lue, T.F. & Tanagho, E.A. (1987). Mechanisms of venous occlusion during canine penile erection: an anatomic demonstration. *J Urol*, 137, 163-7.

Gironacci, M.M., Adler-Graschinsky, E., Pena, C. & Enero, M.A. (1994). Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [3H]norepinephrine from rat atria. *Hypertension*, 24, 457-60.

Giuliano, F., Rampin, O., Bernabe, J. & Rousseau, J.P. (1995). Neural control of penile erection in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 55, 36-44.

Gonzalez-Cadavid, N.F., Ignarro, L.J. & Rajfer, J. (1999). Nitric Oxide and the Cyclic GMP System in the Penis. *Mol Urol*, 3, 51-59.

Gorelik, G., Carbini, L. A., & Scicli, A. G. (1998). Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 286, 403-410.

Hatzimouratidis, K. & Hatzichristou, D.G. (2005). A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient? *Drugs*, 65, 1621-50.

Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson K-E.(2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J Urol*; 164: 868 -875.

Heitsch, H., Brovkovich, S., Malinski, T. & Wiemer, G. (2001). Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*, 37, 72-76.

Hempelmann, R.G., Papadopoulos, I. & Herzig, S. (1995). Non-synergistic relaxant effects of vasoactive intestinal polypeptide and SIN-1 in human isolated cavernous artery and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol*, 276, 277-80.

Impotence: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. NIH, DHHS. December 7-9, 1992; 10(4):1-31.

Ishiyama, Y., Gallagher, P.E., Averill, D.B., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B. & Ferrario, C.M. (2004). Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*, 43, 970-6.

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, 356-61.

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, 265-76.

Jaiswal, N., Diz D.I., Chappell, M.C., Khosla, M.C., Ferrario, C.M. (1992). Stimulation

of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. *Hypertension (Supp III)* 19:49–55.

Jaiswal, N., Tallant, E.A., Jaiswal, R.K., Diz, D.I., Ferrario, C.M. Differential regulation of prostaglandin synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells: Subtypes of angiotensin receptors involved (1993). *J Pharmacol. Exp. Ther.* 265:664–73.

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, and Inagami T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 268: 24543-24546, 1993.

Kerwin, J.F.; Lancaster, J.R.; Feldman, P.L. (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem.* 38: 4343-4362.

Kifor, I., Williams, G.H., Vickers, M.A., Sullivan, M.P., Jodbert, 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, 1920-5.

Kim, Y.C., Kim, J.H., Davies, M.G., Hagen, P.O. & Carson, C.C., 3rd (1995). Modulation of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-mediated relaxation by nitric oxide and prostanoids in the rabbit corpus cavernosum. *J Urol*, 153, 807-10.

Kimoto, Y. Kessler, R., Constantinou, C.E.- Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *J. Urol.*, 144: 1015-1017., 1990.

Kimoto, Y., Kumazawa, J., Kessler, R., Constantinou, C.E.- Endothelium dependent relaxation of human corpus cavernosum by bradykinin. *Jpn. J. Pharmacol.* 58:321P, 1992.

Kimura, F., Baughman, R.W. (1997). Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *Journal of Neurophysiology.* 77 (2), 709-716.

Knispel HH, Goessl C, Beckmann R. Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. *J Urol.* 1991;146:1429–1433.

Kirkpatrick, C.J., Bittinger, F., Unger, R.E., Kriegsmann, J., Kilbinger, H., Wessler, I. (2002) The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible Pathobiological significance. *Jpn.J.Pharmacol.* 85, p24-28.

Kitamura, N.; Kitagawa, H.; Fukushima, D.; Takagaki, Y; Myiata, T.; Nakanishi, S. (1986) Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J.Biol.Chem.*, 260:8610-17.

Klinge, E., Sjostrand, N.O., (1977). Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission, a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle. *Acta. Physiol. Scand*, 100, 368-76.

Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C.F., Heringer-Walther, S., Sexton, P.M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H.P. & Walther, T. (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, 111, 1806-13.

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, 774-9.

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.

Lue, TF, (2002). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. In: *Campbell's Urology*. 8ed. Philadelphia: Saunders, p. 1591-1618.

Lundberg JM (1996) Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 48:113–178.

Maddedu, P.; Varoni, M.V.; Palomba, D., Emanuelli, C.; Demontis, M.P.; Glorioso, N.; Dessi-Flugeri, P.; Sarzani, R.; Anania, V. (1997) Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykin B2-receptor gene. *Circulation*, v.96, n.10, p.3570-3578.

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, 685-91.

Marceau, F.; Hess, JF.; Bachvarov, D.R. (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.*, v.50, p357-86.

Margolius, H.S. (1995). Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension*, 26: 221-9.

Maróstica, E. Guaze, E.F., Avellar, M. C. W., Porto, C. S. (2001) Characterization of muscarinic Acetylcholine receptors in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 65, p1120-1126.

McMahon, C.N., Smith, C.J. & Shabsigh, R. (2006). Treating erectile dysfunction when PDE5 inhibitors fail. *Bmj*, 332, 589-92.

Mesulam, M.M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A. (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* v. 110, p. 627-639,

Menke, J.G.; Borkowski, J. A., Bierilo, K.K.; Macneil, T.; Derrick, A.W.; Sshneck, K.A.;

Ransom, R.W.; Strander, C.D.; Linemayer, D.L.; Hess, J.F. (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21582-7.

Metzger, R., Bader, M., Ludwig, T., Berberich, C., Bunnemann, B. & Ganten, D. (1995). Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett*, 357, 27-32.

Min, L., Sim, M.K. & Xu, X.G. (2000). Effects of des-aspartate-angiotensin I on angiotensin II-induced incorporation of phenylalanine and thymidine in cultured rat cardiomyocytes and aortic smooth muscle cells. *Regul Pept*, 95, 93-7.

Moreland RB, Hsieh G, Nakane M, Brioni J. (2001) The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:225–234.

Muthalif, M.M., Benter, I.F., Uddin, M.R., Harper, J.L. & Malik, K.U. (1998). Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 388-98.

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, R164-73.

Nangle, M.R., Cotter, M.A. & Cameron, N.E. (2004). An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. *Pflugers Arch*, 448, 139-45.

Northover, R.M. & Northover, B.J. (1970). The effect of vasoactive substances on rat mesenteric blood vessels. *J. Pathol.*, 101,99-108.

Okamura, T., Ayajiki, K. & Toda, N. (1998). Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol*, 274, H1075-81.

Paula, R.D., Lima, C.V., Khosla, M.C. & Santos, R.A. (1995). Angiotensin-(1-7)potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*, 26, 1154-9.

Peach, M. (1977) Renin–angiotensin system: biochemistry and mechanism involved. of action. *Physiol Rev.* 57:313–70.

Pesquero, J.B., Lindsey, C.J., Zeh, K., Paiva, A.C.M., Ganten, D. Bader, M. Molecular Structure and expression of rat Bradykinin. *The Journal of Biological Chemistry*, V.269, N43, p.269200-26925,1994.

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. & Pörsti, I., Bara, A.T., Busse, R., Hecker, M. (1994). Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel

angiotensin receptor. *Br J Pharmacol.* 111:652-654.

Santos, R.A. (2004). Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*, 44, 490-6.

Seyedi, N., Xu X., Nasjletti A, Hintze, T.H. (1995). Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*. 26:164.

Podlasek, C.A., Gonzalez, C.M., Zelner, D.J., Jiang, H.B., McKenna, K.E. & McVary, K.T. (2001). Analysis of NOS isoform changes in a post radical prostatectomy model of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 13 Suppl 5, S1-15.

Racké, K., Matthiesen, S. (2004). The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 17, 181-198.

Rajasekaran, M., Mondal, D., Agrawal, K., Chen, I.L., Hellstrom, W. & Sikka, S. (1998). Ex vivo expression of nitric oxide synthase isoforms (eNOS/iNOS) and calmodulin in human penile cavernosal cells. *J Urol*, 160, 2210-5.

Ramalho, F.S. (2000). A Regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Acta Cir. Bras.* 15 (2), 91-91.

Regoli, D. & Barabe. (1980) *J. Pharmacology of bradykinin and related kinins.* *Pharmacol. Rev.*, 32: 1-46.

Ren, Y., Garvin, J.L. & Carretero, O.A. (2002). Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*, 39, 799-802.

Reudelhuber, T.L. (2005). The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14, 155-9.

Roks, A.J., van Geel, P.P., Pinto, Y.M., Buikema, H., Henning, R.H., de Zeeuw, D. & van Gilst, W.H. (1999). Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension*, 34, 296-301.

Sampaio, W.O., Nascimento, A.A. & Santos, R.A. (2003). Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H1985-94.

Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J. & Andrade, S.P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*, 91, 45-62.

Santos, R.A., Passaglio, T.K., Pesquero, J.B., Bader, M., Simões e Silva, A.C., (2001) Interactions between angiotensina-(1-7), Kinins, and Angiotensin II in kidney and blood Vessels. *Hypertension*, 38 (parte2): 660-664.

Santos, R.A., Ferreira, A.J., Pinheiro, S.V., Sampaio, W.O., Touyz, R. & Campagnole-Santos, M.J. (2005). Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, 14, 1019-31.

Santos, R.A., Pinheiro, S.V.B, Ferreira, A.J., (2007) The ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis and cardioprotection. *Current Cardiology Reviews*, 3 (1), p.57-64.

Santos, R.A., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R. & Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8258-63.

Sarter, M., Parikh, V.(2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature reviews*, v. 6, p. 48-56.

Sasaki, S., Higashi, Y., Nakagawa, K., Matsuura, H., Kajiyama, G. & Oshima, T. (2001). Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension*, 38, 90-4.

Scheneck, K.A.; Hess, J.F.; Stonesifer, G.Y.; Ransom, R.W. (1994). Bradykinin B1 receptors in rabbit aorta smooth muscle cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.*, 266: 277-82.

Schmaier, A.H. (2003). The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R1-13.

Sezen, S.F. & Burnett, A.L. (2000). Intracavernosal pressure monitoring in mice: responses to electrical stimulation of the cavernous nerve and to intracavernosal drug administration. *J Androl*, 21, 311-5.

Sigmund, C.D. (2001). Genetic manipulation of the renin-angiotensin system: targeted expression of the renin-angiotensin system in the kidney. *Am J Hypertens*, 14, 33S-37S.

Silva, D.M.R., Vianna, H.R., Cortes, S.F., Campagnole-Santos, M.J., Santos, R.A.S, Lemos, V.S.(2007) Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides* 28, 702-707.

Soares de Moura, R., Resende, A.C., Emiliano, A.F., Tano, T., Mendes-Ribeiro, A.C., Correia, M.L. & de Carvalho, L.C. (2004). The role of bradykinin, AT2 and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol*, 141, 860-6.

Soreq, H. Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 294-302.

Stegbauer, J., Oberhauser, V., Vonend, O. & Rump, L.C. (2004). Angiotensin-(1-7) modulates vascular resistance and sympathetic neurotransmission in kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 61, 352-9.

Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G. & Turner, A.J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 275, 33238-43.

Tom, B., de Vries, R., Saxena, P.R. & Danser, A.H. (2001). Bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) and ACE inhibitors correlates with ACE C- and N-domain blockade. *Hypertension*, 38, 95-9.

Toque, H.A., Teixeira, C.E., Lorenzetti, R., Okuyama, C.E. Antunes, E., De Nucci. (2008). Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharm.* 591: 189-195.

Traish, A.M., Carson, M.P., Kim, N., Goldstein, I., Saenz de Tejada, I. (1990). Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. *J Urol.* 144:1036–1040, 1990.

Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, and Moreland RB (1995). Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor* 5:159–176.

Trigo-Rocha, F.; Hsu,G.L.; Donatucci, C.F.; LUE, T.F.(1993)- The role of cyclic adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, endothelium and nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in canine penile erection. *J. Urol.*, 149: 872-7.

Toselli P, Moreland R, and Traish AM (1994) Detection of m2 muscarinic acetylcholine receptor mRNA in human corpus cavernosum by in-situ hybridization. *Life Sci*55:621–627.

Turko, IV, Ballard, S.A., Francis, S.H., Corbin, J.D. (1999). Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Molec Pharmacol.*56:124–130.

Turner, A.J., Tipnis, S.R., Guy, J.L., Rice, G. & Hooper, N.M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol*, 80, 346-53.

Ueda, S., Masumori-Maemoto, S., Wada, A., Ishii, M., Brosnihan, K.B. & Umemura, S. (2001). Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *J Hypertens*, 19, 2001-9.

Vargas, V.M., Torres, D., Corona, F. Vergara, M., Gómez, L.E., Delgado-Lezama, R., Cueva-Rolón. (2004) Cholinergic facilitation of erection and ejaculation in spinal cord-transected rats. *International Journal of Impotence Research* 16, 86-90.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A. & Tummino, P. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*, 277, 14838-43.

Welches, W.R., Brosnihan, K.B. & Ferrario, C.M. (1993). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci*, 52, 1461-80.

Welches, W.R., Santos, R.A., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Greene, L.J. & Ferrario, C.M. (1991). Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens*, 9, 631-8.

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, 847-52.

Wilsdorf, T., Gainer, J.V., Murphey, L.J., Vaughan, D.E. & Brown, N.J. (2001). Angiotensin-(1-7) does not affect vasodilator or TPA responses to bradykinin in human forearm. *Hypertension*, 37, 1136-40.

Yamamoto, K., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B. & Ferrario, C.M. (1992). In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 19, 692-6.

Young, D., Waitches, G, Birchmeier, C, Fasano, O, Wigler, M. (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 6;45(5):711-9.

Yousif, M.H.M., Kehindle, E.O. & Benter, I.F. (2007). Different responses to Angiotensin-(1-7) in young, aged and diabetic rabbit corpus cavernosum. *Pharmacological Research*, *Pharmacological research* , 56 (3) : P.209-216

Zohn, I.E., Symons, M., Chrzanowska-Wodnicka, M., Westwick, J.K. & Der, C.J. (1998). Ras oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol Cell Biol*, 18, 1225-35.