

### FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ CARVALHO

"Efeito da reposição de insulina nas alterações funcionais e morfológicas do corpo cavernoso, no diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos"

> Campinas 2012



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

### FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ CARVALHO

## "Efeito da reposição de insulina nas alterações funcionais e morfológicas do corpo cavernoso, no diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos"

Orientador: Prof. Dr. Giberto De Nucci

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ CARVALHO E ORIENTADA PELO PROF. DR. GILBERTO DE NUCCI

Assinatura do Orientador

.....

Campinas 2012

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

C253e Carvalho, Fernanda Del Grossi Ferraz, 1978-Efeito da reposição da insulina nas alterações funcionais e morfológicas do corpo cavernoso, no diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos / Fernanda Del Grossi Ferraz Carvalho. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012. Orientador : Gilberto De Nucci. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Disfunção erétil. 2. Diabetes. 3. Sulfeto de hidrogênio. I. De Nucci, Gilberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Effect of insulin replacement in functional and morphological changes of the corpus cavernosum in streptozotocin---induced diabetic mice. **Palavras-chave em inglês:** 

Erectile dysfunction

Diabetes

Hydrogen sulfide

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

#### Banca examinadora:

Gilberto De Nucci [Orientador] Gabriel Forato Anhe

Marcos Antonio Tambascia

Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Carlos Renato Tirapelli

Data da defesa: 13-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

# Banca Examinadora de Tese de Doutorado

### FERNANDA DEL GROSSI FERRAZ CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Gilberto de Nucci

Membros:
Prof. Dr. Gilberto de Nucci
Prof. Dr. Gabriel Forato Anhe
7
Prof. Dr. Marcos Antonio Tambascia
Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

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

Data: 13/11/2012

O Senhor (...) Deus aos homens número preciso de dias e tempo determinado, deu-lhes poder sobre tudo o que está sobre a terra. Revestiu-os de força como a si mesmo,

Criou-os à sua imagem.

(...)

Dotou-os de língua, olhos, ouvidos e lhes deu um coração para pensar. Encheu-os de conhecimento e inteligência e mostrou-lhes o bem e o mal. Pôs sua luz nos seus corações, para lhes mostrar a grandeza de suas obras.

(...)

Concedeu-lhes o conhecimento, repartiu com eles a lei da vida.

Fez com eles uma aliança eterna (...)".

Eclesiático 17, 1-3; 6-10.

Aos meus pais,

Walter e Heloisa

Agradecimentos

Aos meus pais, Heloisa e Walter, por tornarem tudo possível, com apoio e amor sem fim; À minha avó Margarida, por todo amor;

Ao Professor Dr. Gilberto De Nucci pela orientação, amizade e oportunidades;

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, por toda a ajuda neste trabalho;

Ao Prof. Dr. André A. Schenka pelas análises histológica e imunoistoquímica;

À Profa Dra Fabiola Monica Iglesias, pelas análises de pressão Intracavernosa;

Ao Luiz Osório Leiria por toda a ajuda no tratamento dos animais;

À Priscila Fukumura Monteiro pela ajuda na dosagem de colesterol e triglicerídeos;

A todos os amigos do Laboratório de Farmacologia, em especial ao Laboratório "Cascata" pela convivência e amizade, e por tornarem meus dias tão agradáveis;

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

Ao Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira (in memorian).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado – 2007/05024-4 (2007-2011).

Sumário

Lista de drogas	15
Lista de abreviações	18
Lista de tabelas	22
Lista de figuras	24
Resumo	28
Abstract	31
1. Introdução	34
1.1. Anatomia e fisiologia da ereção peniana	34
1.2. Aspectos moleculares da ereção peniana	37
1.3. Disfunção erétil no diabetes mellitus	40
1.4. Outros possíveis mediadores envolvidos na ereção peniana: via do sulfeto do	
hidrogênio	42
1.4.1. Sulfeto de Hidrogênio- Síntese e Degradação	42
1.4.2. Farmacologia do sulfeto de hidrogênio na musculatura vascular e não	43
vascular	16
Justificativa	40
2.Objetivos	48

3.1. Animais de Experimentação	51
3.2. Indução do Diabetes e Grupos Experimentais	51
3.3. Preparação de Corpo Cavernoso <i>In Vitro</i> e Protocolos Experimentais	52
3.4. Medida da função erétil <i>in vivo</i>	53
3.5. Análise de colesterol e triglicerídeos dos animais	54
3.6 Análise macroscópica e histológica dos animais	54
3.6.1. Exame macroscópico e processamento histológico	54
3.6.2 Análise de imagem	54
3.6.3.Determinação da expressão de eNOS e nNOS pela técnica de	
imunoistoquímica	55
3.9.Análise Estatística	56
4 Resultados	59
4.1. Indução do diabetes	59
4.2. Relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh)	60
4.3. Relaxamento induzido pelo nitroprussito de sódio (SNP)	61
4.4. Relaxamento induzido pela estimulação elétrica (EFS)	62
4.5. Relaxamento induzido pelo Tadalafil	63
4.6. Relaxamento induzido pelo Y-27632	64

51

4.7 Relaxamento induzido pelo Bay 41-2272	65				
4.8. Relaxamento induzido pelo Bay 60-2770	70				
4.9. Contração induzida pela fenilefrina (PE)	73				
4.10. Contração induzida pela estimulação elétrica	75				
4.11. Relaxamento induzido pela L-cisteína (L-cys)	76				
4.12. Relaxamento induzido pelo Na <sub>2</sub> S	77				
4.13. Relaxamento induzido pelo Dimetilsulfóxido (DMSO)	78				
4.14. Relaxamento induzido pela Dimetilsulfona (DMSO <sub>2</sub> )	79				
4.15. Avaliação da função erétil in vivo: medida da Pressão Intracavernosa (ICP)	80				
4.16. Análise de colesterol e triglicerídeos dos animais	81				
4.17. Análise macroscópica e histológica dos animais	82				
5.Discussão	89				
6. Conclusões					
7. Referências Bibliográficas	101				

Lista de Drogas

Substância	Procedência
Acetilcolina	Sigma
Bay 41-2272	Bayer
Bay 60-2770	Bayer
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Dextrose	Synth
Fenilefrina	Sigma
Y-27632	Sigma
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
L-NAME	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
ODQ	Sigma
SNP	Sigma
L-cisteina	Sigma

DMSO

Sigma

DMSO2

Sigma

Lista de Abreviações

Ach: acetilcolina

AGE: Produtos finais da glicação avançada

AAOA: aminooxiacetato

AMP: Monofosfato cíclico de adenosina

ApoE --- : knockout para apolipoproteína E

ATP: trifosfato de adenosina

Bay 41: Bay 41-2272

Bay 60: Bay 60-2770

Ca<sup>2+</sup>: íons cálcio

CC: corpo cavernoso

CBS: cistationina  $\beta$ -sintase

CE: corpo esponjoso

CSE: cistationina  $\delta$ -liase

CO: monóxido de carbono

CTL: grupo de animais controle

ED: disfunção erétil

DM: grupo de animais diabéticos

DM-I: grupo de animais tratados com insulina

DMSO: dimetilsulfósicdo

DMSO<sub>2</sub>: dimetilsulfona

CTL: camundongos C57bl/6 controle

DAG: diacilglicerol

E<sub>max</sub>: resposta máxima

EFS: estimulação elétrica

GCs: guanilato ciclase soúvel

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

H<sub>2</sub>S: Sulfeto de Hidrogênio

ICP:pressão intracavernosa

IP3: trifosfato de inositol

KATP: canais de potássio dependentes de ATP

L-NAME: éster metílico de N<sup> $\omega$ </sup>-nitro-L-arginina

L-cys: L-cisteína

MAPK: proteína quinase ativada mor mitogenos

MeHb: meta-hemoglobina

MLCK: cinase da cadeia leve da miosina

MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina

NANC: não-adrenérgico, não-colinérgico

nNos: sintase neuronal de óxido nítrico

NO: óxido nítrico

NOS: sintase do óxido nítrico

ODQ: 1,2,4-oxodiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one

PAG: propargilglicina

PBS: tampão fosfato

PE: fenilefrina

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

pEC<sub>50</sub>: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

SNP: nitroprussiato de sódio

SOD: superóxido dismutase

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

TAD: tadalafil

TMT: tiometiltransferase

Lista de Tabelas

Tabela	1.	Valores	da	concentração	de	glicose	sanguínea	dos	grupos	controle	(CTL)	
diabétic	co (	DM) e di	abé	tico tratado c	om	insulina	(DM-I)	••••				59

Tabela 2. Valores de peso corporal dos grupos controle (CTL)diabético, (DM) e diabéticotratado com insulina (DM-I)60

Tabela 4. Valores da concentração de glicose sanguínea dos grupos controle (CTL,diabético (DM) e diabético tratado com insulina (DM-I)82

Tabela 5. Avaliação histomorfométrica dos grupos controle (CTL), diabético (DM)diabético tratado com insulina (DM-I).83

Lista de figuras

Figura 1: Principais vias de síntese do H <sub>2</sub> S <i>in vivo</i>	43
Figura 2: Curvas concentração-efeito à acetilcolina em corpo cavernoso de camundongos	
controle, diabético e diabético tratado com insulina nítrico	61
Figura 3: Curvas concentração-efeito ao Nitroprussiato de Sódio em corpo cavernoso de	
camundongos controle, diabético e diabético tratado com insulina nítrico	62
Figura 4: Curvas frequência-efeito a estimulação elétrica (1 – 32 Hz) em corpo cavernoso	
de camundongos controle, diabético e diabético tratado com insulina	63
Figura 5: Curvas concentração-efeito ao tadalafil em corpo cavernoso de camundongo	
controle, diabético e diabético tratado com insulina	64

Figura 6: Curvas concentração-efeito ao Y-27632 em corpo cavernoso de camundongo									
controle, diabético e diabético tratado com insulina	65								
Figura 7: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de									
camundongos controle, diabético e diabético tratado com insulina									
Figura 8: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de									
camundongos controle na presença de ODQ e L-NAME	66								
Figura 9: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de									
camundongos diabéticos na presença de ODQ e L-NAME	67								
Figura 10: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de									
camundongos diabéticos tratados com insulina na presença de ODQ e L-NAME	67								
Figura 11: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de									
camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina na presença de L-									
NAME	68								

Figura 12: Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 em corpo cavernoso de	
camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina na presença de	
ODQ	68
Figura 13: Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 em corpo cavernoso de	
camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina	70
Figura 14: Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 em corpo cavernoso de	
camundongos controle, na presença de ODQ e L-NAME	71
Figura 15: Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 em corpo cavernoso de	
camundongos diabéticos na presença de ODQ e L-NAME	71
Figura 16: Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 em corpo cavernoso de	
camundongos diabéticos tradados com insulina na presença de ODQ e L-NAME	72
Figura 17. Curvas concentração-efeito ao 60-2770 em corpo cavernoso de camundongos	
controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina na presença de L-NAME	72
Figura 18: Curvas concentração-efeito ao 60-2770 em corpo cavernoso de camundongos	
controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina na presença de ODQ	73
Figura 19: Curvas concentração-efeito a Fenilefrina em corpo cavernoso de	
camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina	74
Figura 20: Curvas concentração-efeito a Fenilefrina em corpo cavernoso de	
camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina com valores	
corrigidos pela massa do segmento de cada corpo	74
Figura 21: Curvas frequência-efeito (contração) a estimulação elétrica (1 – 32 Hz) em	
corpo cavernoso de camundongos controle, diabético e diabético tratado com insulina	75
Figura 22: Curvas frequência-efeito (contração) a estimulação elétrica (1 - 32 Hz) em	

corpo	cavernoso	de	camundongos	controle,	diabético	e	diabético	tratado	com	insulina	76
com v	alores corri	gido	os pela massa c	lo segmen	to de cada	cc	orpo caver	noso			67

Figura 23: Curvas concentração-efeito a L-cisteína em corpo cavernoso de camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina corrigidos pela massa do segmento 767 de cada corpo cavernoso..... Figura 24: Curvas concentração-efeito as Sulfeto de Sódio em corpo cavernoso de 78 camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina ..... Figura 25: Curvas concentração-efeito ao dimetilsufóxido em corpo cavernoso de 69 camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina ..... 7 Figura 26: Curvas concentração-efeito a dimetilsulfona em corpo cavernoso de 80 camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina..... Figura 27: Medida da pressão intracavernosa induzida pela estimulação elétrica (4-10Hz) em corpo cavernoso de camundongos controle, diabéticos e diabéticos tradados com 81 insulina..... Figura 28: Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes 82 aos grupos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulina..... Figura 29: Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes aos grupos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulin evidenciando colágeno... 83 Figura 30: Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes aos grupos controle, diabéticos e diabéticos tradados com insulin evidenciando musculatura lisa e artéria cavernosa..... 86

Resumo

A disfunção erétil (ED) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a relação sexual satisfatória. O diabetes mellitus (DM) é uma condição associada a inúmeros distúrbios sistêmicos que podem contribuir direta ou indiretamente para o desenvolvimento de ED, como aterosclerose de grandes vasos, doença arterial microvascular, neuropatia autonômica, dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. É evidente que a hiperglicemia é um fator principal que inicia e promove complicações diabéticas. Diante disto, o presente trabalho pretendia avaliar o efeito do controle glicêmico nas alterações da vias NO-cGMP-PDE5 e CBS-CSE-H<sub>2</sub>S em corpos cavernosos (CC) de animais diabéticos.

O diabetes foi induzido pela administração de estreptozotocina em camundongos. A duração do diabetes foi de 04 semanas. Para o controle da glicemia, os animais foram tratados com insulina diária, mantendo-se os níveis de glicose dentro dos padrões normais para o camundongo (glicemia < 11mM). A função erétil foi avaliada in vitro, comparando-os com os animais diabéticos não tratados (glicemia 19 a 25mM) e *in vivo* pela pressão intracavernosa (ICP). Alterações morfológicas no pênis dos diferentes grupos também foram avaliadas. Os dados mostraram que o tratamento com insulina diária ampliou a resposta relaxante mediada pelo nitroprussiato de sódio (SNP), tadalafil e estimulação elétrica (EFS), sem alterar a resposta à acetilcolina (Ach). A resposta ao inibidor da Rho-kinase Y-27632 não se mostrou alterada nos diferentes grupos. A alteração na ICP do animal diabético também foi prevenida com o tratamento da insulina. A resposta contrátil em resposta à fenilefrina (PE) não se mostrou alterada nos diferentes grupos, ao contrário da contração ao EFS, que embora aumentada no animal diabético, pôde ser prevenida pelo controle glicêmico. O relaxamento ao BAY 41-2272 e Bay 60-2770 não apresentaram diferenças entre os grupos. Os dados mostraram que o ativador da GCs, BAY 60-2770, pôde promover relaxamento do CC, mesmo em animais hiperglicêmicos, tratados ou não com insulina. Esta resposta se mostrou aumentada quando a NO sintase (NOS) foi inibida ou quando a guanilato ciclase (GCs) foi oxidada, diferentemente do Bay 41-2272, que teve sua resposta reduzida nestas condições.

Com relação a via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S, o tratamento com insulina preveniu o menor relaxamento observado com a L-cisteina, bem como ao DMSO e DMSO2. A análise morfológica mostrou que o diabetes levou a uma atrofia do corpo cavernoso do animal diabético em relação ao controle e que o tratamento com insulina conseguiu prevenir esta alteração. Também foi observada uma hiperplasia de camada muscular da artéria cavernosa nos animais diabéticos tratados com insulina, não sendo observado o mesmo efeito nas artérias dorsais. Não foram verificadas alterações no nervo dorsal.

Em conclusão, o controle da glicemia, através do tratamento com insulina diária, conseguiu prevenir a capacidade de resposta da musculatura lisa do corpo cavernoso do animal diabético, mas não o comprometimento do endotélio encontrado nos animais diabéticos que não tiveram sua glicemia controlada. Os dados com os animais diabéticos também mostraram que a GCs supostamente não estava oxidada e que a via de sinalização RhoA/Rho-kinase no corpo cavernoso do animal diabético se encontrava dentro dos padrões de normalidade. Os dados mostraram um comprometimento da via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S no animal diabético, o que foi prevenido pelo controle da glicemia. Por fim, o controle glicêmico conseguiu prevenir alterações morfológicas compatíveis com o quadro de diabetes.

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve or maintain penile erection sufficient to permit satisfactory sexual intercourse. Diabetes mellitus (DM) is a condition associated with numerous systemic disorders that may contribute directly or indirectly to the development of ED, such as large vessel atherosclerosis, arterial microvascular disease, autonomic neuropathy, dyslipidemia, hypertension and endothelial dysfunction. Hyperglycemia is a major factor that initiates and promotes diabetic complications. The aimed of this study was to evaluate the effect of glycemic control in the NO-cGMP-PDE5 and CBS-CSE-H2S- pathways in corpus cavernosum (CC) of diabetic animals.

Diabetes was induced by administration of streptozotocin in mice. The duration of diabetes was 04 weeks. For glycemic control, the animals were treated with daily insulin, keeping glucose levels within the normal range for mice (blood glucose <11mm). Erectile function was evaluated in vitro and compared with untreated diabetic animals (19 to 25 mM glucose) and *in vivo* by intracavernous pressure (ICP). Penis morphology of the different groups were also evaluated. The data showed that daily treatment with insulin increased the relaxing response mediated by sodium nitroprusside (SNP), tadalafil and electrical stimulation (EFS), without altering the response to acetylcholine (Ach). The response to the Rho-kinase inhibitor Y-27632 was not altered in different groups. The change in the ICP of the diabetic animal was also prevented by insulin. The contractile response to phenylephrine (PE) was not altered in different groups, unlike the EFS contraction, which could also be prevented by insulin treatment. The relaxation with BAY 41-2272 and Bay 60-2770 did not differ between groups. The sGC activator BAY 60-2770 could promote relaxation of the CC, even in hyperglycemic animals, treated or not with insulinhis response showed increased when NO sintase (NOS) was inhibited or

xxxi

when sGC was oxidized, unlike Bay 41-2272 that under these conditions had a decreased response. In the CBS-CSE-H2 pathway, insulin treatment prevented the lowest relaxation observed with L-cysteine as well as DMSO and DMSO<sub>2</sub>. Morphological analysis showed that diabetes led to an atrophy of the corpus cavernosum of diabetic animals compared with control. Insulin treatment could reverse this change. There was a hyperplasia of the cavernous artery in insulin treated diabetic animals, but not in dorsal arteries. No changes were observed in the dorsal nerve. In conclusion, blood glucose control could prevent the responsiveness of smooth muscle of the corpus cavernosum of diabetic animals, but could not prevent the impairment of endothelium. RhoA / Rho-kinase pathway was not altered in either groups. The data showed a commitment in the CBS-CSE-H2S pathway in diabetic animals, which was prevented by glycemic control. Finally, glycemic control could prevent morphological changes consistent with the diabetes.

Introdução

### 1-INTRODUÇÃO

#### 1.1 Anatomia e fisiologia da ereção peniana

O pênis é constituído por três cilindros de tecido vascular erétil: dois dorsais, representados pelos corpos cavernosos (CCs), e um ventral que contém a uretra, chamado corpo esponjonso (CE). Os CCs possuem duas porções: uma fixa, posterior ao arco pubiano, e uma móvel, anterior a este. Distalmente ao arco pubiano, os CCs se mantem unidos por meio de um septo incompleto que permite livre fluxo sanguíneo entre os dois cilindros. Em sua porção fixa ou perineal, os CCs se separam para formar a crura, onde cada cilindro (então chamado ramo isquipúbico) se insere no ísquio, anteriormente à tuberosidade isquiática. A crura é revestida por musculatura estriada esquelética, chamada musculatura isquicavernosa. O corpo esponjoso, por sua vez, emerge do períneo, sendo envolvido pelo músculo bulbocavernoso. Em sua extremidade distal, o CE se dilata para formar a glande peniana, onde a uretra se abre para o exterior através do meato. Externamente, o pênis é revestido por tegumento destituído de tecido adiposo hipodérmico, abaixo do qual se observa duas fáscias – a de Colles (superficial) e a de Buck (profunda). Abaixo desta, encontramos ainda, no caso do CCs, uma túnica fibroelástica relativamente distensível chamada túnica albugínea que confere rigidez ao pênis durante a ereção. O CE também é envolvido por uma túnica própria, porém mais delgada que a albugínea (1, 2).

A fonte primária de irrigação sanguínea do pênis é representada pela artéria pudenda interna, ramo da ilíaca interna. Após emergir do canal de Alcock, a pudenda interna dá origem à artéria peniana que no interior do órgão se subdivide em quatro ramos: a artéria dorsal, as artérias cavernosas (uma para cada CC) e a bulbouretral (que por sua vez se divide em artérias bulbar e uretral). As artérias cavernosas situam-se dentro dos CCs e terminam nas artérias helicinais que por sua vez continuam nos espaços lacunares ou sinusóides – principais componentes funcionais do tecido erétil cavernoso. Além dos sinusóides, este tecido erétil é ainda constituído por trabéculas de

sustentação (dos espaços lacunares) que abrigam: musculatura lisa, colágeno e uma complexa rede de pequenos vasos (arteriais e venosos) e filetes nervosos (1,2). A drenagem venosa é complexa e integrada por dois sistemas: um superficial e um profundo (as veias profunda dorsal, as circunflexas, as emissárias, as cavernosas e as crurais). O principal fluxo de drenagem começa nos sinusóides, seguindo sucessivamente para pequenas vênulas e plexo subalbugíneo, do qual emergem as veias emissárias (3). As emissárias atravessam a túnica albugínea, drenando para as veias circunflexas que por sua vez terminam na veia dorsal profunda (3).

A inervação peniana origina-se dos sistemas nervosos autonômico e somático (2). O plexo nervoso pélvico fornece fibras simpáticas e parassimpáticas para próstata, vesículas seminais, bexiga e reto. As fibras mais caudais deste plexo correm ao longo do aspecto posterolateral da próstata, sendo chamados de nervos cavernosos. Os nervos cavernosos passam através do diafragma genitourinário em situação dorsomedial à artéria cavernosa, dando ramos para o tecido erétil e artérias helicinais dentro dos CCs. A inervação parassimpática emerge de níveis sacrais (S2-S4), enquanto a simpática origina-se da região toracolombar (T10-L2). Os nervos somáticos originam-se dos nervos pudendos, que percorrem juntamente com a artéria pudenda interna o canal de Alcock. Após emitirem ramos para os músculos isquiocavernoso e bulbocavernoso, os nervos pudendos convertem-se nos nervos dorsais do pênis. Estes, por sua vez, dão origem a múltiplos ramos que terminam na glande. Esses ramos são responsáveis por funções sensoriais e proprioceptivas dos CCs, pele e glande penianos (1,2). A inervação somática também é responsável pela contração dos músculos ísquio- e bulbocavernosos.

A ereção peniana é uma função resultante da complexa interação de fatores neurais, vasculares, endócrinos e psicológicos. Contudo, de forma mais simplificada, especialmente num contexto experimental, pode ser estudada como um reflexo neuro-hemodinâmico dependente principalmente de fatores endócrinos e anatômicos. Este reflexo se manifesta como uma seqüência

de eventos e modificações morfológicas do pênis, geralmente descritos como um ciclo de cinco fases principais: 1- flacidez, 2- tumescência, 3- ereção completa, 4- ereção rígida e 5- detumescência (4).

Na ausência de estímulo sexual, o pênis é mantido em um estado de flacidez moderada por meio de um tônus simpático basal, originado na substância cinzenta interomediolateral da medula espinhal toracolombar (5). O tônus simpático desencadeia a liberação de noradrenalina a partir de fíletes nervosos adrenérgicos penianos, o que leva a uma contração tônica de arteríolas do CC assim como de musculatura lisa e células endoteliais da parede das lacunas. Esta contração muscular resulta em uma resistência significativa contra o influxo de sangue arterial, o que mantém o pênis no estado flácido de repouso. É provável que a noradrenalina também iniba a liberação de NO, dificultando ainda mais uma possível ereção (5).

A obtenção e a manutenção de uma ereção firme requerem um influxo de sangue arterial adequado, assim como um aprisionamento eficiente do efluxo sanguíneo venoso. O estímulo sexual desencadeia a liberação de neurotransmissores a partir de terminações nervosas cavernosas, o que resulta no relaxamento da musculatura lisa e nos seguintes eventos: 1- dilatação de artérias e arteríolas penianas, com aumento de fluxo sanguíneo tanto na fase sistólica quanto na diastólica; 2- aprisionamento do sangue que entra nos sinusóides em expansão; 3- compressão do plexo venular subalbugíneo entre a túnica albugínea e os sinusóides periféricos, reduzindo o efluxo de sangue venoso; 4- estiramento máximo da túnica, com oclusão das veias emissárias entre as camadas circular interna e longitudinal externa da túnica albugínea e decréscimo ainda maior no efluxo venoso; 5- aumento na pressão intracavernosa (para cerca de 100 mmHg), o que leva o pênis à sua posição ereta (fase de ereção completa); 6- aumento ainda maior na pressão (para algumas centenas de mmHg), com a contração da musculatura isquicavernosa (fase rígida) **(6)**. A ereção envolve, portanto, dilatação arterial, relaxamento sinusoidal e compressão venosa. A importância do
relaxamento da musculatura lisa peniana é demonstrada tanto em modelos animais, quanto em estudos envolvendo seres humanos (6).

Uma vez atingida a fase rígida, o pênis está pronto para atuar em atividades sexuais (como a cópula, por exemplo) cujo clímax será a obtenção de orgasmo e ejaculação do líquido seminal. Havendo orgasmo ou cessada a atividade sexual, o pênis deverá retornar ao estado inicial de flacidez através da fase de detumescência. Três fases de detumescência foram descritas em um estudo baseado em modelo animal (7). A primeira consiste em um aumento de pressão intracavernosa transitória, indicando o início de uma contração de musculatura lisa contra um sistema venoso fechado. A segunda caracteriza-se por uma redução pressórica lenta, sugerindo a reabertura de canais venosos com recuperação do nível basal de fluxo arterial. Finalmente, na terceira fase, observa-se uma diminuição rápida da pressão com restituição rápida da capacidade de fluxo venoso. Tendo retornado ao estado de flacidez após atividade sexual acompanhada de orgasmo, o pênis entra ainda em uma fase transitória chamada de "latência", onde os mecanismos de ereção encontram-se temporariamente inibidos.

### 1.2 Aspectos moleculares da ereção peniana

Conforme descrito, os tecidos penianos eréteis, mais especificamente a musculatura lisa cavernosa e a da vasculatura arterial/arteriolar, têm um papel fundamental no processo de ereção. A contração e o relaxamento de células musculares lisas, em geral, são regulados pela concentração citosólica de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) livre. A noradrenalina (oriunda de terminações nervosas), as endotelinas e a prostaglandina F2 $\alpha$  (ambas produzidas no endotélio) ativam receptores nas células musculares lisas, aumentando o inositol trifosfato e o diacilglicerol, o que resulta em liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir de reservatórios intracelulares e/ou em influxo de Ca<sup>2+</sup> extracelular através da abertura de canais de cálcio da membrana citoplasmática. Estes eventos deflagram um aumento transitório de Ca<sup>2+</sup>

citoplasmático livre, que por sua vez liga-se a calmodulina e altera sua conformação, expondo o sítio de interação com a quinase da cadeia leve da miosina. A conseqüente ativação catalisa a fosforilação de cadeias leves de miosina, desencadeando a formação de pontes cruzadas entre miosina e filamentos de actina, bem como o desenvolvimento de força. Além disso, a fosforilação da cadeia leve também ativa a miosina ATPase que hidroliza o ATP a fim de fornecer energia para a contração muscular **(6)**.

Com o retorno do Ca<sup>2+</sup> citosólico aos níveis basais, vias sensibilizadores de cálcio assumem o controle. Uma dessas vias ocorre através de receptores excitatórios acoplados a proteínas G que podem promover contração, aumentando a sensibilidade ao cálcio, sem qualquer modificação na concentração citosólica deste íon. Essa via, em particular, envolve a RhoA, uma proteína G monomérica pequena que ativa a Rho-quinase. A Rho-quinase ativada fosforila e, portanto, inibe a subunidade regulatória da miosina fosfatase de músculo liso, impedindo a defosforilação de miofilamento e promovendo a manutenção do tônus contrátil (8). A expressão de RhoA e Rho-quinase foi demonstrada em musculatura peniana (9, 10). Curiosamente, a quantidade de RhoA expressa em músculo liso cavernoso é 17 vezes maior que a de músculo liso vascular (10). A via RhoA/Rhokinase se mostrou mais ativa em casos de danos ao nervo cavernoso em modelo animal e pode estar relacionada a disfunção erétil observada (11). O uso de um inibidor da Rho-kinase em modelo animal mostrou ser capaz de implementar a função erétil em ratos diabéticos (12).

Em oposição à contração, o relaxamento de uma musculatura lisa ocorre quando a concentração de Ca<sup>2+</sup> livre diminui. Quando isso ocorre, a calmodulina se dissocia da quinase de cadeia leve de miosina, inativando-a. A miosina é defosforilada pela fosfatase de cadeia leve de miosina, desligando-se do filamento de actina, o que leva ao relaxamento muscular **(13)**. Os segundos mensageiros envolvidos no relaxamento de musculatura lisa são o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Estas moléculas ativam proteína-

quinases dependentes de AMPc e GMPc, que por sua vez fosforilam certas proteínas e canais iônicos, resultando em abertura de canais de potássio e hiperpolarização, além de sequestro de cálcio intracelular pelo retículo endoplasmático e inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes, bloqueando o influxo de cálcio. Como consequência, há uma queda no cálcio citosólico livre e relaxamento muscular. Assim, moléculas ou vias que levem à produção ou inibição da degradação de AMPc/GMPc podem potencialmente resultar em relaxamento muscular dos CCs e ereção peniana (6).

Aparentemente, a via de relaxamento mais importante, no que concerne a mecanismos periféricos de ereção, é a do óxido nítrico (NO, via NO/GMPc). Com o estímulo sexual, observa-se um aumento na atividade da NO sintase (NOS) neural e endotelial, o que resulta na liberação de NO a partir de terminações nervosas não colinérgicas não adrenérgicas (NANC) e de células endoteliais. O NO é o componente central de um importante sistema de transdução de sinais que atua no pênis para mediar a resposta erétil (**3**, **14**).

O NO é constitutivamente produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é encontrada nos nervos nitrérgicos (nNOS) e células endoteliais (eNOS) do corpo cavernoso. O endotélio também libera NO em resposta à acetilcolina (ACh) ou bradicinina no pênis (15, 16). Ao ser liberado de fibras nitrérgicas ou do endotélio, o NO se difunde para células musculares lisas adjacentes e se liga ao seu receptor fisiológico intracelular guanilato ciclase solúvel (GCs). A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) ao segundo-mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A elevação dos níveis intracelulares de GMPc ativa proteínas quinase específicas, as quais fosforilam outras proteínas, ativam canais iônicos e, através destes eventos bioquímicos intermediários, levam à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa. O GMPc é

hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim a resposta erétil (17, 18).

### 1.3 Disfunção erétil no diabetes mellitus

Para uma função erétil normal, é necessária a integração adequada de vários sistemas orgânicos, dentre os quais se destacam o vascular, o neurológico e o endócrino. Problemas no funcionamento de um ou mais desses sistemas essenciais ou na interação destes sistemas pode levar a efeitos deletérios sobre a função sexual do indivíduo. A disfunção erétil (ED) pode ser definida como uma incapacidade consistente ou intermitente de obter ou manter ereções penianas com qualidade suficiente para permitir uma relação sexual satisfatória (19).

Inicialmente, acreditava-se que a ED fosse uma doença de natureza psicogênica. Posteriormente, o crescente reconhecimento de sua relação com comorbidades clínicas revelou uma base orgânica na maioria dos casos. Esta relação com comorbidades orgânicas prevalentes, como doenças cardiovasculares, diabetes, dislipidemia, hipertensão e tabagismo, torna a ED um problema de saúde pública significativo. Muitas evidências sugerem que a ED pode ser vista como uma doença vascular que representa uma manifestação precoce de doença cardiovascular principalmente em homens abaixo dos 60 anos e em indivíduos diabéticos (20-23).

O diabetes mellitus é uma condição associada a inúmeros distúrbios sistêmicos que podem contribuir direta ou indiretamente para o desenvolvimento de ED, como aterosclerose de grandes vasos, doença arterial microvascular, neuropatia autonômica, dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (24). Estima-se que aproximadamente 35% a 75% dos homens com diabetes mellitus apresentam ED (25-27) e a própria ED também pode ser um fator preditor do diabetes

mellitus (28). A prevalência de disfunção erétil em homens diabéticos é significativamente maior do que a observada na população em geral (29-31).

Em pacientes diabéticos, as alterações neurovasculares mediadas pelo estresse oxidativo, hiperglicemia e perfil lipídico alterado desempenham papel central na incidência de disfunção erétil. Complicações neurológicas, como neuropatia autonômica (em particular envolvendo terminações colinérgicas) e alterações no sistema vascular peniano, incluindo doenças microvasculares e disfunção endotelial, constituem as causas primárias de disfunção erétil observada clinicamente (32-35). O diabetes pôde afetar de maneira adversa o comportamento sexual (36-39) e aumento de pressão intracavernosa in vivo em ratos geneticamente diabéticos ou nos quais o diabetes é induzido quimicamente (40-42). Vários estudos funcionais in vitro demonstraram redução do relaxamento de corpo cavernoso induzido por estimulação elétrica ou dependente do endotélio, tanto em tecidos obtidos de homens diabéticos como em modelos animais de diabetes (43-46). A vasculopatia que resulta, em parte, de disfunção endotelial, envolve síntese ou atividade reduzida de fatores relaxantes como o NO, bem como respostas alteradas a vasoconstritores (47,48). Além disso, a imunoreatividade para NOS também apresentou-se reduzida em tecido peniano obtido de indivíduos diabéticos com ED (49,50). Estes resultados reforçam a associação do diabetes à grande incidência de disfunção erétil, visto que as respostas mediadas pelo NO oriundo de fibras nitrérgicas e do endotélio que reveste os sinusóides apresentam-se reduzidas em corpo cavernoso de animais e homens diabéticos. Estudos moleculares em pênis humano têm demonstrado que produtos finais avançados da glicação (AGE) podem contribuir para a ED em pacientes diabéticos através do sequestro de NO. Produtos AGE foram encontrados em níveis elevados no tecido peniano, mas não no soro de pacientes diabéticos, em comparação a não diabéticos. Estes produtos concentravam-se principalmente nos CCs e túnica albugínea (51).

Em síntese, a associação entre diabetes e ED parece ser de causa multifatorial, envolvendo sobretudo a neuropatia autonômica em nervos penianos e/ou disfunção endotelial.

## 1.4 Outros possíveis mediadores envolvidos na ereção peniana: via do sulfeto do hidrogênio

# 1.4.1 Sulfeto de Hidrogênio-Síntese e Degradação

O sulfeto de hidrogênio ou gás sulfidrico (H<sub>2</sub>S) é produzido a partir de aminoácidos sulfonados, tais como metionina, cisteína e cistina, principalmente, através da ação de duas enzimas distintas, a cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) e a cistationina  $\gamma$ -liase (CSE) (**52**). A enzima CBS está expressa no cérebro, sistema nervoso periférico, rim, fígado enquanto que a CSE é mais comumente encontrada no fígado e na musculatura vascular e não vascular (**52-53**). Outras fontes de produção de H<sub>2</sub>S são a microbiota intestinal e os eritrócitos, sendo que neste último a produção é independente da ação de enzimas, em um processo que envolve a via da glutationa. Substâncias como aminooxiacetato (AAOA) e DL-propargilglicina (PAG) são comumente utilizados como inibidores das enzimas CBS e CSE, respectivamente (**54,55**).

A formação do H<sub>2</sub>S bem como a ação das enzimas CBS e CSE estão resumidas na Figura 1. A degradação do H<sub>2</sub>S geralmente ocorre através da sua oxidação a sulfato  $(SO_4^{-2})$  sulfito  $(SO_3^{-2})$  e tiosulfato  $(S_2O_3^{-2})$  ou pela ação das enzimas tiometiltransferase (TMT) e rodanase, esta última podendo formar metanetiol (CH<sub>4</sub>S) e dimetilsulfide (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>) (**56**).



*Figura 1.* Principais vias de síntese do  $H_2S$  *in vivo.* O  $H_2S$  é sintetizado a partir dos aminoácidos L-cisteína e L-cistationina pela ação de uma ou duas enzimas (dependendo da célula) denominadas de cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) e cistationina  $\gamma$ -liase (CSE). O  $H_2S$  pode ser removido através de três principais processos: oxidação, seqüestro pela meta-hemoglobina ou pela ação das enzimas tiometiltransferase (TMT) e rodanase (**56**).

#### 1.4.2 Farmacologia do sulfeto de hidrogênio na musculatura vascular e não vascular

Nos últimos anos, o H<sub>2</sub>S vem ganhando destaque no que diz respeito à sua importância fisiológica e o seu papel em estados patológicos. Tem-se sugerido que o H<sub>2</sub>S exerce seus efeitos através da ativação dos canais de potássio dependentes do ATP ( $K_{ATP}$ ), diferentemente dos outros dois gases mais usualmente estudados, o óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), que agem ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (**57-59**). Interações em canais de Ca<sup>2+</sup> também foram relatadas (**60,61**). Curiosamente, o Sildenafil, inibidor de PDE5, foi capaz de aumentar a produção de H<sub>2</sub>S em bexiga humana isolada (**62**).

O papel fisiológico do  $H_2S$  tem sido mais comumente investigado no sistema cardiovascular. Assim, o  $H_2S$  endógeno pode exercer diversas funções, tais como, relaxamento da musculatura lisa (62), inibição da proliferação de células musculares lisas (57,63) e agregação plaquetária (57). Além dos efeitos vasodilatadores, o  $H_2S$  pode inibir a proliferação das células lisas de uma maneira dependente da ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), assim como induzir a apoptose em células isoladas de aorta pela ativação da caspase-3, sugerindo que o  $H_2S$  pode ser útil para prevenir a proliferação das células musculares lisa em doenças como arteriosclerose, oclusão vascular e estenose após angioplastia (57,63).

Em modelos animais que mimetizam doenças cardiovasculares como, hipertensão arterial, pulmonar e aterosclerose, a via CBS-CSE-H2S mostrou-se alterada. Assim, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) a via CSE/H<sub>2</sub>S estava suprimida e o tratamento com doadores de H<sub>2</sub>S foi capaz de diminuir a pressão sistólica (64). Em camundongos knockout para a enzima CSE (CSE<sup>-/-</sup>), os níveis de H<sub>2</sub>S estavam reduzidos no plasma, coração, aorta e em outros tecidos. A administração do NaHS nestes animais diminuiu de maneira concentração dependente a pressão sistólica (65). Em camundongos knockout para apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) os níveis de H<sub>2</sub>S e da molécula de adesão ICAM-1 estavam reduzidos e aumentados, respectivamente, no plasma e na aorta. O tratamento destes animais com o doador NaHS mostrou aumento nos níveis de H<sub>2</sub>S, diminuição da área de placa aterogênica e dos níveis de ICAM-1 no plasma e na aorta, sugerindo que o H<sub>2</sub>S exerce um efeito anti-aterogênico e inibe e expressão de ICAM-1 em camundongos knockout para ApoE<sup>-/-</sup> (66). O doador NaHS mostrou ter efeito cardioprotetor em modelo de choque hemorrágico em ratos (67). O pré-tratamento de cardiomiócitos de ratos com o doador NaHS também diminuiu os níveis de espécies reativas de oxigênio, com aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em modelo de isquemia/reperfusão (68).

Além dos efeitos benéficos do  $H_2S$  no leito vascular, o efeito em preparações não vasculares também foi avaliado. Assim, em modelos de úlcera gástrica induzida pelo ácido acético a expressão das enzimas CBS e CSE estavam aumentadas e o tratamento crônico com doadores exógenos (NaHS) ou endógenos (L-cisteína) de  $H_2S$  reduziu a área ulcerada, enquanto que a administração do inibidor da enzima CSE, PAG, reverteu os efeitos protetores induzidos pela L-cisteína, sugerindo que o  $H_2S$  é produzido na mucosa gástrica em reposta à lesão e age facilitando o processo de cicatrização da úlcera (**69,70**).

Em CC de coelho o H<sub>2</sub>S foi sintetizado (*in vitro*, em homogenato do tecido) e o doador NaHS relaxou esta musculatura (**71**). Em CC de humano, as enzimas, CBS e CSE estão expressas na musculatura trabecular e no músculo liso da artéria peniana, enquanto que somente a CSE está expressa nos nervos periféricos. Tanto o NaHS como a L-cisteína relaxou, de maneira concentração dependente, o CC. A administração intracavernosa dos doadores de H<sub>2</sub>S em ratos aumentou a pressão intracavernosa (ICP) e a administração endovenosa de PAG bloqueou este aumento (**72**). Uma possível relação da liberação de NO neurogênico e produção endógena de H<sub>2</sub>S também foi evidenciada em CC de ratos (**73**).

#### JUSTIFICATIVA

A disfunção erétil (ED) constitui um importante problema de saúde pública. O diabetes mellitus é causa frequente tanto de disfunção sexual como de ED no homem. A relação etiopatogênica entre diabetes e DE é complexa e parece envolver diferentes mecanismos fisiopatológicos. A exposição prolongada à hiperglicemia é reconhecida como um fator importante para a patogênese de complicações do diabetes (74). É evidente que a hiperglicemia é um fator principal que inicia e promove complicações diabéticas (75). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos adversos de níveis elevados de glicose, incluindo o estresse oxidativo, glicação não enzimática e ativação de quinases através do diacilglicerol (DAG). No entanto, o mecanismo exato do efeito deletério da hiperglicemia nos pequenos e grandes vasos não é plenamente conhecido (76). Este é um fator importante, frente à disfunção endotelial relacionada com a microangiopatia e alterações vasculares. (77, 78). Até o início deste trabalho não havia dados que avaliassem o efeito do controle glicêmico nas alterações da via NO-cGMP-PDE5 em CC de animais ou homens diabéticos.

Pelo fato de indivíduos diabéticos com ED serem frequentemente refratários à terapia padrão com inibidores de PDE5 (**43**, **79**, **80**, **81**), outras vias chamam a atenção, como a via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S. A via do H<sub>2</sub>S tem sido explorada em estudos de fisiologia e farmacologia cardiovascular, com resultados indicando que este composto possa ter um papel importante na regulação da contração e do relaxamento de musculatura lisa vascular. Até o início deste trabalho, dados sobre o H<sub>2</sub>S na ED em diabéticos não estavam disponíveis.

Objetivos

#### **2. OBJETIVOS**

Avaliar o efeito da reposição da insulina em camundongos diabéticos induzidos com estreptozotocina com relação às alterações funcionais e morfológicas encontradas no CC destes animais. Desta forma, os objetivos específicos foram:

1) Avaliar *in vitro* as respostas relaxantes de corpos cavernosos isolados de camundongos diabéticos que tiveram a glicemia controlada (< 11mM) com insulina diária (Lantus ®- 3U/dia), realizando-se curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) (relaxamento dependente do endotélio), ao nitroprussiato de sódio (SNP) (relaxamento independente do endotélio), Tadalafil (inibidor de PED5), e ao Y-27632 (inibidor da Rho-quinase), assim como curvas freqüência-efeito à estimulação elétrica (EFS) em tecidos pré-contraídos. Para análise da via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S, curvas concentração-efeito ao DMSO e DMSO2, bem como a L-cisteína e ao Na<sub>2</sub>S (doador de H<sub>2</sub>S). Estes dados foram comparados com os grupos controle e diabéticos (glicemia de 19 a 25mM).

2) Avaliar *in vitro* as respostas contráteis de corpos cavernosos isolados de camundongos diabéticos que tiveram a glicemia controlada (< 11mM) com insulina diária (Lantus ®- 3U/dia), realizando-se curvas concentração-efeito à fenilefrina (PE) e curvas frequência-efeito a EFS em tecidos com tônus basal. Estes dados foram comparados com os grupos controle e diabéticos (glicemia de 19 a 25mM).

3) Avaliar a enzima guanilato ciclase solúvel do grupo diabético (faixa de glicemia de 19 a 25mM), e seu comportamento a um ativador da guanilato ciclase solúvel, avaliando-se as respostas relaxantes de corpos cavernosos isolados, através de curvas de concentração-efeito ao Bay 60-2770 (ativador da guanilato ciclase solúvel), em tecidos pré-contraídos, na presença ou não de ODQ (10μM) e L-NAME (100μM). Da mesma forma, avaliar as respostas relaxantes dos corpos

cavernosos isolados ao Bay 41-2272 (estimulador da guanilato ciclase solúvel), (**82-84**) também na presença de ODQ (10  $\mu$ M) e L-NAME (100  $\mu$ M). Estes dados foram comparados com os grupos controle e diabéticos controlado (glicemia (< 11mM).

*4)* Avaliar *in vivo* as funções eréteis, através da medida da pressão intracavernosa (ICP) de camundongos diabéticos que tiveram a glicemia controlada (< 11 mM), bem como de diabéticos com glicemia de 19 a 25 mM. Estes dados foram comparados com os grupos controle.

5) Avaliar as alterações histomorfológicas de corpos cavernosos isolados de camundongos diabéticos que tiveram a glicemia controlada (< 11mM) com insulina diária (Lantus ®- 3U/dia), comparado-os com os grupos controle e diabéticos (glicemia de 19 a 25 mM).

Material e Métodos

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos C57BL/6 pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP) e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12 h), e tratados com ração e água *ad libidum*. Os protocolos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA - IB/UNICAMP) sob o protocolo **nº 1329-1**.

# 3.2. Indução do Diabetes e Grupos Experimentais

O diabetes foi induzido pela administração i.p. de estreptozotocina (125 mg/kg), dissolvida em tampão citrato (20 mM, pH 4.5). Após 48 h, a indução do diabetes foi confirmada pela presença de hiperglicemia, utilizando-se um glicosímetro (Accu-Check, Boehringer Mannheim Corporation, Germany). Foram rejeitados os animais que apresentaram a concentração de glicose inferior a 19 mM (**85**, **86**). Estando confirmada a indução de diabetes, os camundongos foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu insulina subcutânea, (Lantus<sup>®</sup> (Glargina)-2U/dia, em dias alternados), mantendo-se a glicemia na faixa de 19 a 25mM (**86**); o outro teve a glicemia controlada (glicemia menor que 11mM, considerada normal para o camundongo, **86**) através da administração de insulina subcutânea diária (Lantus<sup>®</sup> (Glargina)-3U/dia). Os animais foram pesados semanalmente e a glicemia do grupo de animais diabéticos medida no início, meio e fim do tratamento, que teve a duração de 4 semanas (**85**). Os animais de glicemia controlada tiveram sua glicemia medida diariamente. Após 4 semanas, os camundongos foram utilizados para a execução dos protocolos experimentais. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Controle (CTL): os animais deste grupo não sofreram intervenção farmacológica. Ao contrário dos diabéticos, a este grupo foi administrado apenas o tampão citrato.

(2) *Diabético (DM)*: os animais deste grupo receberam estreptozotocina e receberam insulina por via subcutânea (2 UI/dia, em dias alternados), (**86**), mantendo-se a glicemia entre 19 e 25mM.

(3) Diabético com controle de glicemia (DM-I): os animais deste grupo receberam estreptozotocina e foram tratados com insulina diária por via subcutânea (3 UI/dia), mantendo-se a glicemia < 11 mM.</li>

# 3.3. Preparação de Corpo Cavernoso In Vitro e Protocolos Experimentais

Os animais dos diferentes grupos foram anestesiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, em seguida, exsangüinados por secção dos vasos cervicais. O pênis foi removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit gelada na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO<sub>3</sub>, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 1.17 e CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, 1.6. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conectivos e glande peniana, dois segmentos de corpo cavernoso foram obtidos de cada animal. Os tecidos foram montados em banhos para órgão isolado (10 ml) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5%) e mantida à temperatura de 37°C (pH 7.4), sendo suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa. A tensão aplicada aos tecidos (4-5 mN) foi periodicamente ajustada até estabilização (60 min). As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (software versão 5.0, ADInstruments, Colorado Springs, EUA). Para estimulação elétrica dos nervos autonômicos (EFS), os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos paralelamente. A estimulação elétrica foi induzida através de um estimulador Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA), pela geração de pulsos de 1 ms de duração a 50 V em frequências variadas (1-32 Hz).

Respostas relaxantes à ACh (0.01-1  $\mu$ M), Nitroprussiato de sódio (SNP, 0.01-10  $\mu$ M), Tadalafil (TAD, 0.01-10  $\mu$ M), Y-27632 (0.01-10  $\mu$ M), Bay 41-2272 (Bay 41, 0.01-10  $\mu$ M), Bay 60-2770 (Bay 60, 0,0001-10  $\mu$ M), DMSO (0,04-1M), DMSO<sub>2</sub> (0,04-1M), Na<sub>2</sub>S (0,001-1mM), Lcisteína (L-cys, 0,001- 10mM), além de respostas contráteis à PE (0.01-100  $\mu$ M) foram obtidas em corpo cavernoso dos diferentes grupos experimentais. De forma semelhante, respostas relaxantes ao EFS (1-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados com guanetidina e atropina (bloqueios adrenérgico e colinérgico, respectivamente); respostas contráteis ao EFS (tratamento com L-NAME e atropina para bloquear as transmissões nitrérgica e colinérgica, respectivamente). As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações das drogas em questão em meia unidade logarítmica entre adições sucessivas. A análise de regressão não-linear para determinar os parâmetros de E<sub>max</sub> e -log EC<sub>50</sub> foi obtida com o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Os valores de E<sub>max</sub> de resposta contrátil foram também corrigidos em função da massa de cada segmento de corpo cavernoso.

# 3.4. Medida da função erétil in vivo

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitonial com uretana (1,2 g/Kg). Uma agulha (G-26) foi inserida no corpo cavernoso direito para registro da pressão intracavernosa (ICP), simultaneamente através de transdutores de pressão (Grass, Astro-Med Industrial Park, U.S.A.). Foi feita uma incisão na cavidade abdominal para exposição do nervo cavernoso, localizado na porção dorsolateral da próstata. Eletrodos bipolares de aço inoxidável foram conectados a um estimulador Grass SD9 (Grass, Astro-Med Industrial Park, U.S.A.) e posicionados no nervo cavernoso. Foi feita a seguir a estimulação elétrica do nervo (5 ms de duração, 6 V, durante 1 min) em diferentes frequências (1, 2, 4, 6 Hz). Todos os dados de pressão foram coletados para análise utilizando-se o sistema PowerLab 4/30. A ICP foi monitorada por 5 minutos antes do início dos experimentos, para

assegurar a estabilidade das medidas. Foi então executada a estimulação do nervo cavernoso para obtenção das respostas eréteis em animais dos diferentes grupos experimentais.

# 3.5. Análise de colesterol e triglicerídeos dos animais

O nível de colesterol e triglicerídeos dos animais dos diferentes grupos foi avaliado utilizando kits comerciais (Laborlab<sup>®</sup>). Para tanto, o sangue dos animais foi coletado, centrifugado a 2000 G e o soro utilizado para análise. Os resultados foram expressos em mg/dL.

# 3.6. Análise macroscópica e histológica dos animais

# 3.6.1. Exame macroscópico e processamento histológico

Após a eutanásia dos animais, seus pênis foram retirados cirurgicamente e fixados em formalina 10% tamponada, por 24h. Em seguida, os pênis foram mensurados em 3 dimensões, seccionados e enviados para processamento histológico de rotina em autotécnico, para obtenção dos blocos de parafina. Cortes histológicos de 4 µm feitos a partir destes blocos foram corados em hematoxilina-eosina e em tricrômico de Masson, para análise morfológica preliminar e cálculo de algumas das variáveis morfométricas.

# 3.6.2. Análise de imagem

**Equipamento:** os preparados imunoistoquímicos foram avaliados utilizando um microscópio Leica DM 5000B, acoplado a uma câmera digital DF 300 FX, colorida, de alta definição (12Mpixels). Foram capturadas 3 imagens por animal, utilizando as objetivas de 4X, 10X, 20X ou 40X,

dependendo da variável morfométrica alvo da análise. As imagens foram armazenadas em formato TIFF.

Análise histomorfométrica. Para a análise morfométrica, foi utilizado o programa de análise de imagem ImageJ versão 1.410 (NIH, EUA) que permite a segmentação manual e semi-automática de estruturas histológicas imunocoradas, bem como sua mensuração automática. Foram analisadas as seguintes variáveis morfométricas:

- ★ Área de secção de corpos cavernosos (ACC): área de secção dos corpos cavernosos mensurada através do programa de análise de imagem em μm<sup>2</sup>.
- ★ Área de artéria cavernosa (AAC): área de secção de a. cavernosa unilateral mensurada através do programa de análise de imagem em μm<sup>2</sup>.
- Área de artéria dorsal peniana (AAD): área de secção de a. dorsal unilateral mensurada através do programa de análise de imagem em μm2.
- ★ Área de nervo dorsal peniano (AND): área de secção de n. dorsal unilateral mensurada através do programa de análise de imagem em μm2.

# 3.6.3 Determinação da expressão de eNOS e nNOS pela técnica de imunoistoquímica

A detecção de eNOS e nNOS foi feita utilizando anticorpos específicos. As secções serão desparafinizadas em banho de xilol previamente aquecido em estufa a  $110^{\circ}$  C e, a seguir, em banhos subseqüentes de xilol à temperatura ambiente. Logo após este processo, as lâminas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes de 100%, 80% e 50% e lavadas em água corrente e destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio de três banhos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 volumes cada um, com duração de cinco minutos, seguidos de lavagens em PBS. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, em pH 6,0 durante 30 minutos a 95° C e, a seguir, lavadas em

água corrente. A seguir, o anticorpo primário foi gotejado sobre o corte histológico na diluição adequada e incubado durante o dia (overday), por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, sob agitação, secas e incubadas com o sistema de revelação baseado em polímero Advance (DAKOCYTOMATION, Carpenteria, Califórnia, Estados Unidos da América) por uma hora a 37º C. Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens em PBS, sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado um substrato cromogênico - a solução DAB (tetraidrocloreto de 3-3'-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) na proporção de 0,06g para 100mL de PBS-, 500ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 20 volumes e 1mL de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América), por cinco minutos a 37º C. O material foi, então, lavado em água corrente e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 a 60 segundos. As lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e encaminhadas a três banhos de xilol, para em seguida serem montadas em lamínulas e resina Entellan (Merck, Dermstad, Alemanha). Secções histológicos correspondentes (*i.e.*, extraídos do mesmo bloco de parafina) sem o anticorpo primário foram utilizados como controles negativos. A frequência de células positivas bem como a intensidade da reação foram avaliadas utilizando o programa de análise de imagens Imagelab 2000<sup>e</sup> (versão 2.4), que permite a contagem e segmentação manual de células e áreas. O critério de positividade foi de >25% das estruturas esperadas.

# 3.7. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias. Os valores experimentais de relaxamento foram calculados em relação à contração máxima produzida pela PE (10  $\mu$ M) tomados como 100%. Os valores experimentais de respostas contráteis estão expressos em

mN e também corrigidos em função da massa de cada segmento de corpo cavernoso. O logaritmo negativo da  $EC_{50}$  (p $EC_{50}$ ) foi calculado utilizando-se o programa GraphPad Prism. Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste Tukey. Em algumas situações experimentais, usou-se o teste "t" de student e  $\chi^2$ . O programa Instat (GraphPad Software) foi usado para estas análises.

Resultados

### 4. RESULTADOS

### 4.1. Indução do diabetes

As tabelas 1 e 2 mostram respectivamente os níveis de glicose e peso corpóreo dos animais no início e após 04 semanas da indução do diabetes com estreptozotocina. Verifica-se que o nível de glicose no diabético ficou em 355 mg/dL em média, ficando semelhante ao valor de glicemia no momento inicial, uma vez que os animais diabéticos receberam insulina de longa duração em doses intermitentes. O nível de glicose dos animais com glicemia controlada ficou em 155 mg/dl em média, semelhante ao valor dos animais controle. Os animais diabéticos não apresentaram ganho ponderal no período das 04 semanas, ficando com peso corpóreo final abaixo do inicial e com uma diferença significativa em relação ao controle e ao grupo de glicemia controlada (P<0,05). Não houve diferença significativa de peso corpóreo dos animais com glicemia controlada em relação ao controle.

TABELA 1. Valores da concentração de glicose sanguínea dos grupos controle (CTL),diabético (DM) e diabético tratado com insulina (DM-I)

	CTL	DM	DM-I
Glicose	137,6±17	378±42*	353±33*
inicial (mg/dL)			
Glicose			
final (mg/dL)	$140 \pm 15$	$355 \pm 17^{+1}$	$155 \pm 9^{*}$

Dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 24 animais. \*P < 0.05 comparado com o grupo CTL , <sup>#</sup>P< 0.05 comparado com o grupo CTL e DM-I

TABELA 2. Valores de peso corporal dos grupos controle (CTL) diabético

	CTL	DM	DM-I
Peso corporal	25,76± 0,70	25,73±0,86	25,83±0,80
inicial (g)			
Peso corporal	31 28 + 1 09	22 67 + 1 74*	30 3 + 1 10
final (g)	$51,20 \pm 1,09$	22,07 - 1,74	50,5 ± 1,10

(DM) e diabético tratado com insulina (DM-I)

Dados representam as médias  $\pm$  o erro padrão da média para 24 animais. \* P< 0.05 comparado com o grupo CTL e DM-I.

### 4.2. Relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh)

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à ACh em corpo cavernoso de camundongos pré-contraídos com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu significativamente a resposta máxima (E<sub>max</sub>) da Ach (DM: 25 ± 1%), quando comparados ao grupo controle (CTL: 54 ± 5%- Figura 2). O controle da glicemia, com a administração da insulina diária, não conseguiu reverter esta redução de resposta, apresentando um valor de E<sub>max</sub> semelhante aos animais diabéticos não tratados (DM-I: 26 ± 2%-Figura 2), estando da mesma forma, significativamente reduzida em relação ao grupo controle. Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para nenhum grupo.



*Figura 2:* Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh:  $1nM - 1\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle(O), diabético ( $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (●). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.3. Relaxamento induzido pelo nitroprussito de sódio (SNP)

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao SNP em corpo cavernoso pré-contraído com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu a resposta máxima (E<sub>max</sub>) ao SNP (DM: 44 ± 2,7%), quando comparado ao gurpo controle (CTL: 77 ± 3%- Figura 3). O controle da glicemia, com a administração da insulina diária, alterou este padrão de resposta, apresentando um valor de E<sub>max</sub> semelhante ao grupo controle (DM-I: 75 ± 6%, %-Figura 3). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para o nenhum grupo.



*Figura 3:* Curvas concentração-efeito ao Nitroprussiato de Sódio (SNP: 1nM – 10µM) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM ■) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.4. Relaxamento induzido pela estimulação elétrica (EFS)

O relaxamento neurogênico foi avaliado através da construção de curvas frequência-efeito ao estímulo elétrico em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com PE (10 μM). O diabetes mellitus reduziu significativamente a resposta relaxante induzida pelo estímulo elétrico nas frequências de 2,4, 8, 16 e 32 Hz (Figura 4). O tratamento com insulina alterou o padrão de resposta, e os animais com glicemia controlada tiveram perfil de resposta semelhante ao controle e significativamente maior do que para o grupo não tratado nas frequências 2,4,8 e 16 Hz. (Figura 4). Para a frequência mais alta, entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratado (glicemia controlada) e não tratado com a insulina diária.



*Figura 4:* Curvas frequência-efeito a estimulação elétrica (1 - 32 Hz) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos. \* P< 0,05, comparado com o grupo CTL e DM-I; # P< 0,05, comparado com o grupo CTL.

#### 4.5. Relaxamento induzido pelo Tadalafil

O relaxamento promovido pela inibição da PDE 5 foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao Tadalafil (TAD) em corpo cavernoso pré-contraído com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu a resposta máxima ( $E_{max}$ ) ao TAD (DM: 45 ± 6%), quando comparado ao grupo controle (CTL: 86 ± 5 %- Figura 5). O controle da glicemia, com a administração da insulina diária, entretanto, restaurou a  $E_{max}$  do relaxamento do animal diabético, atingindo valores semelhantes ao controle e significativamente maiores em relação ao animal diabético não tratado (DM-I: 82 ± 9%-Figura 5). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para nenhum dos grupos.



*Figura 5:* Curvas concentração-efeito ao Tadalafil (TAD:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle(CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

# 4.6. Relaxamento induzido pelo Y-27632

O relaxamento promovido pela inibição da Rho-kinase foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao Y-27632 em corpo cavernoso pré-contraído com PE (10  $\mu$ M). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para nenhum dos grupos avaliados, bem como da resposta máxima (E<sub>max</sub>- CTL: 104 ± 4 %, DM: 115 ± 7 % e DM-I: 110 ± 7 %-Figura 6).



*Figura 6*: Curvas concentração-efeito ao Y-27632 (1nM – 10uM) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM ■) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.7. Relaxamento induzido pelo Bay 41-2272

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao estimulador da guanilato ciclase solúvel independente de NO, BAY 41-2272 (Bay, 0,001-10  $\mu$ M) em corpo cavernoso de camundongos pré-contraídos com PE (10  $\mu$ M), na presença ou não, de ODQ (10  $\mu$ M) ou L-NAME (100  $\mu$ M). Não foram encontradas diferenças ente os grupos de resposta máxima (E<sub>max</sub>) ou potência (pEC<sub>50</sub>) na resposta relaxante dos corpos cavernosos ao Bay 41-2272 (Figura 7). Entretanto, em todos os grupos, a presença do ODQ (10 $\mu$ M) ou L-NAME (100 $\mu$ M), levou a uma redução significativa da E<sub>max</sub> (Figuras 8-10; Tabela 3). Não houve diferença de potência (pEC<sub>50</sub>) para nenhum grupo avaliado. Nenhuma diferença de E<sub>max</sub> ou pEC<sub>50</sub> foi observada entre os grupos (CTL, DM e DM-I), na presença L-NAME (Figura 11) ou ODQ (Figura 12).



*Figura 7:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ), e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7-11 experimentos.



*Figura 8:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), na presença de ODQ 10uM ( $\blacktriangle$ ) (ou L-NAME 100 $\mu$ M, ( $\blacktriangledown$ ). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 9:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos diabéticos (DM **•**), na presença de ODQ 10mM (**•**) ou L-NAME 100mM, (**•**). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 10:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay  $\ln M - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos diabéticos tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de ODQ 10mM ( $\blacktriangle$ ) ou L-NAME 100mM, ( $\bigtriangledown$ ). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 11:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ), e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de L-NAME ( $100\mu M$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 12:* Curvas concentração-efeito ao Bay 41-2272 (Bay:  $1nM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ), e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de ODQ (10 $\mu M$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

TABELA 3. Valores de potência  $(pEC_{50})$  e resposta máxima  $(E_{max})$  obtidas de Curvas concentração resposta ao Bay 41-2277 e Bay 60-2770 em corpos cavernosos de camundongos controle (CTL), diabético (DM) e diabético controlado (DM-I) na presença ou ausência de L-NAME (100 $\mu$ M) ou ODQ (10 $\mu$ M)

	pBay 41-2277 E (%)		(6) BREAC	<b>Bate</b> G0-2770E (%)	
	pEC <sub>50</sub>	$E_{max}$ (%)	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	
Grupos					
CTL	$7.00 \pm$	0.19 124±6	7.69	$0 \pm 0.13$ 115 $\pm 9$	
CTL DM-M	$7.00 \pm 0.19$	124±6	$7.69 \pm 0.13$	3 115±9	
DM-M	$7.00 \pm 0.20$	141±16	$7.65 \pm 0.09$	9 107 $\pm 5$	
DM-I	$7.06 \pm 0.16$	112±5	7.50±0.05	$119 \pm 5$	
	Bav	41-2277 + L-NA	ME Bay 60-	2770 + NAME	
	$Bav \Phi E 5.37 + L - N E Mar (%)$		b) $Bay 60-29740^{-5}$	• NAME E <sub>max</sub> (%)	
	pEC <sub>50</sub>	$E_{max}$ (%)	pEC <sub>50</sub>	$E_{max}(\%)$	
Grupos CTL	7.30 ±	0.16 91±3*	8.50=	$\pm 0.12^*$ 124 $\pm 10^{-10}$	
CTL DM-M	$7.30 \pm 0.16$	91±3*	$8.50 \pm 0.12$	* $124 \pm 10$	
DM-M	$7.78 \pm 0.10$	69±9*	$8.55 \pm 0.20$	* 117 ±9	
DM-I	$7.50 \pm 0.09$	68±11*	8.53±0.11*	$119 \pm 5$	
	Bay 41-2	277 + ODQ	Bay 60-2770 +	- ODQ	
]	$ap \Xi C_{2277} + O E Gax (\%) Bay 60$		Bay 60-27 50 ODQ	)-207EQ 50 ODQ Emax(%)	
pEC Grupos	E <sub>50</sub> E <sub>max</sub>	x (%)	pEC <sub>50</sub> E <sub>ma</sub>	x(%)	
CTL	7.20 ±0.10	64±4*	8.6± 0.13*	102±5	
TL DM-M 7.20 :	±6.98±0.84±4	#3±10 *	$8.6 \pm 0.160 \pm 0.160$	$j_{2\pm 5}95 \pm 12$	
M-MPM-I	$7.59 \pm 0.30$	70±12*	8.18±0.20*	$119 \pm 5$	
M-MPM-I	$7.59 \pm 0.30$	70±12*	8.18±0.20*	$119 \pm 5$	

A potência é representada como –log da concentração molar que produz da resposta máxima de relaxamento, em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos. P<0.05 comparado aos respectivos grupos na presença ou ausência de L-NAME (100  $\mu$ M), ou ODQ (10  $\mu$ M).

28

#### 4.8. Relaxamento induzido pelo Bay 60-2770

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao ativador da guanilato ciclase solúvel independente de NO, BAY 60-2770 (Bay, 0,0001-10  $\mu$ M) em corpo cavernoso de camundongos pré-contraídos com PE (10  $\mu$ M), na presença ou não, de ODQ (10  $\mu$ M) ou L-NAME (100  $\mu$ M). Não foram encontradas diferenças ente os grupos de resposta máxima (E<sub>max</sub>) ou potência (pEC<sub>50</sub>) na resposta relaxante dos corpos cavernosos ao Bay 60-2770 (Figura 13). Entretanto, em todos os grupos, a presença do ODQ (10  $\mu$ M) ou L-NAME (100  $\mu$ M), levou a um deslocamento da curva para a esquerda, com aumento da potência (Figuras 14-16; Tabela 3). Não houve diferença de E<sub>max</sub> para nenhum grupo avaliado. Nenhuma diferença de E<sub>max</sub> ou pEC<sub>50</sub> foi observada entre os grupos CTL, DM e DM-I, na presença L-NAME (Figura 17) ou ODQ (Figura 18).



*Figura 13:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60:  $100pM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle(CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ), e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 14:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60: 100pM – 10mM) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), na presença de ODQ 10 $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ) ou L-NAME 100 $\mu$ M, ( $\blacktriangledown$ ). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 15:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60:  $100pM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de L-NAME ( $100\mu M$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 16:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60:  $100pM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos diabéticos tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de ODQ  $10\mu M$  ( $\blacktriangle$ ) ou L-NAME 100mM, ( $\blacktriangledown$ ). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.



*Figura 17:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60:  $100pM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de L-NAME ( $100\mu M$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.


*Figura 18:* Curvas concentração-efeito ao Bay 60-2770 (Bay 60:  $100pM - 10\mu M$ ) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ), na presença de ODQ ( $10\mu M$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.9. Contração induzida pela fenilefrina (PE)

A contração foi avaliada através da construção de curvas concentração-efeito à PE em corpo cavernoso de camundongos. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e diabéticos na resposta máxima ( $E_{max}$ ), (CTL 0,59 ± 0,04 mN; DM: 0,52 ± 0,05 mN; Figura 19). Isto também ocorre com o grupo dos diabéticos tratados com insulina, não havendo diferença significativa de  $E_{max}$  em relação ao controle (DM-I: 0,51 ± 0,04 mN). O mesmo se observa corrigindo-se os valores de contração em mN pela massa (em gramas) de cada segmento de corpo cavernoso dos grupos (mN/g), (Figura 20). Essa correção se faz necessária, uma vez que a massa do corpo cavernoso dos animais diabéticos (6,5 ± 0,5mg) é significativamente menor em relação ao do grupo controle (8,1 ± 1,0mg), P<0,05. Nos animais tratados com insulina (glicemia controlada), a massa do corpo cavernoso apresentou um valor intermediário (7,3 ± 0,7 mg), significativamente menor que o

controle embora maior em relação ao grupo de animais diabéticos não tratados (P<0,05). Não são evidenciadas diferenças significativas de potência ( $pEC_{50}$ ) entre os grupos.



*Figura 19:* Curvas concentração-efeito a fenilefrina (10 nM – 100  $\mu$ M) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

![](_page_73_Figure_3.jpeg)

*Figura 20:* Curvas concentração-efeito a fenilefrina (10 nM – 100  $\mu$ M) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M dos valores em mN corrigidos pela massa (em g) de cada segmento de corpo cavernoso de 7 experimentos.

#### 4.10. Contração induzida pela estimulação elétrica

A contração neurogênica foi avaliada através da construção de curvas frequência-efeito ao estímulo elétrico em corpo cavernoso de camundongos. O diabetes mellitus não alterou a resposta contrátil induzida pelo estímulo elétrico em nenhuma das frequências (Figura 21), e o mesmo se observou quando se introduziu o grupo tratado com a insulina. Entretanto, com a correção dos valores de contração em mN pela massa (em gramas) de cada segmento de corpo cavernoso dos dois grupos (mN/g), observou-se um aumento significativo na resposta contrátil no grupo diabético não tratado em relação ao controle, nas frequências de 8, 16 e 32Hz (Figura 22). O tratamento com insulina conseguiu reverter tal diferença nas frequências de 8 e 16Hz, verificando-se que não houve diferença significativa com o controle nas frequências de 8, 16 e 32Hz, embora nesta última frequência, a diferença entre os grupos diabético e tratado com insulina (glicemia controlada) não tenha sido significativa (Figura 22).

![](_page_74_Figure_2.jpeg)

*Figura 21:* Curvas frequência-efeito a estimulação elétrica (1 - 32 Hz) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O) diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos.

![](_page_75_Figure_0.jpeg)

*Figura 22:* Curvas frequência-efeito a estimulação elétrica (1 - 32 Hz) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O) diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M , dos valores em mN corrigidos pela massa (em g) de cada segmento de corpo cavernoso, de 7 experimentos. \* P< 0,05, comparado com o grupo CTL e DM-I; <sup>#</sup> P< 0,05 comparado com o grupo CTL.

## 4.11. Relaxamento induzido pela L-cisteína (L-cys)

O relaxamento dependente da metabolização da L-cisteína (precursor metabólico fisiológico de H<sub>2</sub>S) foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à L-cys em corpo cavernoso de camundongos pré-contraídos com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu significativamente a resposta máxima (E<sub>max</sub>) da L-cys (DM: 103 ± 12%), quando comparados ao grupo controle (CTL: 139 ± 8%- Figura 23). O controle da glicemia, com a administração da insulina diária, conseguiu reverter esta redução de resposta (DM-I: 162 ± 6%-Figura 23). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para nenhum grupo.

![](_page_76_Figure_0.jpeg)

*Figura 23:* Curvas concentração-efeito à L-cisteína (L-cys: 0,001mM – 10mM) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM ■) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.12. Relaxamento induzido pelo Na<sub>2</sub>S

O relaxamento promovido pelo doador de H<sub>2</sub>S foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao Na<sub>2</sub>S em corpo cavernoso pré-contraído com PE (10  $\mu$ M). Não houve alteração de E<sub>max</sub> para nenhum dos grupos avaliados. Devido a um perfil de curva "tudo ou nada", sobretudo do grupo diabético, o cálculo de potência (pEC<sub>50</sub>) não foi aplicado para comparação. Entretanto, verificou-se diferença de resposta quando concentrações intermediárias (30 e 100 uM) são consideradas, observando-se um aumento de resposta na concentração 30 uM para os animais diabéticos (DM: 78± 6%) em relação aos outros grupos (CTL: 28± 4% e DM-I 52± 11%) e na concentração 100 uM um aumento de resposta para os animais tratados (DMI: 96 ± 6%) e não tratados (DM: 106 ± 3%) em relação ao controle (CTL: 56 ± 10%- Figura 24).

![](_page_77_Figure_0.jpeg)

*Figura 24:* Curvas concentração-efeito ao Na<sub>2</sub>S (Na<sub>2</sub>S: 0,001mM – 1mM) em corpo cavernoso de camundongos controle(CTL O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 7 experimentos. # P< 0,05, comparado com o grupo CTL e DM-I; \* P< 0,05, comparado com o grupo CTL.

#### 4.13. Relaxamento induzido pelo Dimetilsulfóxido (DMSO)

O relaxamento dependente da metabolização do DMSO (grupo funcional sulfóxido) foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao DMSO em corpo cavernoso précontraído com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu a resposta máxima (E<sub>max</sub>) ao DMSO (DM: 80  $\pm$  7%), quando comparado ao grupo controle (CTL: 150  $\pm$  6%- Figura 25). O controle da glicemia, com a administração da insulina diária, alterou este padrão de resposta, apresentando um valor de E<sub>max</sub> semelhante ao grupo controle (DM-I: 168  $\pm$  12% -Figura 25). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para o nenhum grupo.

![](_page_78_Figure_0.jpeg)

*Figura 25:* Curvas concentração-efeito ao dimetilsulfóxido (DMSO: 0,04M – 1M) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL O), diabético (DM ■) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.

#### 4.14. Relaxamento induzido pela Dimetilsulfona (DMSO<sub>2</sub>)

O relaxamento dependente do metabólito do DMSO, a DMSO<sub>2</sub> (grupo funcional sulfona) foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao DMSO<sub>2</sub> em corpo cavernoso précontraído com PE (10  $\mu$ M). O diabetes mellitus reduziu a resposta máxima (E<sub>max</sub>) a DMSO<sub>2</sub> (DM:  $30 \pm 4\%$ ), quando comparado ao grupo controle (CTL: 101  $\pm$  10%- Figura 26). O tratamento com insulina, entretanto, alterou este perfil de resposta, apresentando os animais de glicemia controlada um valor de E<sub>max</sub> semelhante ao grupo controle (DM-I: 88  $\pm$  4%-Figura 26). Não houve alteração de potência (pEC<sub>50</sub>) para o nenhum grupo.

![](_page_79_Figure_0.jpeg)

*Figura 26:* Curvas concentração-efeito a dimetilsulfona (DMSO<sub>2</sub>: 0,04M – 1M) em corpo cavernoso de camundongos controle(CTL O), diabético (DM ■) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I ●). Dados representados de média ± S.E.M de 7 experimentos.

### 4.15. Avaliação da função erétil in vivo: medida da Pressão Intracavernosa (ICP)

A função erétil *in vivo* foi avaliada através da medida da pressão intracavernosa (ICP) dos animais dos diferentes grupos, nas frequências 4, 6, 8 e 10 Hz. O diabetes mellitus diminuiu significativamente os valores de ICP nas frequências 4, 6 e 8 Hz em relação ao grupo controle. O tratamento com insulina, com controle da glicemia, alterou este perfil de resposta restaurando os valores de ICP, deixando-as próximas ao grupo controle em todas as frequências avaliadas e significativamente maiores em relação ao diabético não tratado nas menores frequências, 4 e 6 Hz (Figura 27).

![](_page_80_Figure_0.jpeg)

*Figura 27:* Medida da pressão intracavernosa induzida pela estimulação elétrica (4-10Hz) em corpo cavernoso de camundongos controle (CTL: O), diabético (DM  $\blacksquare$ ) e diabético tratado com insulina (glicemia controlada) (DM-I  $\bullet$ ). Dados representados de média  $\pm$  S.E.M de 4 experimentos. \* P< 0,05, comparado com o grupo CTL e DM-I; <sup>#</sup> P< 0,05, comparado com o grupo CTL.

# 4.16. Análise de colesterol e triglicerídeos dos animais

A tabela 4 mostra os valores de colesterol total e triglicerídeos dos animais dos diferentes grupos. O grupo de animais diabéticos apresentou maiores valores de colesterol quando comparados ao grupo controle e diabético com glicemia controlada. Os valores de triglicerídeos também são superiores neste grupo. O grupo de animais que teve a glicemia controlada com a insulina diária apresentou valores próximos aos do grupo controle.

I)			
	CTL	DM	DM-I
Colesterol	60±3	83±3*	65±2
Total (mg/dL)			
Triglicerídeo (mg/dL)	48 ± 3	$79 \pm 6^*$	53 ± 3

TABELA 4. Valores da concentração sanguínea de colesterol total e triglicerídeos dosgrupos controle (CTL), diabético (DM) e diabético tratado com insulina (DM-

Dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 5 animais. \*P < 0.05 comparado com o grupo CTL e DM-I.

## 4.17. Análise macroscópica e histológica dos animais

Os dados da análise histomorfomética do pênis dos animais dos diferentes grupos estão descritos na Tabela 5. Verifica-se uma alteração significativa da Área de secção dos corpos cavernosos (ACC) no grupo dos animais diabéticos, e um aumento significativo da Área da artéria cavernosa (ACA) nos animais com glicemia controlada. Abaixo estão figuras ilustrativas da análise (Figuras 28-30).

 TABELA 5. Avaliação histomorfométrica dos grupos controle (CTL), diabético (DM) e
 diabético tratado com insulina (DM-I)

	CTL	DM	DM-I
ACC ( $\mu m^2$ )	763296,7±57564	564857,2±15393*	628056,2±80761
ML/COL	$0,18 \pm 0.02$	$0,18 \pm 0,01$	0,14±0,01
$ACA(um^2)$	688 3+42 8	765 3+107 9	1051 2+104 9*
ACA(µIII)	000,5442,0	705,5±107,5	1051,2±104,9
$AAD(\mu m^2)$	13375,2±1649,6	13743,9±622.1	13719,6±1611,3
$AND(\mu m^2)$	33431,5±2396,2	29516,5±2666,3	28795,7±2753,1

Dados representam as médias  $\pm$  o erro padrão da média para 5 animais. \*P < 0.05 comparado com o grupo CTL . ACC: área de secção dos corpos cavernosos ML:COL: relação entra a fração de m. lisa e a de colágeno; ACA: área de secção das artérias cavernosas; AAD: área de secção da artéria dorsal unilateral e AND: área de secção do nervo dorsal unilateral.

![](_page_83_Figure_0.jpeg)

*Figura 28*: Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes aos grupos controle (a), diabético controlado (b) e diabético (c). HE, 40X (aumento original). N= nervo dorsal direito do pênis; A= artéria dorsal direita do pênis; V= veia dorsal do pênis; CC= corpo cavernoso; CE= corpo esponjoso.

![](_page_84_Figure_0.jpeg)

*Figura 29*: Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes aos grupos controle (a) diabético controlado (b) e diabético (c), demonstrando a presença de colágeno (áreas coradas em azul) no corpe cavernoso. Tricrômico de Masson, 100X (aumento original).

![](_page_85_Figure_0.jpeg)

*Figura 30:* Fotomicrografias ilustrativas da cortes transversais de pênis murino referentes aos grupos controle (a) diabético controlado (b) e diabético (c), demonstrando a presença de musculatura lisa, através da imunoexpressão de actina de músculo liso (áreas coradas em marrom) no corpo cavernoso. Setas: artéria cavernosa à direita Imunoperoxidase, 100X (aumento original).

nNOS			
Animal	CTL	DM	DM-I
1	+	+	+
2	+	+	Х
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
%	100	100	100
eNOS			
eNOS Animal	CTL	DM	DM-I
eNOS Animal	<b>CTL</b> +	<b>DM</b> +	DM-I
eNOS Animal 1 2	CTL + +	DM + +	<b>DM-I</b> - X
eNOS Animal 1 2 3	CTL + + +	DM + + -	<b>DM-I</b> - X +
<b>eNOS</b> Animal 1 2 3 4	CTL + + +	DM + + - -	<b>DM-I</b> - X + +
<b>eNOS</b> Animal 1 2 3 4 5	CTL + + + + +	DM + - - -	DM-I - X + +
<b>eNOS</b> Animal           1           2           3           4           5           6	CTL + + + + + + +	DM + - - - +	DM-I - X + + +
eNOS Animal 1 2 3 4 5 6 9%	CTL + + + + + + 100	DM + - - + 50	DM-I - X + + - + 60

TABELA 6. Imunoexpressão de eNOS e nNOS em corpo cavernoso de<br/>animais controle (CTL), diabéticos e diabéticos tratados<br/>com insulina

Critério de positividade: positividade moderada a intensa em >25% das estruturas esperadas.

Discussão

# 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, ficou evidenciado que o tratamento com insulina, controlando a glicemia do animal diabético durante todo o período estabelecido para o modelo (4 semanas), conseguiu prevenir alguns padrões de resposta de testes funcionais *in vitro* esperados (e constatados) para animais diabéticos não tratados, em relação à função erétil.

Os dados mostraram que o quadro de diabetes tipo I induzido pela estreptozotocina em camundongos, atenuou o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela Ach, bem como o relaxamento induzido por um doador de NO (SNP) no corpo cavernoso. Isto sugere que há, no grupo dos animais diabéticos, um comprometimento do endotélio, bem como na habilidade da musculatura lisa do corpo cavernoso em responder ao NO. Estas observações estão de acordo com outros estudos, que envolvem inclusive outras espécies animais (**87,88**).

Em modelos experimentais de diabetes, *in vivo* e *in vitro*, foram evidenciadas reduções no relaxamento mediado pela ACh em vasos isolados e no leito vascular (**89-91**). Os mecanismos pelos quais o diabetes mellitus promove disfunção erétil parece envolver redução da síntese ou "sequestramento" do NO devido à geração de espécies reativas de oxigênio e produtos finais da glicação (**51**, **92-93**). Parece envolver também uma maior expressão ou atividade da arginase no CC, limitando a biodisponibilidade da L-arginina para produzir o NO (**94**,**95**). Considera-se ainda a possibilidade da inibição da síntese de prostaciclina (**96**,**97**). É sugerido que o diabetes mellitus reduz o relaxamento dependente de endotélio em virtude dos níveis elevados de glicose sanguínea (hiperglicemia), associado a aumento das espécies reativas de oxigênio, que, como consequência, reduz a biodisponibilidade do NO (**98**,**99**).

Alterações na síntese ou ação do NO endotelial em ratos diabéticos foram relatados em aorta, coração, artéria mesentérica, artéria basilar e corpo cavernoso, mas não foi evidenciada alteração no

relaxamento independente de endotélio em resposta a doadores de NO (78, 100-102). No entanto, em outros estudos, verificou-se redução da resposta vasodilatadora e/ou relaxante independente de endotélio, em humanos, camundongos e ratos diabéticos (103-107). Os camundongos diabéticos deste estudo apresentaram redução do relaxamento dos CC induzido pelo doador de NO, SNP, indicando possível comprometimento da musculatura lisa do CC em responder ao NO. O tratamento com insulina preveniu esta incapacidade de resposta da musculatura lisa ao NO, em comparação com o grupo de animais diabéticos não tratados. O mesmo não se verificou com relação ao prejuízo endotelial. O comprometimento do endotélio não pode ser prevenido pelo controle da glicemia, uma vez que o relaxamento induzido pela Ach continuou diminuído nos animais tratados com insulina. A análise de imunoexpressão de eNOS no CC mostrou uma menor expressão de eNOS no animal diabético, não prevenido pelo tratamento com insulina.

Os animais dos diferentes grupos foram avaliados quanto a sua capacidade de relaxamento ao estimulador da guanilato ciclase solúvel (GCs), Bay 41-2272 e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Embora os animais diabéticos apresentem redução ao relaxamento induzido pelo SNP, não há diminuição da resposta deste grupo ao relaxamento induzido pelo BAY 41-2272. Neste caso, a guanilato ciclase solúvel (GCs) possivelmente não sofreu alteração no seu estado *redox* no grupo diabético, o que poderia comprometer sua atividade (84). Vale ressaltar que o sítio de ligação ao Bay 41-2272 e ao NO são distintos na GCs (108).

Com relação ao ativador da GCs, BAY 60-2770, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. É interessante notar que as respostas de relaxamento do CC ao BAY 60-2770 mostraram-se inclusive, aumentadas com a inibição da NO-sintase (NOS) ou oxidação do grupamento heme da enzima GCs. O relaxamento do CC ao BAY 60 -2770 foi maior na presença de L-NAME, um inibidor da NOS e na presença do ODQ, um agente que oxida o grupamento heme da enzima GCs

(**109-111**). Esta resposta foi observada tanto nos em animais do grupo controle como nos animais diabéticos, tratados ou não com insulina.

Embora tenham sido encontrados respostas semelhantes no relaxamento do CC ao BAY 41-2277 (estimulador da GCs) e ao BAY 60 -2770 (ativador da GCs), a presença do L-NAME ou ODQ sobre as respostas do CC a estes dois agenstes foram totalmente diferentes e opostas. Enquanto o relaxamento do CC ao BAY 60 -2770 foi aumentado pelo tratamento com L-NAME e ODQ, o relaxamento do CC ao BAY 41-2277 foi atenuado em todos os grupos de animais analisados. Ao contrário do BAY 41-2277, o relaxamento do CC ao BAY 60-2770 não é dependente da presença de NO endógeno ou do grupamento heme reduzido na GCs.

Resultados semelhantes já foram descritos. Dados com o BAY 58-2667, um outro ativador de GCs, utilizado em ensaios clínicos para insuficiência cardíaca aguda descompensada, apresentou atividade vasodilatadora potente e sustentada, e atividade vasodilatadora que foi aumentada pelo ODQ na circulação pulmonar fetal, em ovelha (83, 112-114). O BAY 60 -2770 mostrou ter atividade vasodilatadora nos leitos vascular pulmonar e sistêmica, reforçada por ODQ e inibição da NOS, sugerindo que a forma heme-oxidada da GCs pode ser ativada *in vivo* de um modo NO-independente para promover a vasodilatação. Isto sugere que as resposta vasodilatadora poderia ser aumentada em estados fisiopatológicos no qual o grupamento heme da GCs se encontra oxidado ou mesmo perdido (115-117).

Com relação ao relaxamento induzido pelo inibidor de PDE5, tadalafil, os dados mostram um comprometimento de resposta de relaxamento do corpo cavernoso do animal diabético utilizando-se um inibidor de PDE 5. Isto indica, que, mesmo com o aumento da concentração de GMPc, o corpo cavernoso não foi capaz de relaxar normalmente. Este resultado está de acordo com outros trabalhos, que mostram que a efetividade do inibidor de PDE5 no diabético é menor do que em indivíduos normais, sendo isto evidenciado tanto em modelos animais como em humanos (**80-81, 118-119**). Este fato ainda não é bem elucidado, mas é sugerido que a utilização de inibidores de PDE5 requer pelo menos uma função parcial dos nervos penianos (fibras NANC- não adrenérgica, não colinérgica), (**120**), que em geral é comprometida no diabetes. Também se sugere uma sinalização NO-GMPc prejudicada (**43**). O tratamento com insulina, entretanto, fez com que o corpo cavernoso do animal diabético tivesse um perfil de resposta normal, semelhante ao grupo controle. Ressalta-se que a disfunção erétil dentro do quadro do diabetes não fica limitada apenas a sintese/disponibilidade prejudicada do NO, uma vez que a musculatura lisa do corpo cavernoso do animal diabético não foi capaz de responder ao aumento do NO (pelo doador, SNP), nem ao aumento de GMPc (pelo tadalafil). Alguns dados mostram, inclusive, que a associação do doador de NO (SNP), e um inibidor de PDE5 (sildenafil), não trouxe maior relaxamento para o corpo cavernoso de ratos diabéticos (**121**). O resultado pode sugerir uma estimulação basal de GMPc prejudicada no animal diabético.

Com relação à via da RhoA/Rho-kinase não se observaram diferenças no relaxamento induzido pelo Y-27632 (inibidor da Rho-kinase) em corpo cavernoso dos camundongos diabéticos, tratados ou não com insulina. A via não se mostrou alterada neste estudo, ao contrário de outros que mostram que a RhoA/Rho-kinase são reguladas positivamente na musculatura lisa vascular de animais diabéticos (**122-124**) e que o Y-27632 melhorou a resposta erétil de ratos diabéticos, sugerindo que a atividade da Rho-quinase está aumentada no corpo cavernoso de ratos diabéticos (**125**).

Outro fator a ser considerado é a possibilidade de o diabetes reduzir o relaxamento mediado pelas fibras NANC (não adrenérgica, não colinérgica), o que já foi descrito na musculatura lisa cavernosa de ratos, de coelhos e de indivíduos diabéticos (**126**,**127**). Os dados estão de acordo com

estes dados, mostrando que camundongos diabéticos deste modelo apresentaram redução do relaxamento induzido pelo NO neurogênico, o que foi demonstrado pelos dados de alteração de relaxamento do corpo cavernoso ao estímulo elétrico (EFS), mesmo em baixas frequências, como 2Hz. O tratamento com insulina, entretanto, conseguiu prevenir esta redução do relaxamento, que passou a ser semelhante ao grupo de animais controle.

A insulina mostrou ter efeitos benéficos sobre a nNOS (NO sintase neuronal, nos nervos nitrérgicos), sendo capaz de restaurar a quantidade e atividade da enzima no corpo cavernoso de ratos (128), reduzida em alguns modelos animais (93), embora sua expressão não tenha se mostrado alterada nos dados aqui apresentados. Efeito semelhante foi visto também em cerebelo de ratos, sendo que a insulina conseguiu normalizar a atividade da nNOS, que se apresentava menor no animal diabético (129).

Além da avaliação da resposta de relaxamento do corpo cavernoso de animais diabéticos, com e sem tratamento com insulina, os dados avaliam também um possível comprometimento da resposta contrátil e nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada com relação à resposta ao agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. Em animais diabéticos obesos, a resposta contrátil na musculatura lisa de corpo cavernoso e de bexiga urinária produzida por agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos e estimulação elétrica mostrou-se alterada em alguns estudos (**41**, **130**). Em aorta de camundongos espontaneamente diabéticos (db/db), verificou-se um aumento da atividade contrátil à noradrenalina, sugerindo-se uma participação do acúmulo de ânions superóxido no plasma, podendo levar a uma maior formação de prostanóides com atividade vasoconstritora. Esta maior produção de prostanóides, associada com uma menor formação e/ou aumentada degradação do NO, poderia contribuir para a maior resposta contrátil (**131**). Também há evidências de uma *up-regulation* da PKC, que poderia alterar a resposta contrátil pela fosforilação de proteínas (**85**). Os dados dos animais diabéticos não tratados, não mostram diferenças significativas na resposta ao agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, mas uma alteração na resposta ao estímulo elétrico, o que não exclui a possibilidade de um comprometimento na liberação de catecolaminas e sinalização adrenérgica. Este comprometimento, porém, é prevenido pela administração da insulina diária, o que indica que o controle da glicemia é capaz de proteger o corpo cavernoso de alterações na sinalização adrenérgica.

Além da via NO-GCs-GMPc, a via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S também foi avaliada. Pela primeira vez, foi demonstrado que a via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S encontra-se alterada em corpo cavernoso isolado de camundongos diabéticos. As alterações encontradas foram revertidas com o controle da glicemia (< 11mM), pela administração de insulina diária.

Os dados aqui apresentados de relaxamento induzido pela L-cisteína evidenciam que há um comprometimento do relaxamento do CC do animal diabético envolvendo a via do H<sub>2</sub>S. Dados semelhantes foram observados em aorta de camundongos diabéticos (diabetes tipo 1), em dois níveis de severidade do quadro de diabetes, sendo um mais brando, e outro, um quadro de diabetes severa, com valores altos de glicemia e glicosúria acentuada. Nos dois níveis de diabetes estudado observou-se um menor relaxamento da aorta, induzido pelas L-cisteína (**132**). A produção de H<sub>2</sub>S induzido por L-cisteína na aorta (correlacionado com a atividade enzimática da CBS e CBE), também estava reduzida, mostrando uma dificuldade na conversão de L-cisteína em H<sub>2</sub>S. No diabetes severo, com glicemia em valores mais altos, esta conversão em H<sub>2</sub>S foi ainda mais deficitária. É interessante esta relação de maior comprometimento da produção de H<sub>2</sub>S e de conversão da L-cisteína em H<sub>2</sub>S com a severidade do quadro de diabetes, correlacionado com maior nível glicêmico. Os dados aqui apresentados mostram que o controle da glicemia, com a administração da insulina diária conseguiu prevenir este comprometimento do relaxamento do CC induzido pela L-cisteína. Uma vez que a L-cisteína é um precursor metabólico fisiológico de H<sub>2</sub>S,

fica evidenciado que a via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S não é afetada no diabetes quando a glicemia é mantida próxima a valores considerados normais para o camundongo.

Desta forma, verifica-se um possível comprometimento da produção endógena de  $H_2S$  em condições de hiperglicemia, com uma provável dificuldade do tecido em converter L-cisteína em  $H_2S$ , sendo isto visto tanto em aorta (132), como em CC de camundongo, de acordo com os dados aqui apresentados. Entretanto, com o doador de  $H_2S$ , Na<sub>2</sub>S, este padrão de resposta não se manteve, e não se verificou diferença de resposta máxima entre os grupos, quando o doador foi usado. Porém, verificou-se para o animal diabético um perfil de resposta "tudo ou nada", atingindo uma maior relaxamento já em 30uM em relação aos outros grupos. Um aumento de resposta máxima de relaxamento também foi observado com aorta do camundongo diabético (132), em um quadro severo de diabetes, quando um doador de  $H_2S$ , no caso o NaHS, foi utilizado. Os dados podem sugerir um efeito compensatório a uma produção endógena deficiente no diabetes.

Ainda com relação à via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S, os dados do relaxamento induzido pelo DMSO mostraram que no CC dos animais diabéticos há um comprometimento na resposta, com a redução da resposta máxima. Esta é a primeira demonstração que o DMSO relaxa CC. Estes dados com o DMSO no grupo diabético também podem sugerir um comprometimento na via de formação do H<sub>2</sub>S, uma vez que o DMSO possui como grupo funcional um radical sulfóxido, que pode ser, ao menos em parte, metabolizado, e finalmente convertido em H<sub>2</sub>S, ou mesmo SO<sub>2</sub>. Não há dados em CC, mas em bexiga a administração de DMSO reduziu significativamente contrações induzidas por estímulo elétrico (**133**). Em músculo detrusor de coelho, o DMSO reduziu a fosforilação da cadeia leve de miosina, sugerindo que este composto possa ter grande importância em distúrbios que envolvam aumento da contratilidade (**134**). A sugestão proposta para este efeito seria uma alteração

na sensibilidade dos filamentos ao  $Ca^{2+}$ , (sem alteração do  $Ca^{2+}_{i}$ ), através da alteração da atividade de quinases envolvidas na fosforilação da miosina.

Um fato para se considerar é que o controle da glicemia conseguiu restaurar a capacidade do CC ao relaxamento ao DMSO. Considerando-se que o efeito relaxante esteja relacionado supostamente à metabolização do radical sulfóxido a H<sub>2</sub>S ou SO<sub>2</sub>, estes dados são desta forma, complementares ao visto para a L-cisteína. O mesmo pode ser especulado para o radical sulfona, com os dados de relaxamento a DMSO<sub>2</sub>.

Para a complementação dos dados, os níveis de colesterol e triglicerídeos também foram avaliados. Verificou-se um aumento do nível de colesterol no animal diabético com glicemia mais alta, ao contrário do animal tratado com insulina. O mesmo acontece para o nível de triglicerídeos, que se apresentou maior para o diabético com glicemia mais alta em comparação com os grupos controle e diabéticos com glicemia controlada. Níveis elevados de colesterol e de triglicerídeos são frequentemente encontrados em pacientes diabéticos, e estes são fatores que contribuem para o desenvolvimento da disfunção erétil (**126**, **135-136**).

Complementando as análises funcionais, os diferentes grupos foram comparados com relação à morfologia peniana. Conforme mostrado nos resultados, o diabetes levou a uma atrofía do corpo cavernoso do animal diabético em relação ao controle e o tratamento com insulina conseguiu reverter esta alteração. A atrofía observada acometeu todos os compartimentos histológicos de forma proporcional. Observou-se uma hiperplasia de camada muscular da artéria cavernosa nos animais diabéticos com glicemia controlada, o que provavelmente reflete um efeito da insulina, que possui uma ação proliferativa (137). O mesmo não foi observado em relação às artérias dorsais. Os dados estão de acordo com a literatura, uma vez que alterações morfológicas no pênis foram relatadas em homens e animais diabéticos (138-141). Em coelhos diabéticos, se observou por análise

histomorfométrica uma diminuição da musculatura lisa dos corpos cavernosos, sendo isto progressivo com o aumento da gravidade do diabetes (138). Alterações vasculares também foram relatadas, com fibrose da artéria peniana e dos tecidos conectivos do pênis, além de fibrose da artéria cavernosa, com diminuição do lúmen e até presença de trombos (142). Por micro tomografia computadorizada de raios-X em 3-D em coelhos diabéticos, se verificou uma diminuição do volume dos sinusóides e da fração das artérias do corpo cavernoso, bem como uma diminuição do lúmen da artéria cavernosa (143). Tais alterações sugerem um comprometimento no mecanismo de veno-oclusão e do próprio influxo de sangue, levando a um quadro de disfunção erétil.

Conclusões

## 6. Conclusões

Em conclusão, os dados comprovaram que o tratamento com a insulina, para controle da glicemia do animal diabético, pode restaurar o comprometimento da musculatura lisa do corpo cavernoso do animal diabético, embora não tenha sido efetivo para reverter o dano endotelial. A GCs não se mostrou alterada neste modelo de diabetes, assim como a via da RhoA/Rho kinase. A insulina pôde restaurar um possível comprometimento na sinalização adrenérgica e/ou liberação de catecolaminas sugerida nos animais diabéticos. Verificou-se um comprometimento da via CBS-CSE-H<sub>2</sub>S, o que foi prevenido pelo controle da glicemia. Alterações morfológicas compatíveis com o quadro de diabetes foram encontradas, sendo também prevenidas pela insulina, embora um efeito proliferativo, provavelmente da insulina, tenha sido observado na artéria cavernosa.

Referências Bibliográficas

# 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. In: Walsh PC, Retik AB et al., eds. Campbell's urology. Darien: Saunders, 1998:1155–1174.
- 2-Abouseif SR, Tanagho EA, Anatomy of the penis. In: Hellstrom JG, ed. The handbook of sexual dysfunction. San Fransisco: Allen Press, 1999:2–6.
- 3-Lue TF. Erectile dysfunction. N Engl J Med. 2000; 342: 1802–1813.
- 4-Russell S, Nehra A. The physiology of erectile dysfunction. Herz. 2003; 28(4):277-283.
- 5-Andersson K, Stief C. Penile erection and cardiac risk: pathophysiologic and pharmacologic mechanisms. Am J Cardiol. 2000; 86:23F–26F.
- 6-Dean RC, Lue TF (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. Urol Clin., North Am. 2005; 32: 379-395.
- 7-Bosch RJ, Benard F, Aboseif SR, et al. Penile detumescence: characterization of three phases. J Urol. 1991;146: 867.
- 8-Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. J Physiol. 2000; 522(Pt 2):177.
- 9-Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, et al. Human and rabbit cavernosal smooth muscle cells express Rhokinase. Int J Impot Res. 2002; 14:1.
- 10- Wang H, Eto M, Steers WD, et al. RhoA-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function. J Biol Chem. 2002; 277:306-314.
- 11-Gratzke C, Strong TD, Gebska MA, Champion HC, Stief CG, Burnett AL, Bivalacqua TJ. Activated RhoA/Rho kinase impairs erectile function after cavernous nerve injury in rats. J Urol. 2010; 184(5):2197-2204.

- 12- Guagnini F, Ferazzini M, Grasso M, Blanco S, Croci TJ. Erectile properties of the Rho-kinase inhibitor SAR407899 in diabetic animals and human isolated corpora cavernosa .Transl Med. 2012 Mar 23;10:59.
- 13- Walsh MP. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. Biochem Cell Biol 1991; 69:771.
- 14- Andersson KE, Wagner G .Physiology of penile erection. Physiol Rev 1995; 75: 191-236.
- 15- Saenz de Tejada I, Blanco R, Goldstein I, Azadzoi K, de las Morenas A, Krane RJ, Cohen RA. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum I. Responses of isolated tissue. Am J Physiol 1988; 254: H459-467.
- 16- Teixeira CE, Moreno RA, Ferreira U, Rodrigues Netto N JR, Fregonesi A, antunes E, De Nucci G. Pharmacological characterization of kinin-induced relaxation of human corpus cavernosum. Br J Urol 1998; 81: 432-436.
- 17- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacol Rev 2000; 52: 375-414.
- Toda N Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. Pharmacol Ther 2005; 106(2): 233-266.
- 19-Burnett AL .Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. Int J Impot Res. 2004; Suppl 1: S15-19.
- 20-Miner M, Seftel AD, Nehra A, Ganz P, Kloner RA, Montorsi P, Vlachopoulos C, Ramsey M, Sigman M, Tilkemeier P, Jackson G. Prognostic utility of erectile dysfunction for cardiovascular disease in younger men and those with diabetes . Am Heart J 2012;164(1):21-8.
- 21- Dong JY, Zhang YH, Qin LQ. Erectile dysfunction and risk of cardiovascular disease: metaanalysis of prospective cohort studies. J Am Coll Cardiol. 2011; 20;58(13):1378-85. Review.

- 22- Montague, DK., Jarow, JP., Broderick, GA., Dmochowski, RR., Heaton, JP., Lue, TF. et al. Erectile dysfunction guideline update panel, chapter 1: the management of erectile dysfunction—an AUA update. J Urol. 2005; 174: 230.
- 23- Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the minority health institute expert advisory panel. 2005; J Sex Med. 2005;2(1):40-52.
- 24- Vickers MA, Satyanarayana R. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. Int J Impot Res. 2002; 14(6):466-471
- 25- Vickers MA, Wright EA. Erectile dysfunction in the patient with diabetes mellitus. Am J Manag Care. 2004; 10(1 Suppl):S3-11; quiz S12-6.
- 26- Moulik PK, Hardy KJ. Hypertension, anti-hypertensive drug therapy and erectile dysfunciton in diabetes. Diabetic Medicine. 2003; 20: 290-293.
- 27-Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. Diabetes Care. 2003; 26(5):1553-79.
- 28- P. Sun, A. Cameron, A. Seftel, R. Shabsigh, C. Niederberger and A. Guay. Erectile dysfunction-an observable marker of diabetes mellitus? A large national epidemiological study. J Urol 2006; 176: 1081-1085.
- 29- Ponholzer A, Temml C, Mock K, Marszalek M, Obermayr R, Madersbacher S. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire. Eur Urol. 2005; 47(1):80-86.
- 30- Yamasaki H, Ogawa K, Sasaki H, Nakao T, Wakasaki H, Matsumoto E, Furuta H, Nishi M, Ueda K, Iwo K, Nanjo K. Prevalence and risk factors of erectile dysfunction in Japanese men with type 2diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2004; 66 Suppl 1:S173-7.

- 31- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urol. 1994;151(1):54-61.
- 32- Long T, Liu G, Wang Y, Chen Y, Zhang Y, Qin D.TNF-α, Erectile Dysfunction, and NADPH Oxidase-Mediated ROS Generation in Corpus Cavernosum in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Sex Med. 2012; 9(7):1801-14.
- Musicki B, Burnett AL. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. Int J Impot Res. 2007;19(2):129-38.

34- Hakim LS, Goldstein I. Diabetic sexual dysfunction. Endocrinol Metab Clin North Am 1996; 25:379-400.

35- Benet AE. The epidemiology of erectile dysfunction. Urol Clin North Am Melman A. 1995; 22: 699-709.

36- Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. Int J Androl. 2006; 29(4):482-8.

37- Gür S, Oztürk B, Karahan ST.Impaired endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from diabeticrats: improvement with L-arginine. Urol Res. 2000 ;28(1):14-9.

- 38- Elabbady A, Hassouna MM, Elhilali M. Apomorphine versus mating behavior in testing erectile capabilities of diabetic rats. Urology 1995; 45(4):715-9.
- 39- McVary KT, Rathnau CH, McKenna KE. Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR rat: a role of central neuropathy. Am J Physiol. 1997; 272(1 Pt 2):R259-67.
- 40- Albersen M, Lin G, Fandel TM, Zhang H, Qiu X, Lin CS, Lue TF. Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. Urology. 2011; 78(2):476.e1-8. Epub 2011 May 31.

- 41- Wingard C, Fulton D, Husain S. Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. J Sex Med 2007. 4: 348-62.
- 42- Rehman J, Chenven E, Brink P, Peterson B, Walcott B, Wen YP, Melman A, Christ G . Diminished neurogenic but not pharmacological erections in the 2- to 3-month experimentally diabetic F-344 rat. Am J Physiol. 1997; 272: H1960-71.
- 43- Angulo J, González-Corrochano R, Cuevas P, Fernández A, La Fuente JM, Rolo F, Allona A, Sáenz de Tejada I. Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. J Sex Med. 2010; 7(2 Pt 1):758-68.
- 44- Angulo J, Cuevas P, Gabancho S, Gonzalez-Corrochano R, Videla S, Saenz de Tejada I.Enhancement of both EDHF and NO/cGMP pathways is necessary to reverse erectile dysfunctionin diabetic rats. J Sex Med. 2005; 2(3):341-6.
- 45- Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alphalipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. Diabetologia 1999; 42: 343-350.
- 46- Bemelmans BL, Meuleman EJ, Doesburg WH, Notermans SL, Debruyne FM Erectile dysfunction in diabetic men: the neurological factor revisited. J Urol 1994; 151: 884-889.
- 47-Cai H, Harrison DG Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res 2000; 87: 840-844.
- 48- Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Diabetologia 2001; 44: 1973-1988.
- 49- Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Adams D, Namara DB, Abdel-Mageed AB, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase partially restores nitric oxide synthesis and erectile function in streptozotocin diabetic rats. J Urol. 2003; 169(5):1911-7.

- 50- Ehmke H, Junemann KP, Mayer B, Kummer W. Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. Int J Impot 1995; Res 7: 147-156.
- 51- Seftel AD, Vaziri nd, NI Z, Razmjouei K, Fogarty J, Hampel N, Polak J, WAng RZ, Ferguson K, Block C, Haas C. Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through iNOS or eNOS. Urology 1995; 50(6):1016-1026.
- 52- Mclean KN, Janosik M, Kraus E, Kozich V, Allen RH, Raab BK, Kraus JP. Cystathionine betasynthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and Saccharomyces cerevisiae. J Cell Physiol. 2002; 192: 81–92.
- 53- Ge Y, Konrad MA, Matherly LH, Taub JW. Transcriptional regulation of the human cystathionine beta-synthase-1b basal promoter: synergistic transactivation by transcription factor NF-Y and Sp1/Sp3. Biochem J. 2001; 357:1, 97-105.

54- Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayahsi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. Biochem J 2004; 381: 113-123.

55- Dominy JE, Stipanuk MH. New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H2S, a neuromodulator and smooth muscle relaxant. Nutr Rev 2004 ; 62: 348–353.

56- Whiteman, M, Moore, PK. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? J Cell Mol Med. 2009; 13(3): 488-507.

- 57- Martelli A, Testai L, Marino A, Breschi MC, Da Settimo F, Calderone V. Hydrogen sulphide: biopharmacological roles in the cardiovascular system and pharmaceutical perspectives. Curr Med Chem. 2012; 19(20):3325-36.
- 58- Liang, GH, Adebiyi A, Leo MD, McNally EM, Leffler CW, Jaggar JH. Hydrogen sulfide dilates cerebral arterioles by activating smooth muscle cell plasma membrane K<sub>ATP</sub> channels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 300(6): H2088–H2095.

- 59- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. Embo J. 2001; 20(21): 6008-16.
- 60- Streeter E, Hart J, Badoer E. An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2012, in press.
- 61- Munaron L, Avanzato D, Moccia F, Mancardi D. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. Cell Calcium. 2012, in press.
- 62- Fusco F, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Mitidieri E, Cirino G, Sorrentino R, Mirone V. Sildenafil Effect on the Human Bladder Involves the L-cysteine/Hydrogen Sulfide Pathway: A Novel Mechanism of Action of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors. Eur Urol. 2012, in press.
- 63- Du JB, Yan H, Cheung YF, et al. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. Heart Vessels 2004; 19(2):75-80.
- 64- Yan H, Du JB, Tang CS. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. Biochem Biophys Res Commun 2004; 313(1):22-27.
- 65- Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science 2008; 322(5901):587-90.
- 66- Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29(2):173-179.
- 67- Gao C, Xu DQ, Gao CJ, Ding Q, Yao LN, Li ZC, Chai W. An exogenous hydrogen sulphide donor, NaHS, inhibits the nuclear factor κB inhibitor kinase/nuclear factor κb inhibitor/nuclear factor-κB signaling pathway and exerts cardioprotective effects in a rat hemorrhagic shock model.Biol Pharm Bull. 2012; 35(7):1029-34.

- 68- Sun WH, Liu F, Chen Y, Zhu YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 4;421(2):164-9.
- 69- Wallace, JL, Ferraz, JGP, Muscara MN. Hydrogen Sulfide: An Endogenous Mediator of Resolution of Inflammation and Injury Antioxid Redox Signal 2012, in press.
- 70-Wallace JL. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract. Antioxid Redox Signal. 2010; 12: 1125–1133.
- 71-Srilatha B, Adaikan PG, Li L, Moore PK. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. J Sex Med. 2007; 4(5):1304-1311.
- 72- d'Emmanuele R, Sorrentinoa R, Maffiaa P, Mirone V, Imbimbob C, Fuscob F, Palmad R, Ignarro LJ, Cirino G. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smoothmuscle relaxation. PNAS. 2009; 106 (11), 4513–4518.
- 73- Ghasemi M, Dehpour AR, Moore KP, Mani AR. Role of endogenous hydrogen sulfide in neurogenic relaxation of rat corpus cavernosum. Biochem Pharmacol. 2012; 1;83(9):1261-8.
- 74- Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. Adv Cardiol. 2008; 45:1-16.
- 75- Hanssen KF. Blood glucose control and microvascular and macrovascular complications indiabetes. Diabetes. 1997; 46 Suppl 2:S101-3.
- 76- Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. Physiol Res. 2004;53(2):131-42.
- 77- Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. Endocr Rev. 2001; 22(1):36-52.
- 78- Johnstone, MT, Creager, BSN, Scales, KM., Cusco, JA., Lee, BK, Creager, MA Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Circulation 1993; 88: 2510–2516.
- 79- Francis SH, Corbin JD. PDE5 inhibitors: targeting erectile dysfunction in diabetics. Curr Opin Pharmacol. 2011;11(6):683-8.
- 80- Hatzimouratidis K, Hatzichristou DG. A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient? Drugs. 2005;65(12):1621-50.
- 81- Goldestein I, Young JM, , Fisher J, Bangerter K, Segerson T, taylor T. Vardenafil, a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the reatmente of erectile dysfunction in men with diabetes: a multicenter double-bind placebo-controlled fixe-dose study. Diabetes Care 2003; 26: 777-783.
- 82-Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 2006; 5: 755-768.
- 83-Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. Br J Pharmacol 2002; 136: 773-783.
- 84- Stasch, JP, Schimidt, PM, Nedvetsky, P, Nedvetskaya, TY, Kumar, AHS, Meurer, S, Deille, M, Taye, A, Knorr, A, Lapp, H, Müler, H, Turgay, Y, Rothkegel, C, Tersteegen, A, Kemp-Harper, B, Müller-Esteri, W, Schmidt, HHW. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. J Clin Invest. 2006; 116: 2552-2561.
- 85-Nangle MR, Cotter MA, Cameron NE. Protein kinase C inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. Eur Pharmacol 2003; 475:99-106
- 86- Yu X, Tesiram YA, Towner RA, Abbott A, Patterson E, Huang S, Garret MW et al. Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI) Cardiovasc Diabetol 2007; 6: 1-8.

- 87- Durante W, Sen, AK, Sunahara, FA. Impairment of endothelium dependent relaxation in aorta from spontaneously diabetic rats. Br J Pharmacol 1998; 94: 463–468.
- 88-Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. Diabetologia 1999, 42: 343-350.
- 89- Yakubu MA, Sofola OA, Igbo I, Oyekan AO. Impaired endothelium-dependent and independent relaxation of aorta from diabetic rats. Bratisl Lek Listy. 2012;113(2):59-63.
- 90- Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. Hypertension 1998; 31(5):1047-1060.
- 91- Makino A, Kamata K. Time-course changes in plasma endothelin-1 and its effects on the mesenteric arterial bed in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Obes Metab 2000; 2(1):47-55.
- 92- Khan MA, Thompson CS, Jeremy JY, Mumtaz FH, Mikhailidis P, Morgan RJ. The effect of superoxide dismutase on nitric oxide-mediated and electrical field-stimulated diabetic rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. BJU Int. 2001; 87(1):98-103.
- 93- Vernet D, Cai L, Garban H, Babbitt ML, Murray FT, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. Endocrinology 1995; 136(12): 5709-5717.
  - 94- Jelodar G, Razmi N, Gholampour V. Arginase alteration in the reproductive system of alloxan-diabetic dogs. J Reprod Dev. 2007; 53(2):317-21.
- 95- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. Biochem Biophys Res Commun 2001; 18:923-927.
- 96- Marrachelli VG, Centeno JM, Miranda I, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alborch E. Diabetes impairs the atrial natriuretic peptide relaxant action mediated by potassium channels and prostacyclin in the rabbit renal artery. Pharmacol Res. 2012 in press

- 97- Jeremy JY, Thompson CS, Mikhailidis DP, Dandona P. Experimental diabetes mellitus inhibits prostacyclin synthesis by the rat penis: pathological implications. Diabetologia 1985; 28(6):365-368.
- 98- Leo CH, Joshi A, Hart JL, Woodman OL. Endothelium-dependent nitroxyl-mediated relaxation is resistant to superoxide anion scavenging and preserved in diabetic rat aorta. Pharmacol Res. 2012. in press
- 99- Büyükafşar K, Un I. Effects of the Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, on the corpus cavernosum from diabetic mice. Eur J Pharmacol 2003; 11:235-238.
- 100- Yakubu MA, Sofola OA, Igbo I, Oyekan AO. Impaired endothelium-dependent and independent relaxation of aorta from diabetic rats. Bratisl Lek Listy. 2012;113(2):59-63.
- 101- Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Corpus cavernosum dysfunction in diabetic rats: effects of combined alpha-lipoic acid and gamma-linolenic acid treatment. Diabetes Metab Res Rev 2001; 17(5):380-386.
- 102- Ghasemi M, Sadeghipour H, Asadi S, Dehpour AR. Time-dependent alteration in cromakaliminduced relaxation of corpus cavernosum from streptozocin-induced diabetic rats. Life Sci 2007; 81:960-969.
- 103- Kobayashi T, Taguchi K, Takenouchi Y, Matsumoto T, Kamata K. Insulin-induced impairment via peroxynitrite production of endothelium-dependent relaxation and sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function in aortas from diabetic rats. Free Radic Biol Med. 2007; 43(3):431-443.
- 104- Taguchi K, KobayashI T, Hayashi Y, Matsumoto T, Kamata K. Enalapril improves impairment of SERCA-derived relaxation and enhancement of tyrosine nitration in diabetic rat aorta. Eur J Pharmacol 2007. 556:121-128.
- 105- Bratkovsky SV, Aasum E, Riemersma RA, Myhre ES, Larsen TS. Reduced coronary reserve in response to short-term ischaemia and vasoactive drugs in ex vivo hearts from diabetic mice. Acta Physiol 2006; 186(3):171-177.

- 106- McVeigh SE., Brennan GM., Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes, JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1992; 35:771–776.
- 107- Arora S, Smakowski P, Frykberg RG, Simeone LR, Freeman R, Logerfo FW, Veves A. Differences in foot and forearm skin microcirculation in diabetic patients with and without neuropathy. Diabetes Care. 1998; 21(8):1339-1344.
- 108- Kosarikov DN, Lee JM, Uversky VN, Counts Gerber N. Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. J Inorg Biochem. 2001; 15;87(4):267-76.
- 109- Tseng CM, Tabrizi-Fard MA, Fung HL. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation.J Pharmacol Exp Ther. 2000;292(2):737-42.
- 110. Zhao Y, Brandish PE, DiValentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. Biochemistry. 2000; 5;39(35):10848-54.
- 111- Homer KL, Fiore SA, Wanstall JC. Inhibition by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) of responses to nitric oxide-donors in rat pulmonary artery: influence of the mechanism of nitric oxide generation. J Pharm Pharmacol. 1999; 51(2):135-9.
- 112- Lapp H, Mitrovic V, Franz N, Heuer H, Buerke M, Wolfertz J, Mueck W, Unger S, Wensing G, Frey R. Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure. Circulation. 2009; 2;119(21):2781-8.
- 113- Mueck W, Frey R. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, in patients with acute decompensated heart failure. Clin Pharmacokinet. 2010; 49(2):119-29.
- 114- Chester M, Tourneux P, Seedorf G, Grover TR, Gien J, Abman SH. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, causes potent and sustained pulmonary vasodilation in the ovine fetus. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297(2):L318-25.

- 115- Pankey EA, Bhartiya M, Badejo AM Jr, Haider U, Stasch JP, Murthy N, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 300(3):H79S2-802.
- 116- Zhou Z, Pyriochou A, Kotanidou A, Dalkas G, van Eickels M, Spyroulias G, Roussos C, Papapetropoulos A. Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 295(4):H1763-71.
- 117- Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure.
  Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC Jr.
  Hypertension. 2007; 49(5):1128-33.
- 118- Brock GB, McMahon CG, Chen KK, Costigan T, Shen W, Watkins V, Anglin G, Whitaker S. Efficacy and safety of tadalafil for the treatmente of erectile dysfunction: results of intregrated analyses. J Urol 2002; 168: 1332-13336
- 119- Rendell MS, Rajfer J, Wicher PA, Smith MD. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a ramdomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. JAMA 1999; 281: 421-426.
- 120-Lowentritt BH, Scardino PT, Miles BJ, Orejuela FJ, Schatte EC, Slawin KM, Elliott SP, Kim ED. Sildenafil citrate after radical retropubic prostatectomy.J Urol 1999; 162:1614-1617.
- 121- Taher A, Birowo P, Kamil ST, Shahab N. Relaxation effect of nitric oxide-donor on diabetic penile smooth muscle in vitro. Clin. Hemorheol Microcirc 2000; 23: 277-281.
- 122- Miao L, Calvert JW, Tang J, Zhang JH. Upregulation of small GTPase RhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. Life Sci. 2002; 26;71(10):1175-85.
- 123- Sandu OA, Ragolia L, Begum N. Diabetes in the Goto-Kakizaki rat is accompanied by impaired insulin-mediated myosin-bound phosphatase activation and vascular smooth muscle cell relaxation. Diabetes 2000; 49(12):2178-2189.
- 124- Chang S, Hypolite JA, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, Disanto ME. Increased contractility of diabetic rabbit corpora smooth muscle in response to endothelin is mediated via Rho-kinase beta. Int J Impot Res. 2003; 15(1):53-62.

- 125- Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Cellek S, Chitaley K, Webb RC, Lewis RL, Mills TM, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. Proc Natl Acad Sci 2004; 101(24):9121-9126.
- 126- Azadzoi KM & Saenz De Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. J. Urol. 1991; 146: 238-240.
- 127- Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Corpus cavernosum dysfunction in diabetic rats: effects of combined alpha-lipoic acid and gamma-linolenic acid treatment. Diabetes Metab Res Rev 2001; 17(5):380-386.
- 128- Xu ZS, Fu Q, Zhao ST, Liu HN. Effect of diabetes and insulin treatment on nitric oxide synthase content in rat corpus cavernosum. Asian J Androl 2001; 3:139-142.
- 129- Yu WJ, Juang SW, Chin WT, Chi TC, Chang CJ, Cheng JT. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci 2000; 68:625-634.
- Disanto ME. Contractile mechanisms in diabetes-related erectile dysfunction. Curr Pharm Des 2005; 3995-4010.
- 131- Kanie K, Kamata K. Contractile responses in spontaneously diabétic mice I. Involvement of superoxide anion in enhanced contractile response of aorta to norepinephrine in C57BL/KsJ (db/db) mice. Gen Pharmacol 2002; 35: 311-318.
- 132- Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V, Gruttola L, Bucci M and Cirino G. Biosynthesis of H2S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. Br J Pharmacol. 2008; 155, 673–680.
- 133- Melchior D, Packer CS, Johnson TC, Kaefer M. Dimethyl sulfoxide: does it change the functional properties of the bladder wall? J Urol. 2003; 170(1):253-258.
- 134- Shiga KI, Hirano K, Nishimura J, Niiro N, Naito S, Kanaide H. Dimethyl sulphoxide relaxes rabbit detrusor muscle by decreasing the Ca2+ sensitivity of the contractile apparatus. Br J Pharmacol. 2007; 151(7):1014-1024.
- 135- Vrentzos GE, Paraskevas KI, Mikhailidis DP. Dyslipidemia as a risk factor for erectile dysfunction. Curr Med Chem. 2007; 14: 1765-1770.136

136- Xie D, Odronic SI, Wu F, Pippen AM, Donatucci CF, Annex BH. A mouse model of hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction. J Sex Med. 2007; 4: 898-907.

137- Reusch JE, Bhuripanyo P, Carel K, Leitner JW, Hsieh P, DePaolo D, Draznin B. Differencial requirement for p21ras activation in the metabolic signaling by insulin. J Biol Chem. 1995; 270: 2036-2040.

- 138- Gupta S, Moreland R B, Pabby A, Goldstein I, Nehra A. Diabetes induced structural changes in rabbit corpus cavernosum. Int J Impot Res. 1996; 8: 136-138.
- 139- Conti, G. and Virag, R. Human penile erection and organic impotence: normal histology and histopathology. Urol Int 1989; 44: 303-308.
- 140- Jevtich, MJ, Kass, M, Khawand, N. Changes in the corpora cavernosa of impotent diabetics: comparing histological with clinical findings. J Urol. 1985; 91: 281-285.
- 141- Cohen MS, Sharpe W, Warner RS, Zorgniotti A. Morphology of corporal cavernosa arterial bed in impotence. Urology 1980; 16(4):382-385.
- 142- Ruzbarsky V, Michal, V. Morphologic changes in the arterial bed of the penis with aging. Relationship to the pathogenesis of impotence. Invest Urol. 1997; 15: 194-199.
- 143- Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL, Moreland RB, Nehra A. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. J Urol. 2001; 165(5):1776-1782.