





Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Carla Daniela da Silva Pereira

## “Papel dos Recetores Purinérgicos no Crescimento e Remodelação do Tecido Cavernoso”

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia de Sá, Professor Catedrático do ICBAS/UP, e investigador responsável pelo grupo de investigação “Farmacologia e Neurobiologia” e coorientação da Professora Doutora Adelina Costa e do Professor Doutor Miguel Faria. A coorientação institucional foi desempenhada pela Professora Doutora Cristina Prudêncio, professora coordenadora do mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde ESTSP/IPP.

Mestrado em **Tecnologia Bioquímica em Saúde**

Setembro de 2013

*“There are only two days in the year that nothing can be done. One is called yesterday  
and the other is called tomorrow”*

*Dalai Lama*

*Dedico aos meus pais, pois sem eles nada seria possível.*

## **Agradecimentos:**

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP, pela orientação, pelo dinamismo contagiante, pelo apoio fundamental na realização das experiências e por todos os conhecimentos transmitidos indispensáveis para a evolução do meu conhecimento científico.

À Professora Doutora Adelina Costa pelo acompanhamento, conhecimentos essenciais, incentivo, boa disposição e apoio em todas as situações.

Ao Professor Doutor Miguel Faria pelo seu suporte na realização das experiências funcionais e apoio nos resultados.

À Doutora Fátima Ferreirinha pelo tempo disponibilizado, esforço e conhecimentos que me transmitiu na realização de experiências de imunofluorescência.

Um agradecimento especial ao Mestre Bernardo Noronha Matos pelo apoio nos resultados, mas também pela paciência, conselhos e palavras encorajadoras nos momentos essenciais, e por ser uma grande inspiração para mim.

Agradeço à Mestre Alexandra Leite e ao Pedro Paiva por todos os conhecimentos que me passaram numa fase muito importante.

E agradeço a todos os membros do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia ICBAS-UP pela alegria e boa disposição que me ofereceram nestes meses de convívio diário, em especial ao grupo das células.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio por toda a sua disponibilidade e compreensão.

Agradeço ao Professor Doutor Rúben Fernandes pela dedicação, simpatia contagiante, otimismo e boa disposição.

E um agradecimento especial à minha família, aos meus pais, a quem reconheço tudo o que sempre fizeram por mim, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim. À minha irmã, por me acompanhar em todos os momentos da minha vida. E ao meu namorado Luís Cláudio por todo o seu amor, apoio, e pela alegria que dá à minha vida.

## Resumo:

A adenosina é um nucleósido ubíquo envolvido na regulação de controlo do tónus vascular do tecido cavernoso, desempenhando um papel importante na fisiopatologia da Disfunção Erétil (DE) resistente aos fármacos relaxantes musculares clássicos. Apesar da importância comprovada dos recetores da adenosina na fisiopatologia da DE no homem, pouca informação é conhecida no que diz respeito à expressão e localização dos recetores purinérgicos no Tecido Cavernoso de Ratazana (TCR).

Neste trabalho avaliou-se o fenótipo dos recetores purinérgicos responsáveis pela regulação do tónus do tecido erétil de ratazana por imunofluorescência indireta aplicada à microscopia confocal em co-culturas de células endoteliais e musculares lisas do TCR. Para além da caracterização imunofenotípica, desenvolveu-se uma técnica que permite diferenciar funcionalmente em tempo real (por microscopia confocal funcional) células musculares lisas e células endoteliais isoladas de TCR em co-cultura marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW. Esta técnica permite distinguir cada um dos subtipos celulares mediante o padrão e a magnitude das oscilações dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em resposta ao ATP (agonista P2) e à fenilefrina (PE, agonista  $\alpha$ -adrenérgico). Nas células musculares lisas, observou-se uma resposta mais acentuada ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico, PE, e uma resposta menos significativa ao ATP. O contrário foi observado relativamente às células endoteliais.

A incubação das células musculares lisas e endoteliais com ATP (300  $\mu$ M) causou um aumento dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$ . O efeito do ATP (300  $\mu$ M) parece envolver a ativação de recetores dos subtipos P2X1 e P2X3 sensíveis ao bloqueio com NF023 (3 $\mu$ M) e A317491 (100 nM), respetivamente. Já o aumento dos níveis  $[Ca^{2+}]_i$  produzido pelo ADP (300  $\mu$ M) parece envolver a ativação de recetores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> mediante o antagonismo produzido pelos antagonistas MRS 2179 (0,3 $\mu$ M), AR-C66096 (0,1  $\mu$ M) e MRS 2211 (10 $\mu$ M), respetivamente. Os dois tipos celulares expressam imunorreatividade contra recetores A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, P2X1, P2X3, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub>.

**Palavras-chave:** Disfunção erétil vasculogénica; tecido cavernoso; culturas celulares; células endoteliais; células musculares lisas; recetores da adenosina; recetores purinérgicos.

## **Abstract:**

Adenosine is a ubiquitous nucleoside involved in the regulation of the vascular tone, namely in the corpus cavernosum. This renders the nucleoside an important role in the pathophysiology of drug-resistant vasculogenic erectile dysfunction in men. Although it has been pharmacologically proven that adenosine receptors exist in the human corpus cavernosum, there is a lack of information regarding the differential expression and localization of these receptors in the corpus cavernosum of the rat, which has been taken as a model for investigating erectile dysfunction.

This study was designed to evaluate the phenotype of purinoceptors involved in the contractility of the rat corpus cavernosum by immunofluorescence confocal microscopy. Studies were performed in co-cultures of both endothelial and smooth muscle cells isolated from the rat corpus cavernosum. Besides the immunophenotypic characterization, we aimed at developing a methodology to allow the functional differentiation of endothelial and smooth muscle cells of the rat corpus cavernosum in culture using time-lapse confocal microscopy. To this end, cells were loaded with the cell-permeable fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Fluo-4NW; intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations were different in endothelial cells and smooth muscle fibers according to specific activators: ATP (a P2 agonist) and phenylephrine (PE, an  $\alpha$ -adrenergic agonist). It was found that smooth muscle cells exhibited a more pronounced response to the  $\alpha$ -adrenergic agonist PE, but barely reacted to the application of ATP. The opposite was observed regarding endothelial cells.

The incubation of endothelial and smooth muscle cells with ATP (300  $\mu\text{M}$ ) caused a significant rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . ATP effects may involve P2X1 e P2X3 receptors activation, because the responses were largely attenuated upon application of selective antagonists, namely NF 023 (3  $\mu\text{M}$ ) and A 317291 (100nM), respectively. Incubation of endothelial and smooth muscle cells with ADP (300  $\mu\text{M}$ ) also caused a rise of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , which was attenuated upon blocking P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors, respectively with MRS 2179 (0,3  $\mu\text{M}$ ), AR-C 66096 (0,1  $\mu\text{M}$ ) and MRS 2211 (10  $\mu\text{M}$ ). Co-cultured endothelial and smooth muscle cells exhibited immunoreactivity against A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, P2X1, P2X3, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, and P2Y<sub>13</sub>.

**Key- Words:** Vasculogenic erectile dysfunction; cavernous tissue; cell cultures; endothelial cells; smooth muscle cells; adenosine receptors; purinoceptors.

## **Índice Geral:**

|  |      |
|--|------|
| <b>Título</b> .....                                      | iii  |
| <b>Instituição</b> .....                                 | iii  |
| <b>Equipa de investigação</b> .....                      | iii  |
| <i>i.</i> <b>Aluno</b> .....                             | iii  |
| <i>ii.</i> <b>Orientadores</b> .....                     | iii  |
| <b>Agradecimentos</b> .....                              | vi   |
| <b>Resumo</b> .....                                      | vii  |
| <b>Palavras- Chave</b> .....                             | vii  |
| <b>Abstract</b> .....                                    | viii |
| <b>Key words</b> .....                                   | viii |
| <b>Abreviaturas/ Acrónimos</b> .....                     | xii  |
| <b>Introdução</b> .....                                  | 1    |
| <b>Objetivos</b> .....                                   | 4    |
| <i>i.</i> Objetivos gerais .....                         | 4    |
| <i>ii.</i> Objetivos específicos .....                   | 4    |
| <b>Capítulo I – Estado da Arte</b> .....                 | 5    |
| <b>1. Anatomia do sistema reprodutor masculino</b> ..... | 6    |
| 1.1. Anatomia do pénis.....                              | 6    |
| <b>2. Fisiologia da ereção peniana</b> .....             | 8    |
| <b>3. Disfunção erétil</b> .....                         | 9    |
| <b>4. Ereção</b> .....                                   | 10   |
| <b>5. Transmissão purinérgica</b> .....                  | 13   |
| 5.1. Adenosina .....                                     | 13   |
| 5.2. Recetores purinérgicos .....                        | 14   |
| 5.2.1. Recetores P1 .....                                | 14   |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2.2. Recetores P2 .....   | 15        |
| 5.3. Papel das purinas na disfunção erétil.....   | 15        |
| <b>6. Oscilações de cálcio intracelular .....</b>   | <b>18</b> |
| 6.1. Medição das oscilações de cálcio intracelular .....  | 18        |
| 6.2. Fluo-4 NW .....  | 19        |
| <b>7. Culturas celulares.....</b>   | <b>19</b> |
| 7.1. Tipos de culturas celulares.....   | 20        |
| 7.2. Método de obtenção de culturas primárias .....   | 20        |
| 7.3. Condições de cultura .....   | 20        |
| 7.4. Avaliação das culturas.....  | 21        |
| 7.5. Contaminações nas culturas celulares .....   | 21        |
| <b>Capítulo II – Material e Métodos .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>1. Amostras de tecido cavernoso e considerações éticas .....</b>   | <b>23</b> |
| 1.1. Isolamento do tecido cavernoso de ratazana .....   | 23        |
| 1.2. Processamento das amostras de tecido cavernoso .....   | 23        |
| <b>2. Culturas Celulares.....</b>   | <b>24</b> |
| 2.1. Cultura de células pela técnica do explante.....   | 24        |
| 2.2. Cultura de células pela técnica da dissociação enzimática.....   | 24        |
| 2.3. Manutenção das culturas celulares.....   | 25        |
| <b>3. Identificação e caracterização imunofenotípica das células de tecido cavernoso e da expressão dos recetores purinérgicos.....</b> | <b>25</b> |
| 3.1. Tripsinização das células .....  | 25        |
| 3.2. Imunocitoquímica .....   | 27        |
| 3.3. Determinação das oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ em células vivas por microscopia confocal funcional .....                             | 29        |
| <b>4. Análise estatística .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>Capítulo III - Resultados .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>1. Otimização da técnica de cultura de células de TCR.....</b>   | <b>32</b> |
| 1.1. Cultura de células de músculo liso e de células endoteliais de TCR .....   | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.1.1. Cultura de células pela técnica do explante .....   | 32        |
| 1.1.2. Cultura de células pela técnica da dissociação enzimática .....   | 32        |
| 1.2. Caracterização fenotípica das células de TCR por imunofluorescência indireta .....  | 33        |
| <b>2. Caracterização funcional das culturas celulares de TCR por microscopia confocal: Análise das oscilações do <math>Ca^{2+}</math> intracelular em resposta a agonistas específicos .....</b> | <b>34</b> |
| <b>3. Expressão de recetores <math>A_{2A}</math> e <math>A_{2B}</math> em co-culturas celulares de TCR .....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4. Papel dos recetores ionotrópicos <math>P2X1</math> e <math>P2X3</math> nas musculares lisas e células endoteliais de TCR .....</b>   | <b>37</b> |
| 4.1. Expressão de recetores ionotrópicos $P2X1$ e $P2X3$ em co-culturas celulares de TCR.....  | 37        |
| 4.2. Envolvimento do recetor $P2X1$ e $P3X3$ nas oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ causadas pelo ATP em co-culturas de células de TCR .....  | 38        |
| <b>5. Papel dos recetores metabotrópicos <math>P2Y_1</math>, <math>P2Y_{12}</math> e <math>P2Y_{13}</math> nas células musculares lisas e endoteliais de TCR .....</b>                           | <b>41</b> |
| 5.1. Expressão de recetores metabotrópicos $P2Y_1$ , $P2Y_{12}$ e $P2Y_{13}$ em co-culturas celulares de TCR .....   | 41        |
| 5.2. Envolvimento dos recetores $P2Y_1$ , $P2Y_{12}$ e $P2Y_{13}$ nas oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ causadas pelo ADP em co-culturas de células de TCR .....                                       | 42        |
| <b>Capítulo IV - Discussão.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>Conclusão .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>Referências Bibliográficas .....</b>  | <b>57</b> |

## Abreviaturas / Acrónimos

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>A 317491</b>                      | Sal sódico hidratado do ácido 5-[[[(3-fenoxifenil)metil][(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftalenil]amino]carbonil]-1,2,4-benzenotricarboxílico |
| <b>Ab</b>                            | Anticorpo   |
| <b>ACh</b>                           | Acetilcolina  |
| <b>ADO</b>                           | Adenosina   |
| <b>ADP</b>                           | Adenosina 5'- Difosfato   |
| <b>Ag</b>                            | Antigénio   |
| <b>AMP</b>                           | Adenosina 5'- Monofosfato   |
| <b>AMPC</b>                          | Adenosina Monofosfato cíclico   |
| <b>AR-C 66096</b>                    | Sal tetrasódico do trifosfato de 2-(propiltio)adenosin-5'-O-( $\beta,\gamma$ difluorometileno)  |
| <b>ATP</b>                           | Adenosina 5'- Trifosfato  |
| <b>BK</b>                            | Bradicinina   |
| <b>BSA</b>                           | Albumina Sérica Bovina  |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>               | Catão Cálcio  |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> | Concentração de Cálcio intracelular   |
| <b>CC</b>                            | Corpos Cavernosos   |
| <b>CCH</b>                           | Corpos Cavernosos Humano  |
| <b>CCR</b>                           | Corpos Cavernosos de Ratazana   |
| <b>CGS 21680C</b>                    | 2-[4-(2-p-carboxietil) fenilamino]-5'-N-etilcarboxamido adenosina   |
| <b>CO<sub>2</sub></b>                | Dióxido de Carbono  |
| <b>DAG</b>                           | Diacilglicerol  |
| <b>DCV</b>                           | Doença Cardiovascular   |
| <b>DE</b>                            | Disfunção Erétil  |
| <b>DNA</b>                           | Ácido Desoxirribonucleico   |
| <b>DM<sub>2</sub></b>                | Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2   |
| <b>DMSO</b>                          | Dimetil Sulfóxido   |
| <b>EHRF</b>                          | Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio  |
| <b>ESTSP/IPP</b>                     | Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto  |
| <b>eNOS</b>                          | NOS Endotelial  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>GC</b>               | Guanilato Ciclase   |
| <b>GMPc</b>             | Guanosina Monofosfato cíclico   |
| <b>GPCR</b>             | Recetores acoplados à proteína G  |
| <b>ICBAS/UP</b>         | Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto  |
| <b>IP<sub>3</sub></b>   | Trifosfato de Inositol  |
| <b>K<sup>+</sup></b>    | Catião Potássio   |
| <b>KCl</b>              | Cloreto de Potássio   |
| <b>MRS 2179</b>         | Sal tetrasódico de 3',5'-bisfosfato de 2'-deoxi-N <sup>6</sup> -metiladenosina  |
| <b>MRS 2211</b>         | Sal disódico de 2-[(2-cloro-5-nitrofenil)azo]-5-hidroxi-6-metil-3-[(fosfonooxi) metil]-4-piridinocarbaldeído            |
| <b>NF 023</b>           | Sal hexasódico hidratado do ácido 8,8'-[carbonilbis(imino-3,1-fenileno carbonilimino)]bis(1,3,5-naftaleno trisulfónico) |
| <b>NO</b>               | Monóxido de azoto   |
| <b>NOS</b>              | Síntase do monóxido de azoto  |
| <b>P2XR</b>             | Recetor P2X   |
| <b>P2YR</b>             | Recetor P2Y   |
| <b>PBS</b>              | Tampão Fosfato Salino   |
| <b>PDE<sub>5</sub></b>  | Fosfodiesterase tipo 5  |
| <b>PDE<sub>5i</sub></b> | Inibidores da Fosfodiesterase do tipo 5   |
| <b>PE</b>               | Fenilefrina   |
| <b>PECAM-1</b>          | Molécula de Adesão Plaquetária Endotelial   |
| <b>PFA</b>              | Paraformaldeído   |
| <b>PGF<sub>2α</sub></b> | Prostaglandina E2   |
| <b>PKA</b>              | Proteína Cinase A   |
| <b>PKC</b>              | Proteína Cinase C   |
| <b>SBF</b>              | Soro Bovino Fetal   |
| <b>SMA</b>              | Actina do Músculo Liso  |
| <b>TC</b>               | Tecido Cavernoso  |
| <b>TCR</b>              | Tecido Cavernoso de Ratazana  |
| <b>TCH</b>              | Tecido Cavernoso Humano   |
| <b>UDP</b>              | Difosfato de Uridina  |
| <b>UTP</b>              | Trifosfato de Uridina   |

## Índice de Tabelas:

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela I:</b> Anticorpos primários utilizados em marcação por imunofluorescência indireta.<br>..... | 28 |
| <b>Tabela II:</b> Anticorpos secundários utilizados em marcação por imunofluorescência indireta.....   | 28 |
| <b>Tabela III:</b> Lasers utilizados na observação por imunofluorescência indireta .....               | 28 |

## Índice de Figuras:

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura I:</b> Anatomia do sistema reprodutor masculino humano em corte transversal .....   | 6  |
| <b>Figura II:</b> Anatomia do pénis humano em corte transversal.....  | 7  |
| <b>Figura III:</b> Mecanismos da resposta erétil normal .....   | 11 |
| <b>Figura IV:</b> As principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina .....   | 14 |
| <b>Figura V:</b> Principais recetores das purinas e pirimidinas presentes nos vasos sanguíneos envolvidos no controlo do tónus vascular .....   | 17 |
| <b>Figura VI:</b> Câmara de Neubauer e esquema de contagem de células .....   | 26 |
| <b>Figura VII:</b> Microscópio Confocal Olympus FluoView FV1000.....  | 30 |
| <b>Figura VIII:</b> Marcação imunocitoquímica de células de TCR por imunofluorescência indireta.....  | 33 |
| <b>Figura IX:</b> Efeito do ATP (100 $\mu$ M) e da PE (10 $\mu$ M) na acumulação de $[Ca^{2+}]_i$ em células de TCR .....   | 35 |
| <b>Figura X:</b> Expressão de recetores $A_{2A}$ e $A_{2B}$ em co-culturas celulares de TCR .....   | 36 |
| <b>Figura XI:</b> Expressão de recetores inotrópicos P2X1 e P2X3 em co-culturas celulares de TCR.....   | 37 |
| <b>Figura XII:</b> Envolvimento dos recetores P2X1 e P3X3 nas oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ causadas pelo ATP em co-culturas de células de TCR .....  | 39 |
| <b>Figura XIII:</b> Expressão de recetores metabotrópicos P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub> e P2Y <sub>13</sub> em co-culturas celulares de TCR .....  | 41 |
| <b>Figura XIV:</b> Envolvimento dos recetores P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub> e P2Y <sub>13</sub> nas oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ causadas pelo ADP em co-culturas de células de TCR ..... | 43 |

## **Introdução**

A Disfunção Erétil (DE) é a incapacidade constante ou recorrente de obter ou manter uma ereção peniana por tempo suficiente que permita a atividade sexual (Tanagho & McGraw-Hill 2004; Lin et al., 2012). Esta condição resulta de um processo complexo e tipicamente multifatorial que requer uma abordagem integral (Martinez-Jabaloyas, 2012) podendo envolver fatores endócrinos, orgânicos, ou psicogénicos (Lippi et al., 2012). A causa mais frequente de DE no homem caracteriza-se por variações na regulação do fluxo sanguíneo no tecido peniano (Dean & Lue, 2005).

A ereção peniana é uma resposta fisiológica a um conjunto complexo de acontecimentos neuroendócrinos e vasculares, este processo tem início no sistema nervoso central que transmite sinais para os órgãos genitais, através de interação de neurotransmissores, e mensageiros químicos (Andersson, 2001). Este mecanismo promove o relaxamento das células do músculo liso dos corpos cavernosos (CC) e a vasodilatação das suas arteríolas. O aumento do fluxo sanguíneo arterial para os espaços trabeculares através das artérias cavernosas, juntamente com o aumento da resistência venosa, e a diminuição do efluxo de sangue dos CC, promovem o relaxamento dos espaços sinusoidais, permitindo uma acumulação de sangue no interior dos CC, e consequente rigidez do órgão (Andersson, 2001; Argiolas et al., 2005; Guagnini et al., 2010). Apesar dos mecanismos que regulam o influxo arterial e o efluxo venoso serem bem conhecidos, é necessário um maior destaque do músculo liso dos CC neste mecanismo.

O Tecido Cavernoso (TC) é composto por redes de espaços lacunares revestidos por endotélio vascular e separados por trabéculas contendo uma rede heterogénea de fibras musculares lisas, colagénio e elastina, cuja complexidade pode afetar a difusão e a acessibilidade dos mediadores endógenos e dos fármacos a testar (Andersson, 2001, Gratzke et al., 2010). Este obstáculo pode ser evitado recorrendo a culturas celulares. O isolamento de células através de culturas celulares permite estudar o efeito dos vários fatores intervenientes no crescimento e diferenciação das células (Hartung et al., 2002), tornando mais simples a identificação dos recetores e segundos mensageiros envolvidos nas respostas aos diversos agentes vasomotores.

A transmissão purinérgica tem um papel preponderante na iniciação e manutenção da ereção peniana (Tong et al., 1992). As purinas, o ATP e a adenosina, libertadas por elementos sanguíneos, células endoteliais e músculo liso vascular, são potentes reguladores da hemodinâmica vascular (Tong et al., 1992; Brunett, 1995; Andersson, 2001). O ATP

atua através de recetores P2X em células do músculo liso vascular para promover vasoconstrição. Alternativamente, os nucleótidos de adenina podem causar vasodilatação, diretamente, através da ativação de recetores P2Y localizados no endotélio e nas fibras musculares lisas, ou indiretamente, através da adenosina gerada pela via das ectonucleotidases (Mantelli et al., 1995; Faria et al., 2006).

Apesar das purinas terem sido implicadas na fisiologia da ereção no homem (Mantelli et al., 1995), a contribuição relativa do ATP e da adenosina está longe de ser conhecida. Assim sendo, pareceu-nos interessante caracterizar o(s) tipo(s) de recetores purinérgicos, P1 e P2, envolvidos na regulação do tónus muscular do TC utilizando agonistas e antagonistas seletivos. Os resultados obtidos nos estudos bioquímicos e funcionais carecem de validação morfológica por estudos de co-localização com recurso à microscopia confocal, no sentido de avaliar a expressão e a distribuição regional dos principais recetores purinérgicos, P1 e P2.

## **Objetivos:**

### ***i)* Objetivos gerais deste trabalho:**

O conhecimento das vias de relaxamento no TC é fundamental para se delinearem estratégias farmacológicas de compensação em situações de falência dos mecanismos endógenos do controlo do tónus do TC. O presente estudo teve como objetivo a realização de culturas de células endoteliais e de músculo liso vascular isoladas de TCR para avaliar a expressão diferencial dos recetores purinérgicos neste tecido.

Durante esta investigação caracterizaram-se os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação das purinas na regulação do tónus do TCR, por forma a determinar se a ratazana seria um bom modelo animal para o estudo da fisiopatologia da DE no homem. Para tal, foi ensaiada uma técnica de rotina que permitisse cultivar células do TC e que possibilitasse a avaliação do funcionamento celular num modelo experimental simplificado.

### ***ii)* Objetivos específicos deste trabalho:**

O primeiro objetivo deste trabalho foi o de otimizar uma técnica de rotina que permitisse isolar e cultivar células musculares lisas e células endoteliais obtidas de TCR. Esta metodologia permitiria avaliar a proliferação e caracterizar fenotipicamente as células musculares lisas e células endoteliais de TCR em cultura, através da expressão de marcadores específicos.

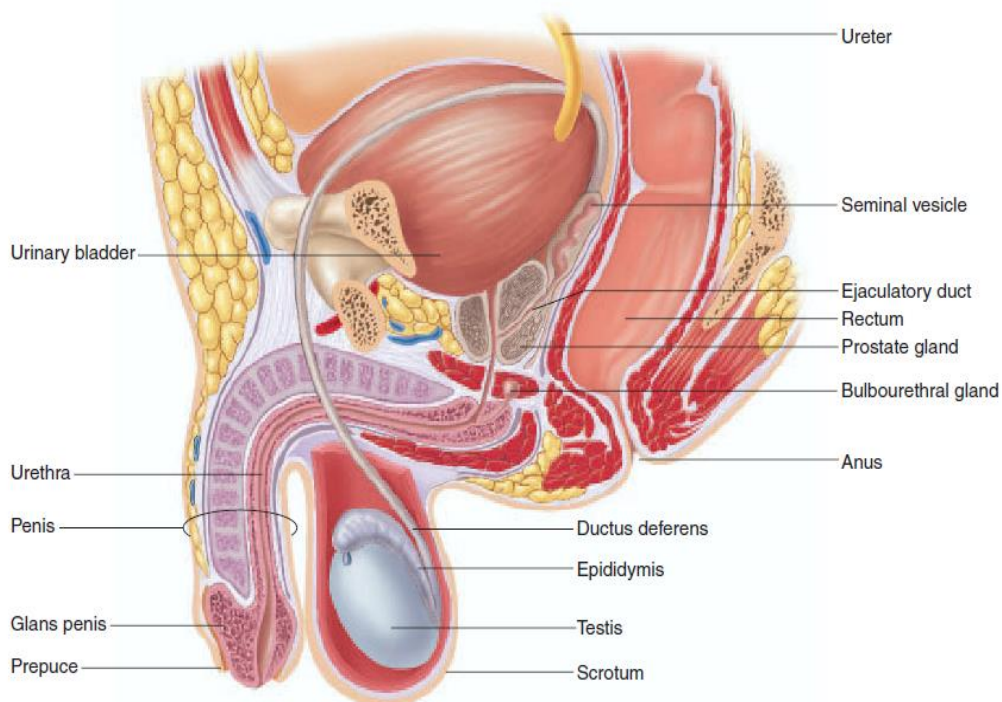
Através de técnicas de imunocitoquímica pretendemos avaliar a expressão de recetores P1 da adenosina, nomeadamente recetores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , bem como a presença de recetores P2 ( $P2X_1$ ,  $P2X_3$  e  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{12}$  e  $P2Y_{13}$ ) nas células do TCR em cultura. A presença destes recetores foi correlacionada com a presença de marcadores específicos de células musculares lisas ( $\alpha$ -actina) e de células endoteliais (PECAM-1).

Neste trabalho realizaram-se ensaios em que se avaliou a dinâmica do  $[Ca^{2+}]_i$  em células vivas marcadas com sonda fluorescente (Fluo4-NW) por microscopia confocal. O objetivo foi avaliar a possibilidade de distinguir funcionalmente e em tempo real, células endoteliais e musculares lisas vivas em cultura através de respostas específicas na sinalização do  $[Ca^{2+}]_i$  a agonistas e antagonistas seletivos.

## **Capítulo I – Estado da Arte**

## 1. Anatomia do Sistema Reprodutor Masculino

O aparelho reprodutor masculino (Figura I) é constituído pelas gónadas (testículos), um sistema de ductos (epidídimos, canais deferentes e uretra), glândulas sexuais (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbo-uretrais) e estruturas de suporte (escroto e pénis) (Seeley et al., 2004).



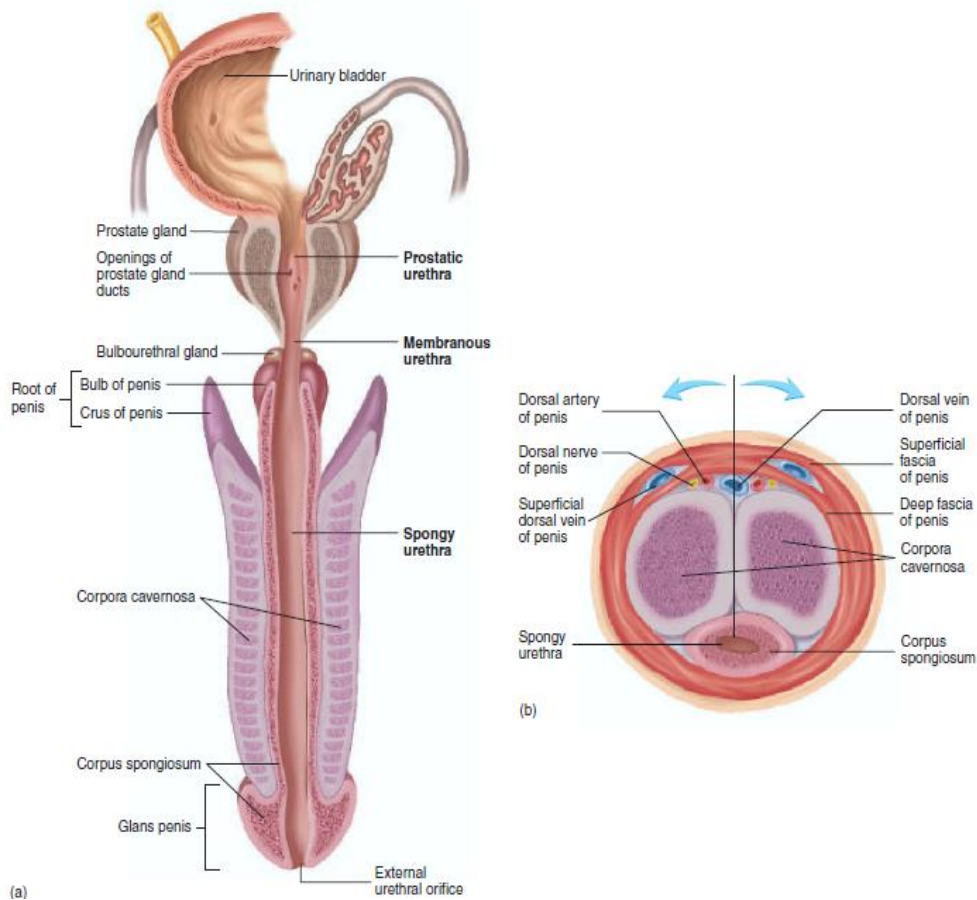
**Figura I:** Anatomia do sistema reprodutor masculino em corte transversal (Seeley et al., 2004)

### 1.1. Anatomia do pénis:

O pénis (Figura II) é um órgão cilíndrico cujo interior é atravessado pela uretra, sendo o interior constituído por três corpos cilíndricos totalmente separados. Duas destas estruturas são os corpos cavernosos, simétricos e paralelos, encontram-se na posição dorsal do corpo de pénis, constituídos por um tecido vascular, responsável pela resposta erétil. O terceiro corpo cilíndrico é o corpo esponjoso, situado numa posição ventral atravessado longitudinalmente pela uretra, cuja extremidade se dilata ocupando todo o interior da glândula (Seeley et al., 2004; Hsu et al., 2004).

Os CC possuem numerosos espaços vasculares (sinusóides), revestidos por endotélio e separados por trabéculas contendo uma rede heterogênea de fibras musculares lisas (Morelli et al., 2005). Longitudinalmente, os CC, são revestidos por fibras de músculo liso, responsáveis pela compressão do corpo esponjoso e veias penianas, durante o fenómeno de ereção, resultando num ingurgitamento e aumento da pressão da glânde e do corpo esponjoso. As artérias helicinas regulam a quantidade de fluxo sanguíneo dentro destes espaços vasculares revestidos por células endoteliais. As vénulas drenam estes espaços lacunares para os plexos venosos subtunicais, os quais trespassam a túnica albugínea e desembocam nas veias dorsal e cavernosa (Yiee & Baskin, 2010; Hsieh et al., 2012).

Exteriormente, a revestir os CC, encontra-se a túnica albugínea, uma camada de tecido fibroso, muito resistente, constituída por elastina e colagénio. Os CC estão separados entre si por um septo incompleto, ancorado na porção interna da túnica albugínea (Yiee & Baskin, 2010; Hsieh et al., 2012).



**Figura II:** Anatomia do pênis humano em corte transversal (Seeley et al., 2004)

As fibras musculares lisas trabeculares dos CC são longas e fusiformes, sendo constituídas por dois tipos de filamentos. As fibras são compostas por várias unidades lineares de actina (proteína globular) e por unidades de miosina, constituída por duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. As cadeias pesadas são formadas por uma cauda longa que polimeriza com outras moléculas de miosina, formando o eixo do filamento grosso, e por uma cabeça globular protuberante, formando as chamadas “pontes cruzadas”, direccionadas para os filamentos finos (Mas, 2010). Após fosforilação, os monómeros de miosina agregam-se e formam filamentos dotados de elevada atividade de ATPase, sendo capazes de interagir com a actina (Craig & Woodhead, 2006). Esta interação entre moléculas de miosina e actina gera uma força actina-miosina que promove o deslizamento dos filamentos finos de actina ao longo dos filamentos espessos de miosina, encurtando a fibra muscular, o que leva à contração do músculo liso. A intensidade da força actina-miosina e, conseqüentemente, a extensão da sobreposição dos filamentos dita o grau de contração ou relaxamento muscular (Saenz de Tejada et al., 2004; Watras, 2009).

O fenómeno da ereção ocorre quando os CC se preenchem com sangue proveniente das artérias cavernosas, cuja turgescência força a oclusão das veias subtunicais e, conseqüentemente a obstrução da saída de sangue do pénis, provocando, o aumento de tamanho e consistência do pénis (Seeley et al., 2004; Kasper et al., 2006; Dimitriadis et al., 2008).

## **2.Fisiologia da ereção peniana**

O tecido erétil peniano, especificamente o músculo liso do TC e os músculo liso das paredes das artérias e arteríolas, desempenham um papel-chave no processo erétil. No estado flácido, o músculo liso permanece contraído, permitindo apenas o afluxo sanguíneo necessário a fins nutricionais (Figura III). Isso pode ser mimetizado após a injeção de fenilefrina, um agonista adrenérgico, em modelos experimentais de tiras de corpos cavernosos (Lau & Adaikan, 2006).A estimulação sexual promove a liberação de neurotransmissores dos terminais nervosos levando, assim, ao relaxamento do músculo liso. No mecanismo da resposta erétil verifica-se a dilatação das artérias e arteríolas provocando um aumento do fluxo sanguíneo, acúmulo do sangue recebido pelos sinusóides e conseqüente expansão, compressão dos plexos venulares subtunicais entre a túnica albugínea e os sinusóides periféricos, reduzindo o fluxo venoso. Este mecanismo promove o alongamento da túnica abugínea o que provoca a oclusão das veias emissárias

localizadas entre as camadas interiores e exteriores longitudinais e diminuindo ainda mais o fluxo venoso para um mínimo. É o aumento da pressão intracavernosa, que promove o aumento do tamanho do pénis (Wagner & Mulhall, 2001; Dean & Lue, 2005; Guagnini et al., 2010). A ereção envolve, assim, o relaxamento sinusoidal, dilatação arterial e compressão venosa (Priviero et al., 2007; Gratzke et al., 2010).

### **3. Disfunção Erétil**

A disfunção sexual masculina caracteriza-se pela dificuldade de se atingir uma relação sexual satisfatória, o que pode envolver alterações de desejo, excitação, uma ereção inadequada, ou problemas com a emissão, ejaculação ou orgasmo. A DE é a incapacidade constante ou recorrente de obter ou manter uma ereção peniana que permita a atividade sexual (Tanagho et al., 2004, Lin et al., 2012).

Os problemas sexuais são comuns na maioria das populações e apesar de ainda bastante negligenciados, são uma questão de interesse crescente. É difícil obter uma estimativa precisa da sua prevalência a partir da literatura internacional devido às discrepâncias registadas nos diferentes ensaios (Naeinian et al., 2011). Estudos realizados em Portugal (*Episex-pt*, investigação desenvolvida pela *Sociedade Portuguesa de Andrologia* com o apoio da *Pfizer*) revelam que a DE afeta 13% da população masculina portuguesa, dos quais 5% expressa sintomas de DE grave. Neste estudo registou-se uma prevalência crescente associada à idade dos indivíduos. A partir dos 40 anos, 18% dos homens apresenta algum grau de disfunção erétil, aumentando para 23% a taxa de indivíduos afetados aos 50 anos e para 26% nos homens acima dos 60 anos (Dias, 2006). Analogamente ao que acontece em Portugal, a DE apresenta uma elevada incidência em todo mundo (Coelho et al., 2011). Um estudo americano, *Massachusetts Male Aging Study*, realizado em homens com idades compreendidas entre os 40 e os 70 anos revelou que 52% desses indivíduos apresentava algum grau de DE, dos quais, 10% manifestava sintomatologia de disfunção erétil grave (Feldman et al., 1994; Meena et al., 2009). Esta condição é responsável por um significativo e profundo comprometimento da qualidade de vida dos indivíduos, e revela-se uma condicionante de impacto crescente, principalmente em pacientes diabéticos, incidindo em cerca de 60% desta população (Romeo et al., 2000; Gil, 2010).

A DE resulta de um processo complexo e tipicamente multifatorial que requer uma abordagem integral (Martínez-Jabaloyas et al., 2013) podendo envolver fatores endócrinos,

orgânicos, ou psicogénicos (Lippi et al., 2012). Entre as causas orgânicas de destacam-se as neurológicas, vasculares, hormonais, arteriais, cavernosas, cirúrgicas, ou induzida por fármacos (Ventegodt, 1998; Naeinian, 2011). O diagnóstico da causa nem sempre é fácil, porém é crucial para proceder ao tratamento mais adequado para cada caso clínico. Registos indicam que a forma mais incidente é a que partilha uma componente orgânica e uma componente psicogénica (Naeinian, 2011). Apesar da DE vasculogénica ser uma consequência natural do processo de envelhecimento, as causas etiológicas mais comuns são as doenças coronárias, aterosclerose, diabetes, obesidade, hipertensão arterial e síndrome metabólica. (Schiel et al., 1999; Shabsigh et al., 2010). O aumento crónico da glicemia, que caracteriza a diabetes, é responsável pelo aparecimento de lesões vasculares e neurológicas devido à diminuída formação de substâncias indutoras de relaxamento dos CC e das artérias, e também pela formação aumentada dos produtos finais de glicosilação e radicais livres (Angulo et al., 2010). Vários estudos prévios concluíram que a DE em diabéticos está associada a um estado hipercontrátil do músculo liso do pénis, conduzindo a uma diminuição da função endotelial, e a alterações no metabolismo do colagénio e da elastina, que juntos manifestam sintomas de disfunção veno-oclusivo (Chitale, 2009; Meena et al., 2009).

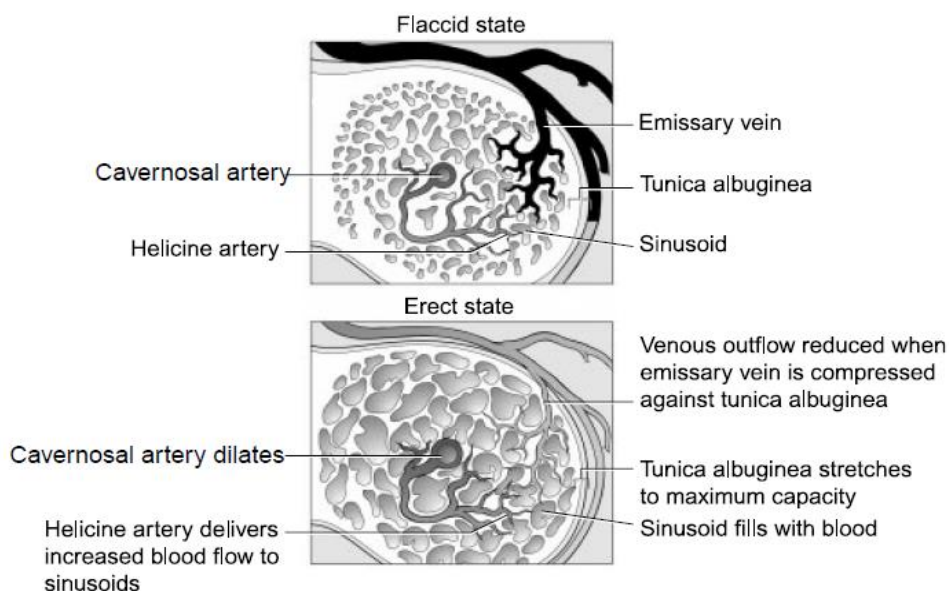
A perda da integridade funcional do endotélio vascular modifica a capacidade de resposta a alterações homeostáticas locais e a fatores parácrinos e autócrinos, denominando-se por disfunção endotelial (Giugliano et al., 2010). A disfunção endotelial é um estado patológico da vasculatura que envolve a perda de capacidade de resposta do endotélio para os mediadores vasodilatadores ou um aumento na sensibilidade a vasoconstritores, desempenhando um papel preponderante num número significativo de casos DE vasculogénica. A disfunção endotelial consiste na atenuação do efeito relaxante (mediado, entre outros, pelo NO) que o endotélio exerce sobre as células musculares lisas existentes nas trabéculas dos CC penianos. Esta atenuação pode dever-se à expressão/regulação anormal de eNOS (Síntese Endotelial do NO), a deficiências de cofatores desta enzima ou a um aumento do stresse oxidativo com consequente degradação de NO (Musicki & Burnett, 2006).

#### **4. Ereção Peniana**

A ereção peniana (Figura III) é desencadeada por um mecanismo de ativação diferencial de recetores colinérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos (Martinez-Salamanca

et al., 2010). Este processo tem início no sistema nervoso central que transmite sinais para os órgãos genitais, através de interação de neurotransmissores, e mensageiros químicos. Este mecanismo neurovascular promove a libertação de fatores a partir das células endoteliais estimulando o relaxamento das células do músculo liso dos CC produzindo-se consequente vasodilatação. O aumento do fluxo sanguíneo arterial para os espaços trabeculares, o aumento da resistência venosa e o relaxamento dos espaços sinusoidais, estimulam uma acumulação de sangue e consequente rigidez do órgão (Andersson, 2001; Argiolas et al., 2005; Guagnini et al., 2012).

É possível classificar os nervos penianos mediante os neurotransmissores que libertam: adrenérgico (noradrenalina), colinérgicos (acetilcolina) e não-adrenérgicos/não-colinérgicos (neuropéptidos e ATP, entre outros) (Andersson, 2001). A libertação de acetilcolina a partir dos terminais nervosos colinérgicos favorece a secreção de NO a partir do endotélio vascular, promovendo a redução de  $Ca^{2+}$  nas células musculares lisas e, consequentemente, relaxamento muscular (Brunett, 1995). Durante a ereção, a redução dos níveis de cálcio intracelular induzem a dissociação enzimática do complexo cálcio calmodulina. A miosina é desfosforilada pela fosfatase de cadeia leve da miosina e separa-se do filamento de actina, estimulando o relaxamento do músculo liso vascular.



**Figura III:** Mecanismos da resposta erétil normal (Wagner & Mulhall, 2001).

O NO é visto como o transmissor com maior destaque neste processo que desencadeia a ereção. O NO vai promover o relaxamento das fibras musculares lisas por ativação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), desencadeando uma cascata de

reações de fosforilação dependentes de  $[Ca^{2+}]_i$  (Angulo et al., 2010; Francis et al., 2010; Zhang et al., 2011; Qiu et al., 2012). Níveis elevados de GMPc promovem a redução de concentração de cálcio em células musculares lisas, aprisionando este catião no retículo sarcoplasmático, induzindo assim, o relaxamento muscular (Burnett, 1995; Sáenz de Tejada, 2002). A homeostasia de  $Ca^{2+}$  citosólico pode promover a contratilidade do músculo liso, através de três mecanismos distintos: influxo de  $Ca^{2+}$  através de canais regulados por voltagem; ativação de vias de sinalização que culminam na libertação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático; e ativação de recetores membranares que facilitam a entrada de  $Ca^{2+}$  através de canais associados a recetores (Sáenz de Tejada, 2002). O relaxamento muscular ocorre quando os níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$  ou se encontram diminuídos, ou quando ocorre uma diminuição da sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $Ca^{2+}$ . Por outro lado, a contração depende do rápido aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  livre, que deve ser mantida acima do limiar basal para manutenção da resposta contrátil (Andersson et al., 1990; Sáenz de Tejada, 2002; Mas, 2010).

Como a contração e o relaxamento do músculo liso são regulados pelo cálcio citosólico livre, a flacidez do pênis é mantida pela acumulação de cálcio intracelular. A noradrenalina, endotelina,  $PGF_{2\alpha}$  (Prostaglandina E2), vão estimular os recetores das células musculares lisas para aumentar os níveis de trisfosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG), resultando na libertação de  $Ca^{2+}$  intracelular do retículo sarcoplasmático, e na abertura de canais de cálcio na membrana das células musculares lisas, promovendo o influxo de cálcio. Em concentrações elevadas, o cálcio liga-se a calmodulina alterando a sua conformação. Posteriormente liga-se a cinases de cadeia livre de miosina, ativando-as. Estas vão catalisar a fosforilação da miosina, desencadeando a interação entre os filamentos de actina e miosina. Esta fosforilação vai ativar a miosina-ATPase, que vai hidrolisar ATP necessário à contração muscular (Christ et al., 1995).

Um dos indutores do sinal de hiperpolarização das células, do tecido muscular liso vascular dependente do endotélio, parece ser a bradicinina (BK). A BK pertence ao grupo das kininas, e, apresenta uma potente atividade vasodilatadora. Os recetores de BK e da angiotensina têm sido caracterizados tanto na vasculatura sistémica, como em tecidos eréteis. Os efeitos biológicos de BK são mediados por recetores na membrana celular, acoplados à proteína Gs, sendo o tipo B2 os que parecem apresentar maior afinidade. Este efeito vasodilatador ocorre na presença de inibidores da ciclooxigenase (indometacina) e

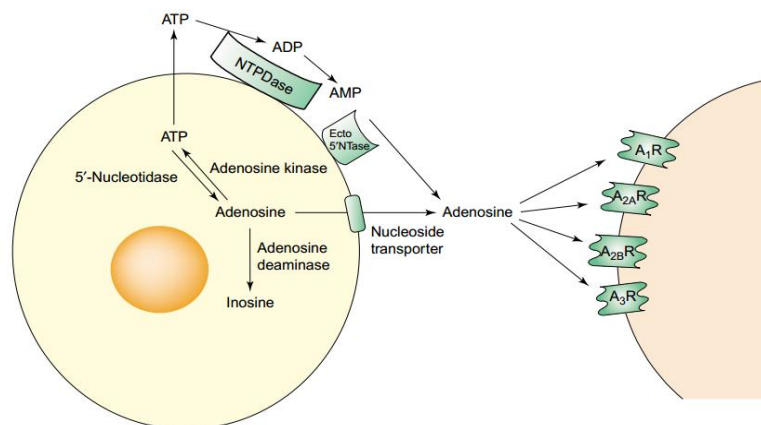
pode ser mediado pela libertação de um fator relaxante dependente do endotélio (NO / fator hiperpolarizante), (Becker et al., 2001; Maas et al., 2002).

## **5. Transmissão Purinérgica**

A transmissão Purinérgica tem um papel preponderante na iniciação e manutenção da ereção peniana (Tong et al., 1992). Os nucleótidos e nucleósidos de adenina, ATP e adenosina, libertadas por elementos sanguíneos, células endoteliais e músculo liso vascular, exercem uma potente ação no sistema vascular, tecidos musculares lisos e células endoteliais vasculares (Tong et al., 1992; Brunett, 1995; Andersson, 2001).

### **5.1. Adenosina**

A adenosina é um nucleosídeo de purina endógeno e está envolvido em vias purinérgicas, como a biossíntese de nucleótidos, o metabolismo de aminoácidos e vários processos fisiológicos que requerem dispêndio energético (Fox & Kelley, 1978; Stone, 1985; Shryock & Belardinelli, 1997; Cunha, 2001). Verifica-se a sua presença em todos os tipos de células apresentando um papel modulador em diversos processos fisiológicos. Está descrita a implicação na regulação das funções cardiovasculares como vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea. A sua concentração extracelular aumenta rapidamente após estímulos de stresse (hipoxia, isquemia e estimulação adrenérgica) (Sparks & Bardenheuer, 1986; Fan et al., 2003). Este nucleosídeo pode formar-se intra e extracelularmente por metabolização da adenina. Intracelularmente, a adenosina, forma-se pela desfosforilação de AMP (adenosina 5'-monofosfato) catalisada pela s-adenosil-homocisteína-hidrolase. Já no interior das células, a adenosina é catabolizada por duas enzimas, ADK (cinase da adenosina) e ADA (desaminase da adenosina). A ADK fosforila a adenosina em AMP, estando envolvida na regulação dos níveis intracelulares de adenosina e na manutenção de nucleotídeos intracelulares. A ADA catalisa a inativação de adenosina em inosina de forma irreversível. A adenosina extracelular forma-se através da metabolização dos nucleótidos de adenina por ectonucleotidases como NTPDase1 ou CD39, que catalisa a hidrólise de ATP e ADP (adenosina 5'-difosfato) em AMP. A ecto-5'-nucleotidase (CD37) catalisa a desfosforilação de AMP em adenosina. A adenosina extracelular é transportada para o interior das células através de transportadores de nucleosídeos (ENT), (Colgan et al., 2006), (Figura IV).



**Figura IV:** As principais vias envolvidas no metabolismo da adenosina (Haskó & Cronstein, 2004).

## 5.2. Recetores Purinérgicos

Os recetores purinérgicos revelam uma potente atividade vascular. Estes podem ser classificados em dois grupos, recetores P1, que respondem preferencialmente à adenosina e recetores P2, responsáveis pela resposta aos nucleótidos de adenina, ATP, ADP, e da uridina, UTP, UDP (Raqeeb et al., 2011).

### 5.2.1. Recetores P1

Os Recetores P1 são recetores metabotrópicos cujo agonista endógeno é a adenosina. Atualmente estão subclassificados em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, cada um codificado por um gene e possuindo funções diferentes, apesar de apresentarem algumas características comuns. Todos pertencem à superfamília dos recetores acoplados à proteína G (Burnstock, 2007a). Os recetores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub>, são recetores acoplados a proteínas Gi/Go, inibem a adenilato-ciclase, conduzindo a uma diminuição nos níveis de AMPc; enquanto os recetores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> são acoplados a proteínas Gs, estimulam a adenilato-ciclase promovendo um aumento dos níveis de AMPc no interior da célula (Moro et al., 2006). Os quatro subtipos podem ligar-se positivamente à fosfolipase C através de diferentes subunidades da proteína G (Moro et al., 2006).

### 5.2.2. Recetores P2

Os recetores P2 subdividem-se em dois grupos, recetores ionotrópicos P2X e recetores metabotrópicos P2Y acoplados a proteínas G. Atualmente, encontram-se classificados sete subtipos da família de recetores P2X<sub>(1-7)</sub> e oito subtipos da família de recetores P2Y<sub>(1,2,4,6,11,12,13,14)</sub> (Burnstock, 2006).

Os recetores P2X são proteínas da membrana que formam canais iónicos. Estes apresentam uma afinidade de ligação elevada para ATP e seus produtos de degradação metabólica. A ativação dos recetores P2X pelo ATP induz uma alteração conformacional no canal transmembranar que permite o influxo de cations  $\text{Ca}^{2+}$  de origem extracelular, conduzindo a uma despolarização celular. Esta despolarização por sua vez pode ativar os canais de cálcio dependentes da voltagem e assim, facilitar o influxo  $\text{Ca}^{2+}$ . Segundo vários autores os recetores do subtipo P2X estão presentes nas células musculares lisas dos CC e a sua atividade induz contração (Tong et al., 1992).

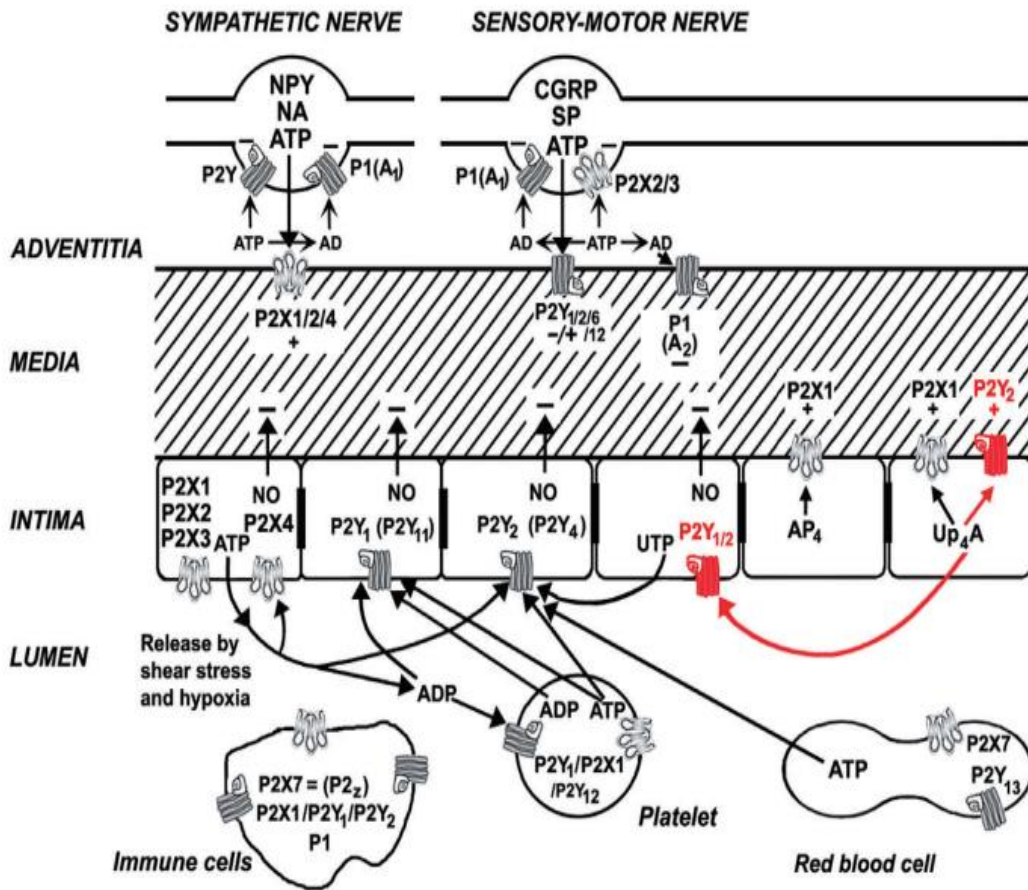
Os recetores P2Y são recetores acoplados a proteínas G, sendo que o grupo dos recetores P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> interage com proteínas G<sub>q</sub> e G<sub>11</sub>, responsáveis pela ativação da fosfolipase C, resultando na produção de IP<sub>3</sub> e diacilglicerol (DAG). O grupo dos recetores P2Y<sub>12,13,14</sub> interagem com as proteínas G<sub>i</sub> e G<sub>0</sub>, responsáveis pela inativação da adenilato ciclase. Os recetores P2Y<sub>11</sub> interagem tanto com proteínas G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, como com G<sub>s</sub>. Farmacologicamente estes recetores podem ser divididos em recetores que se ligam diferencialmente a ATP, ADP, ou aos nucleótidos uracilo UTP e UDP. Recetores P2Y<sub>1,6,12,13</sub> são ativados sobretudo por nucleótidos difosfato, ao passo que outros são ativados principalmente por nucleótidos trifosfato (P2Y<sub>2,4</sub>), (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007b). Os recetores P2Y, estão localizados nas células endoteliais vasculares e quando ligados a ATP, induzem a produção de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  do reticulo sarcoplasmático através da ativação de IP<sub>3</sub>. Este aumento na concentração intracelular de cálcio leva à ativação nas células endoteliais da síntese do NO, promovendo o relaxamento das células musculares lisas e induzindo uma vasodilatação dependente do endotélio (Lohman et al., 2012).

### **5.3. Papel das purinas na disfunção erétil**

A injeção intracavernosa de adenosina foi um dos primeiros métodos utilizados para o diagnóstico diferencial da DE de origem vasculogénica (Kilic et al., 1994). Estudos realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS-UP demonstraram que a adenosina desempenha um papel fundamental na regulação do tónus do CCH, através da ativação de recetores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, localizados no músculo e nas células endoteliais, respetivamente (Faria et al., 2006). A estimulação dos recetores A<sub>2A</sub> pela adenosina promove vasodilatação, atenuando a lesão endotelial induzida pela marginação de neutrófilos e promove a libertação endotelial de NO e prostanóides. Este mecanismo

favorece o relaxamento do músculo liso trabecular e consequente ereção peniana. Comparando a magnitude das respostas relaxantes promovidas pela adenosina em TCH de indivíduos portadores de DE, com lesões a nível endotelial, e de indivíduos controlo, foi possível concluir que a disfunção endotelial apresentada pelos doentes de DE se correlaciona com a perda da atividade dos recetores  $A_{2B}$ . No entanto, verificou-se que o efeito relaxante mediado pelos recetores  $A_{2A}$ , localizados no músculo liso vascular permanecia inalterado. Estudos realizados em TCR sugerem que o relaxamento da musculatura lisa estimulada pela adenosina se poderá dever à ativação preferencial de recetores do subtipo  $A_{2A}$  sensíveis ao CGS21680C (agonista destes recetores) (Valente, 2008). Este efeito relaxante aparenta ser preferencialmente dependente da síntese endógena de prostanóides (Faria et al., 2006). Outros estudos não publicados sugerem ainda que a ausência da atividade mediada por recetores  $A_{2B}$  pode ser explicada pelo aparente défice da componente endotelial que medeia o relaxamento do TCR (Valente, 2008).

Relativamente aos recetores P2, é sabido que, nos leitos vasculares, o ATP é libertado por elementos sanguíneos, endotélio e músculo liso, atuando por via de recetores P2X localizados nas células musculares lisas da vasculatura induzindo vasoconstrição (Figura V). Por outro lado, também se sabe que os nucleótidos de adenina podem estimular a vasodilatação, diretamente, através da ativação de recetores P2Y, localizados no endotélio e fibras musculares lisas, ou indiretamente, pela adenosina gerada pela via das ectonucleotidases. Através de estudos funcionais e de cinética enzimática recentes (Mantelli et al., 1995; Faria et al., 2006), presume-se que em doentes que apresentam DE vasculogénica, a atividade dos recetores purinérgicos P2 esteja diminuída devido a acumulação extracelular de ATP (dessensibilização) motivada por uma aparente redução da expressão e/ou atividade da enzima NTPDase 1/CD39. Em consequência deste facto, é provável que a formação de adenosina derivada do catabolismo extracelular do ATP esteja igualmente comprometida e, com isso, o seu papel como agente relaxante endógeno em TC (Faria et al, 2008). Na sequência de trabalhos realizados neste laboratório, observou-se, também, diferenças entre a atividade relaxante do ATP em TCH e TCR (Amorim, 2009). A metabolização extracelular de ATP ocorre mais rapidamente no homem comparativamente ao modelo animal estudado, verificando-se, para o mesmo período de tempo, a formação de uma menor quantidade de adenosina em ratazana. Os baixos níveis de adenosina gerada a partir de ATP podem justificar uma perda parcial da atividade relaxante do nucleótido em TCR comparativamente ao humano (Amorim, 2009).



**Figura V:** Principais recetores de purinas e pirimidinas presentes nos vasos sanguíneos envolvidos no controlo do tónus vascular (Burnstock, 2010).

Apesar de se reconhecer um importante papel da adenosina no mecanismo da ereção, a descoberta do sildenafil (Viagra®) e dos seus efeitos na fisiologia peniana desviaram as atenções para o estudo das propriedades vasodilatadoras do NO e para a sua relação com o processo da ereção. A utilização de inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE<sub>5i</sub>, e.g. sildenafil) é, atualmente, o tratamento de primeira linha da DE (Angulo et al., 2010; Francis et al., 2010). Há evidências que demonstram que o aumento de GMPc pela utilização de PDE<sub>5i</sub> é ateroprotetora na vasculatura e pode melhorar o estado fisiológico do endotélio (Kemp-Harper et al., 2009; Francis et al., 2010). Embora esta via de tratamento apresente uma elevada taxa de sucesso, o mesmo não se verifica em homens diabéticos que apresentam DE (Shukla et al., 2009). A eficácia de PDE<sub>5i</sub> baseia-se na integridade do endotélio e dos nervos dos CC, que produzem níveis de NO. No entanto, no caso de indivíduos com a integridade do endotélio severamente comprometida, como o caso de doentes diabéticos, verifica-se uma redução dos níveis de NO essenciais para desencadear a via NO/GMPc responsável pela diminuição da resposta à terapêutica com PDE<sub>5i</sub> e um consequente relaxamento dependente do endotélio deficiente.

## 6. Oscilações de cálcio intracelular

### 6.1. Medição das oscilações de cálcio intracelular

A comunicação intercelular é essencial para a coordenação dos processos fisiológicos entre células de uma variedade de órgãos e tecidos, incluindo a vasculatura. A propagação das ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para células vizinhas é uma característica comum, mediando a sinalização célula-célula em tecidos (Arcuino *et al.*, 2002; Berridge *et al.*, 2003). O cálcio regula uma vasta gama de funções celulares vitais, incluindo atividades enzimáticas, processos metabólicos, progressão do ciclo celular e respostas eletroquímicas. As concentrações externas de cálcio são geralmente de quatro ordens de grandeza superiores aos níveis internos (Barrow *et al.*, 2006). A sinalização é ativada por aumentos temporários na concentração de cálcio intracelular através da abertura dos canais de cálcio na membrana plasmática ou no retículo endoplasmático. O cálcio encontra-se armazenado no retículo endoplasmático, e atua como um segundo mensageiro difusível quando é libertado do retículo endoplasmático para o citosol, pelo inositol-3-fosfato ( $\text{IP}_3$ ), um metabolito de clivagem do  $\text{PIP}_2$  por membros da família de enzimas PI-fosfolipase C. A fosfolipase C pode ser ativada direta e indiretamente, por uma grande variedade de recetores da superfície celular, incluindo os fatores de crescimento, citocinas, recetores acoplados à proteína G, e integrinas (Barrow *et al.*, 2006).

Em certas condições experimentais, podem ser observadas ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através da aplicação de um estímulo mecânico em célula única. Através da libertação das moléculas sinalizadoras intracelulares de  $\text{IP}_3$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , inicia-se a propagação da onda de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir da célula estimulada mecanicamente para as células vizinhas. As principais vias moleculares que controlam a propagação de ondas  $\text{Ca}^{2+}$  são canais, através da transferência direta de  $\text{IP}_3$ , e por hemicanais, através da libertação de ATP. Foi demonstrado que a extensão máxima de propagação da onda de cálcio requer a ativação dos recetores purinérgicos pela libertação de ATP. Curiosamente, o nível de atividade do hemicanal está diretamente correlacionada com o grau de libertação de ATP (Stout *et al.*, 2004). Além disso, os aumentos no cálcio citosólico livre constituem um dos mecanismos mais comuns através dos quais hormonas e transmissores regulam as funções celulares.

## 6.2. Fluo-4 NW

Dada a importância do cálcio para muitas funções celulares, a medição das oscilações de cálcio intracelular é uma ferramenta muito importante para avaliar a sinalização celular. O Fluo-4 NW é uma sonda fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Este indicador, apresenta um comprimento de onda de excitação visível (compatíveis com laser ião-Argon), possui uma elevada sensibilidade, e apresenta grande aumento de fluorescência após ligações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Desta forma tornou-se o indicador de eleição na caracterização farmacológica e funcional dos recetores acoplados à proteína G (Mehlin et al., 2003).

O Fluo-4 NW tem a vantagem de permanecer não fluorescente e estável durante várias horas, em tampão de pH 7-7,5, e a conversão para a forma sensível a  $\text{Ca}^{2+}$  não representa uma fonte significativa de fluorescência de fundo. Além disso, a remoção do meio de cultura antes da aplicação do corante, elimina as interferências na fluorescência basal. Outra potencial fonte de fluorescência diz respeito à extrusão do indicador para fora da célula pelos transportadores de aniões orgânicos. No entanto, isto pode ser ultrapassado recorrendo ao uso de probenecide, comumente utilizada para inibir este tipo de transporte e reduzir o sinal da linha de base (Mehlin et al., 2003). Tendo ainda a vantagem de se poder utilizar tanto em células aderentes como em células não aderentes.

## 7. Culturas celulares

O isolamento e cultura de células animais e vegetais, tem tido um papel preponderante no estudo da função celular. A obtenção de células em cultura envolve um conjunto de procedimentos que permitem cultivar e preservar as células isoladas fora de um organismo de origem, mantendo o tecido isolado em ambiente apropriado com recurso a um meio de cultura capaz de fornecer nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das células, e dessa forma, simular as condições *in vivo* (Freshney, 2006). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens ao permitir o controlo das condições ambientais, a análise independente de diferentes parâmetros, um número elevado de ensaios num reduzido intervalo de tempo, diminuição do número de animais nos ensaios experimentais, tornando-se assim, uma alternativa menos dispendiosa (Hartung et al., 2002).

Culturas sob condições controladas permitem, desta forma, uma manipulação e obtenção de imagens de células a um nível de resolução que não seria possível, no animal integral, ou mesmo em fragmentos de tecidos não dissociados.

### **7.1. Tipos de culturas celulares**

Culturas primárias e subculturas iniciais, são células isoladas a partir de animais ou vegetais. Estas são culturas celulares heterogéneas, podendo encontrar-se mais do que um tipo de células em estádios de diferenciação distintos. Culturas primárias requerem meios de culturas complexos, sendo um processo trabalhoso até se conseguir padronizar. No entanto, neste tipo de cultura verifica-se uma menor probabilidade de alterações do fenótipo, bem como alterações do envelhecimento celular, sendo estas células mais representativas do tecido de origem (Freshney, 2006).

Linhas celulares são obtidas a partir de culturas primárias, constituídas por um único tipo de célula, apresentando um crescimento rápido e contínuo. Estas células propagam-se em série por um número limitado de divisões celulares, ou podem ser imortalizadas através de alterações genéticas, podendo assim não refletir as características originais das células (Freshney, 2006).

### **7.2. Método de obtenção de culturas primárias**

Técnica do explante, após remoção cirúrgica do tecido, pequenos fragmentos a cultivar são colocados numa caixa de cultura em meio apropriado. As células começam a destacar-se dos fragmentos, aderindo ao substrato, migrando até atingirem confluência.

Dissociação enzimática difere da técnica anterior pelo recurso a enzimas digestivas proteolíticas que facilitam a fragmentação do tecido, podendo em alguns casos levar a uma mais rápida obtenção de células isoladas. No entanto, a adição de proteases na digestão do tecido, pode provocar efeitos de toxicidade nas células, removendo proteínas da superfície celular, comprometendo a sua viabilidade.

Quando atingida a confluência celular, recorre-se a enzimas (e.g. tripsina) que promovem uma dissociação suave das células entre si e do substrato, obtendo-se uma suspensão celular. As células são colocadas posteriormente em subcultura permitindo, desta, forma a sua continuidade em novas caixas de cultura (Ryan, 2008).

### **7.3. Condições de Cultura**

Um meio de cultura apropriado é essencial para a manutenção das culturas celulares. O meio de cultura é constituído essencialmente por sais inorgânicos, aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos gordos, proteínas e vitaminas e, a sua

complexidade depende do tipo de célula que se pretende obter, representando uma constituição semelhante ao meio ambiente que a célula se desenvolve *in vivo* (Hartung et al., 2002). O soro animal é, por vezes, um suplemento para compensar nutricionalmente alguns meios de cultura. A temperatura, humidade, pH também devem ser semelhantes ao encontrado no tecido de origem. Para tal mantem-se as culturas em incubadoras, a uma temperatura de 37°C, e humidade entre 90 a 98% e CO<sub>2</sub> entre 2 a 10% (Freshney, 2006).

Para que as células formem uma monocamada é essencial aderirem à superfície da placa de cultura, quando tal não acontece é necessário recorrer a fatores de adesão, como colagénio, gelatina ou poli-D-lisina. Quando em contacto com uma superfície de adesão porosa, as células polarizam de forma similar ao *in vivo*, verificando-se uma melhoria da funcionalidade das células e uma maior proliferação celular (Freshney, 2006).

#### **7.4. Avaliação das Culturas**

O principal indicativo do comprometimento de uma cultura reflete-se por alterações a nível da morfologia celular, adesão e taxa de divisão (Ryan, 2008). Para estimar a taxa de crescimento recorre-se a um contador de partículas eletrónico ou à câmara de Neubauer, em que com o auxílio de um corante vital, faz-se uma avaliação da viabilidade celular, por incorporação do corante pelas células mortas. Este parâmetro revela-se proveitoso, na avaliação dos requisitos nutricionais da cultura de células, permitindo comparar diferentes tipos de meios de cultura (Freshney, 2006; Ryan, 2008).

#### **7.5. Contaminações nas culturas celulares**

A contaminação das culturas celulares pode ocorrer por fatores químicos ou de origem biológica. Enquanto os contaminantes biológicos, como bactérias e fungos, podem provocar danos irreversíveis nas células, sendo mais fáceis de detetar por microscopia ótica, as contaminações por *Mycoplasma* ou vírus ou as contaminações químicas, como toxinas, ou vestígios de detergentes, são mais difíceis de detetar, pois não são perceptíveis por microscopia ótica. Para se obterem culturas sem contaminações, são necessários alguns requisitos específicos como, material e reagentes em condições de assepsia e devidamente monitorizados. Uma vez detetada a contaminação bacteriana ou de origem fúngica, a cultura, assim como todos os reagentes utilizados, devem ser descontaminados com hipoclorito de sódio e, posteriormente, descartados para resíduos biológicos apropriados (Freshney, 2006; Ryan, 2008).

## **Capítulo II – Material e Métodos**

Ao longo dos trabalhos realizados, tem-se realçado a importância do músculo liso e a integridade do endotélio para o relaxamento e consequente ereção peniana. No estudo farmacológico da DE de origem vasculogénica, têm sido utilizadas amostras de TC recolhidas a partir de CC de animais e humanos. Culturas de células primárias derivadas do TC têm sido pouco utilizadas como modelos *in vitro* para definir os mecanismos celulares envolvidos na função erétil (Chung et al., 2012).

## **1. Amostras de tecido cavernoso e considerações éticas**

### **1.1. Isolamento de tecido cavernoso de ratazana**

TCR foi isolado a partir de *Ratus norvegicus* machos da estirpe *Wistar* (Charles River – CRIFFA, Barcelona, Espanha; Biotério do ICBAS, Porto, Portugal) com peso entre os 200g e os 350g. Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina seguida de exsanguinação, tendo estes sido manipulados de acordo com as orientações relativas ao bem-estar animal definidas pela Comunidade Europeia (86/609/CEE), respeitando a política dos 3R's (*Replace, Refine and Reduce*). Após o isolamento do pénis, os órgãos foram colocados numa caixa de Petri contendo solução de Tyrode (composição, em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; glucose 11,2), oxigenada com uma mistura de O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), à temperatura ambiente. A utilização dos tecidos foi efetuada no período até 2 horas após a colheita.

### **1.2. Processamento de amostras de tecido cavernoso**

O tecido cavernoso de ratazana foi separado das estruturas envolventes, tecido conjuntivo e túnica albugínea, por microdissecção cirúrgica com o auxílio de uma lupa binocular (Olympus SZ60, Japan). Posteriormente, os fragmentos foram colocados em meio de descontaminação, AB10x, contendo um elevado teor de substâncias antimicrobianas [25 µg/mL de anfotericina B (Sigma); 1000 IU/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma)]. Seguidamente, o tecido isolado foi sujeito a três ciclos de descontaminação, com a duração de 30 minutos cada.

## **2. Culturas celulares**

### **2.1. Cultura de células pela técnica do explante**

Após descontaminação, o TC foi segmentado em fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>, sendo posteriormente distribuídos em caixas de cultura de 35 mm (Costar<sup>®</sup>). As caixas de cultura foram previamente revestidas com um fator de adesão, gelatina a 2 % em H<sub>2</sub>O (Sigma). O revestimento das caixas de cultura teve como objetivo promover uma maior aderência das células às caixas de cultura, permitindo desta forma melhorar as condições de crescimento e viabilidade das células.

Às caixas de cultura com os fragmentos de tecido foi adicionado meio de cultura M199 (Sigma), suplementado com SBF 20% (Sigma), 3,75 µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As culturas foram incubadas a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência desejada.

A migração celular a partir dos fragmentos foi observada 6 a 8 dias após o início das culturas primárias, sendo os fragmentos de tecido removidos nesta fase. As células foram mantidas nas condições acima mencionadas até se atingir uma confluência de aproximadamente 80% (cerca de 10-15 dias).

### **2.2. Cultura de células pela técnica de dissociação enzimática**

O TC foi posteriormente segmentado em pequenos fragmentos (1 mm<sup>3</sup>), tendo estes sido colocados numa solução estéril de colagenase IA (0,25 %, Sigma) e protéase XIV (0,03 %, Sigma) em meio de cultura M199 (Sigma). Foram mantidos nesta solução de digestão durante cerca de uma hora, a 37°C, em banho-maria com agitação. A suspensão obtida pela dissociação enzimática foi centrifugada a 2000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado meio de cultura fresco ao sedimento de modo a interromper a digestão enzimática.

A suspensão celular foi posteriormente distribuída por caixas de cultura de 35 mm (Costar<sup>®</sup>), previamente revestidas com gelatina a 2% em H<sub>2</sub>O (Sigma). A estas caixas de cultura foi adicionado meio de cultura M199 (Sigma), suplementado com SBF 20%

(Sigma), 3,75µg/mL de anfotericina B (250 µg/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150 µg/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000 µg/mL, Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma). As culturas foram incubadas a 37°C, numa atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até que atingirem a confluência desejada, cerca de 80% (Pilatz et al., 2005).

### **2.3. Manutenção das culturas celulares**

A primeira mudança de meio foi realizada 6 a 8 dias após o dia em que se iniciou a cultura primária. O meio de cultura utilizado foi o meio acima referido, em que apenas se alterou a concentração de SBF para 10%. As posteriores mudanças de meio ocorreram em intervalos de 3 a 4 dias.

As culturas foram monitorizadas recorrendo a um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK2).

## **3. Caracterização imunofenotípica das células de tecido cavernoso e expressão de recetores purinérgicos**

### **3.1. Tripsinização das células**

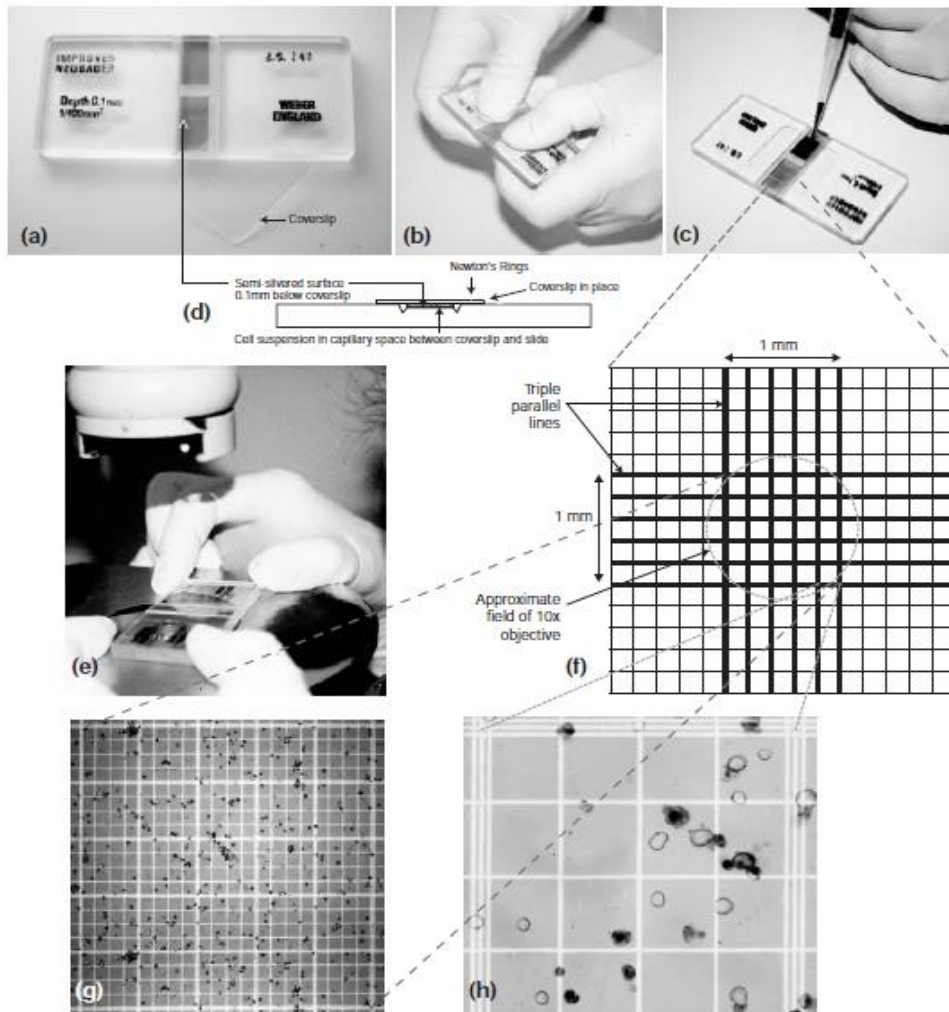
Quando atingida a confluência desejada, tripsinizaram-se as culturas celulares. O meio de cultura foi removido das caixas e procedeu-se à lavagem das culturas com PBS estéril, previamente aquecido a 37°C; este procedimento foi repetido duas vezes para garantir a eliminação do meio de cultura ainda presente nas caixas. As células aderentes foram isoladas enzimaticamente [recorrendo a uma solução de tripsina a 0,04 % (Sigma), pH 7,4 e colagenase a 0,025 % (Sigma) em PBS], durante 10 a 15 minutos; a reação de tripsinização foi interrompida pela adição de meio de cultura fresco. A densidade celular da suspensão foi determinada numa câmara de Neubauer (Figura VI), recorrendo a um corante vital, azul de tripano (Sigma), que permite a distinção entre células viáveis (não incorporam o corante) e células não viáveis (incorporam o corante), através da observação em microscópio ótico.

Cálculos efetuados para a determinação da concentração celular necessária:

$$\text{N}^\circ \text{ de células / mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas}}{8 \text{ (n}^\circ \text{ de quadrantes de contagem)}} \times 10^4 \text{ mL} \times 2 \text{ (F. diluição)}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de células / mL} \times \text{Vol. a usar} = 2,0 \times 10^4 \times \text{Vol. pretendido}$$

Após a contagem das células, procedeu-se à diluição da suspensão em meio de cultura fresco, obtendo-se uma nova suspensão celular com densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/mL. Posteriormente distribuiu-se em diferentes placas de cultura (subcultura), mediante finalidade a que se destinavam.



**Figura VI:** Determinação da densidade celular: (a) hemocítómetro (câmara de *Neubauer*) e lamela antes da utilização; (b) Colocar lamela sobre a câmara; (c) adição de uma suspensão celular; (d) a secção longitudinal, mostrando a posição da amostra de células na câmara de 0,1 mm de profundidade; (e) Visualização ao microscópio; (f) Área total da grelha, a área central delimitada pelo círculo corresponde à área observada na objetiva 10×; (g) Objetiva de baixa ampliação (10x) com suspensão de células e corante vital, azul de tripano; (h) Objetiva de alta potência (40x); As células viáveis não incorporam o corante (mais claras), as células não viáveis, escuras, incorporam o corante (Freshney, 2006).

### 3.2. Imunocitoquímica

As células musculares lisas e as células endoteliais da cultura primária de TCR foram semeadas a uma densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/mL em lâminas de vidro com oito poços (*chamber slides* – Nunc®), previamente revestidas com 2% gelatina em H<sub>2</sub>O (Sigma). As células permaneceram em cultura durante 3 a 7 dias, até atingirem confluência, com mudanças de meio a cada 3 a 4 dias. Quando atingida a confluência desejada, deu-se início ao procedimento de imunofluorescência indireta, para a caracterização imunofenotípica das células e expressão dos recetores purinérgicos. As células em cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão salino-fosfato (PBS) durante 10 minutos, preservando os constituintes celulares (e.g. antigénios e enzimas importantes na marcação por imunofluorescência). Posteriormente foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada) e subsequentemente incubadas com tampão de bloqueio I [10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de albumina de soro bovino (BSA), 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN<sub>3</sub>] durante 1 h, à temperatura ambiente. Procedeu-se, então, à marcação por imunofluorescência indireta utilizando-se um anticorpo (Ab) primário específico contra um antigénio (Ab) alvo, e um anticorpo secundário (com um fluoróforo acoplado), que reconhece o anticorpo primário.

Os anticorpos primários utilizados na marcação das células foram diluídos em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN<sub>3</sub> em PBS), e incubados a 4°C durante aproximadamente 20 horas (Tabela I). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Seguidamente fez-se a incubação com os anticorpos secundários fluorescentes, previamente diluídos em tampão de bloqueio II (Tabela II) durante 2 horas, com agitação à temperatura ambiente. A partir deste momento, as células foram mantidas no escuro, de forma a evitar a fotoexcitação dos fluoróforos: Alexa Fluor 488 (anti-coelho), Alexa Fluor 633 (anti-cabra), Alexa Fluor 563 (anti-rato). No final deste período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Posteriormente, as lâminas de vidro foram montadas com meio Vectashield® e armazenadas a 4°C. A preparação foi observada em microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão) utilizando os lasers que irradiam num comprimento de onda de gama adequada ao fluoróforo utilizado. Após a visualização das células e recolha das imagens necessárias, estas foram processadas informaticamente com o programa do microscópio confocal (FluoViewer FV10-ASW2.0) (Noronha-Matos et al., 2012).

**Tabela I:** Anticorpos primários utilizados na marcação por imunofluorescência indireta

| Anticorpo Primário                     | Hospedeiro   | Diluição | Origem           |
|--|--------------|----------|------------------|
| Actina de Músculo Liso<br>(SMA – FITC) | Ratinho (ms) | 1:250    | Sigma            |
| A <sub>2A</sub>                        | Coelho (rb)  | 1:150    | Alpha Diagnostic |
| A <sub>2B</sub>                        | Coelho (rb)  | 1:75     | Chemicon         |
| P2X1                                   | Coelho (rb)  | 1:100    | Alomone          |
| P2X3                                   | Coelho (rb)  | 1:75     | Alomone          |
| P2Y <sub>1</sub>                       | Coelho (rb)  | 1:50     | Alomone          |
| P2Y <sub>12</sub>                      | Coelho (rb)  | 1:75     | Alomone          |
| P2Y <sub>13</sub>                      | Coelho (rb)  | 1:50     | Alomone          |
| PECAM-1                                | Cabra (gt)   | 1:50     | Santa Cruz       |

**Tabela II:** Anticorpos secundários utilizados na marcação por imunofluorescência indireta

| Anticorpo Secundário | Hospedeiro | IgG anti-x | Diluição | Origem           |
|----------------------|------------|------------|----------|------------------|
| Alexa Fluor 488      | Burro      | Anti-ms    | 1:1500   | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 568      | Burro      | Anti-rb    | 1:1500   | Molecular Probes |
| Alexa Fluor 633      | Burro      | Anti-gt    | 1:1500   | Molecular Probes |

**Tabela III:** Lasers utilizados na observação por imunofluorescência indireta

| Fluoróforo Excitado | Comprimento de Onda | Laser |
|---------------------|---------------------|-------|
| Alexa Fluor 488     | 488 nm              | Árgon |
| Alexa Fluor 568     | 568 nm              | HeNe1 |
| Alexa Fluor 633     | 633 nm              | HeNe2 |

### **3.3. Determinação das oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ em células vivas por microscopia confocal funcional**

Através da metodologia descrita anteriormente, desenvolvida neste projeto, obtiveram-se culturas celulares heterogêneas a partir de TCR. As culturas são constituídas por células musculares lisas (imunorreativas contra a proteína contráctil  $\alpha$ -actina SMA) e por células endoteliais (imunorreativas contra o marcador de superfície PECAM-1/CD31, não apresentando imunorreatividade contra a proteína contráctil  $\alpha$ -actina SMA). Para a caracterização funcional das células, estas foram semeadas em caixas de cultura com poço central de 10 mm (FluoroDish® WPI®) com uma densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/mL. As células permaneceram em crescimento durante 3 a 7 dias, em meio de cultura M199 (Sigma), suplementado com SBF 10 % (Sigma), 3,75  $\mu$ g/mL de anfotericina B (250  $\mu$ g/mL, Sigma), 150 IU/mL de penicilina, 150  $\mu$ g/mL de estreptomicina (Solução penicilina - estreptomicina a 10000 IU/mL – 10000  $\mu$ g/mL, Sigma) e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Sigma).

Previamente à realização das experiências, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com uma solução de Tyrode (composição, em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; glucose 11,2; pH 7.4) e incubadas durante 50 minutos, a 37°C, com a sonda fluorescente sensível ao Ca<sup>2+</sup>, Fluo-4NW (2,5  $\mu$ M), em PBS numa solução contendo 2,5 % de ácido plurónico em DMSO (100  $\mu$ M). Após a remoção da solução com o fluoróforo, as células foram novamente lavadas com a solução de Tyrode. As caixas foram subsequentemente montadas na câmara de perfusão termostatizada do microscópio confocal invertido (Olympus FV1000, Japan), equipado com uma objetiva de 20x (LUCPLFL 20 X PH; N.A. 0.45). A partir desse momento, as células foram perfundidas continuamente (1mL/min) com uma solução Tyrode arejada com uma mistura de O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), a 32°C (Figura VII). Os fármacos testados foram perfundidos através de um sistema multicanal de perfusão (ValveLink 8.2, Digitimer, San Francisco, CA). As culturas foram então perfundidas com Tyrode (controlo) ou com os fármacos a serem testados durante 6 (ou 2) minutos.

Com recurso a um laser (Multi-line Ar laser), o fluoróforo foi excitado a 488 nm emitindo fluorescência no intervalo de 510-560 nm (detetada pelo digitalizador do microscópio confocal). As alterações na fluorescência do Fluo-4NW foram detetadas pelo programa FluoView Advanced Software (Olympus, Tokyo, Japan). As imagens de fluorescência foram recolhidas em intervalos de 20 segundos.

Os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, induzidos pelos fármacos estudados, foram calibrados para uma resposta máxima de cálcio produzido pela ionomicina ( $5 \mu\text{M}$ , 100% de resposta) (Henriksen et al., 2006; Noronha-Matos et al., 2012).



**Figura VII:** Microscópio Confocal Olympus FluoView FV1000 (imagem retirada de <http://www.olympuslatinoamerica.com/portuguese>)

#### 4. Análise estatística:

As amostras são preparações independentes obtidas a partir de TCR (género masculino), analisadas e testadas em diferentes experiências. Para cada experiência e doseamento, realizou-se um ensaio.

As variáveis são quantitativas uma vez que a informação de cada experiência será medida e, posteriormente, comparada e avaliada.

Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de  $n$  número de animais (ratazana).

As respostas dos ensaios funcionais realizados nas culturas celulares foram expressas em percentagem da resposta máxima à ionomicina ( $5 \mu\text{M}$ ). Para as comparações múltiplas, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni. Para a comparação entre dois valores usou-se o teste  $t$  Student, em que  $P < 0.05$  foi considerado significativo.

## **Capítulo III - Resultados**

## **1. Otimização da técnica de cultura de células de TCR**

### **1.1. Cultura de células de músculo liso e células endoteliais de TCR**

Com o objetivo dar continuidade aos trabalhos experimentais funcionais que tem vindo a ser realizados no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do ICBAS/UP, surgiu a necessidade de se estabelecer um protocolo para obtenção de culturas de células de TC. Inicialmente recorreu-se à literatura e verificou-se que vários autores referem o isolamento de células através da técnica de explante (Pilatz et al., 2005; Song et al., 2009; Yin et al., 2012), enquanto outros referenciam a técnica da digestão enzimática como procedimento de rotina (Doyle et al., 2012, Chung et al., 2012). A fim de determinar qual das técnicas melhor se adequa ao estudo do crescimento e proliferação de células de músculo liso e de células endoteliais provenientes do tecido cavernoso de ratazana (TCR), recorreu-se, a execução de ambos os procedimentos.

#### **1.1.1. Cultura de células pela técnica do explante**

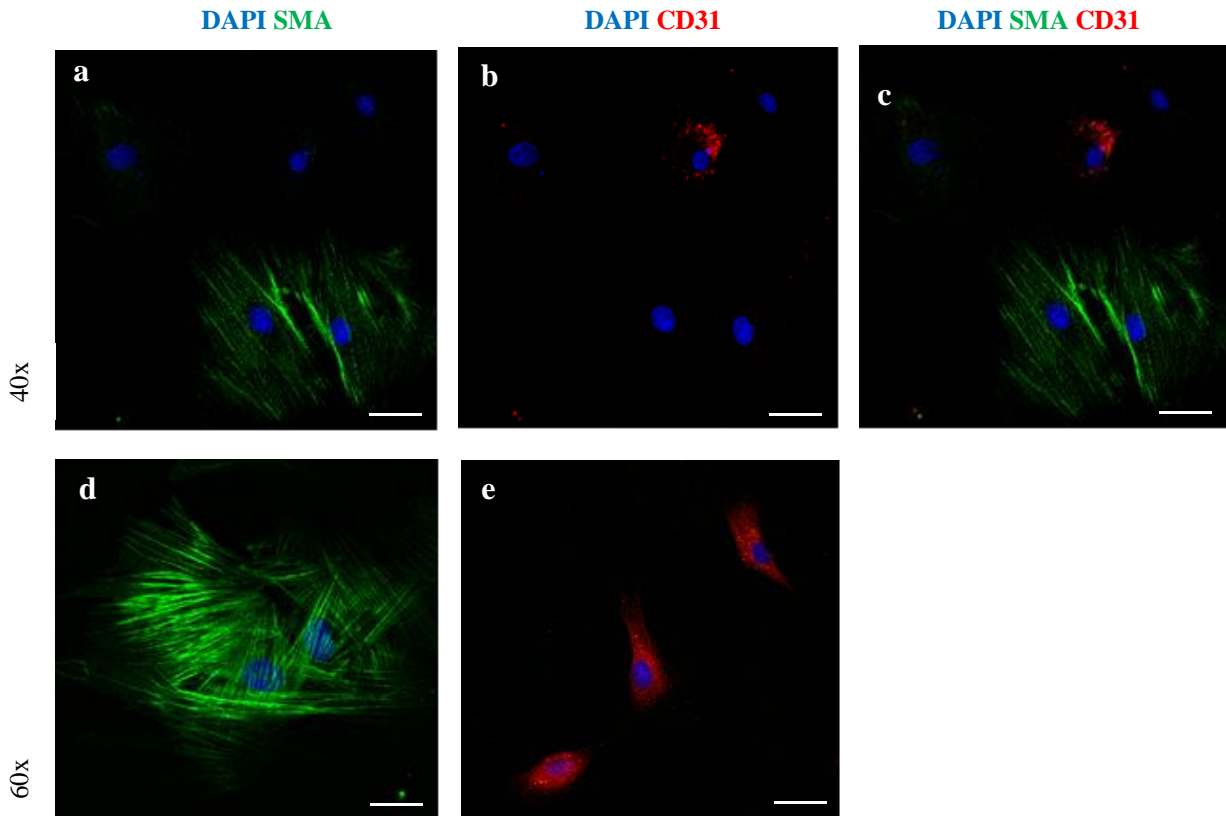
- Migração celular a partir dos explantes aproximadamente 6-8 dias;
- Inicialmente as células localizavam-se em volta dos explantes;
- Atingia-se a confluência desejada 10-12 dias após o início da cultura;
- As células permaneciam viáveis durante mais tempo;
- As células não se destacavam tão facilmente da placa de cultura, permanecendo viáveis na realização das atividades experimentais realizadas posteriormente;
- Processo de cultivo das células mais rápido;

#### **1.1.2. Cultura de células pela técnica da dissociação enzimática**

- Presença de células em cultura cerca de 8-10 dias após inicio da cultura;
- Processo mais lento até ser atingida a confluência desejada, cerca de 15 dias;
- As células apresentavam uma morfologia característica, com sinais de envelhecimento;
- Grande quantidade de células não viáveis durante os processos experimentais a que foram submetidas posteriormente;
- As células destacavam-se mais facilmente das placas, durante os processos experimentais realizados posteriormente.
- Processo de cultivo celular mais prolongado;

## 1.2. Caracterização fenotípica das células de TCR por imunofluorescência indireta

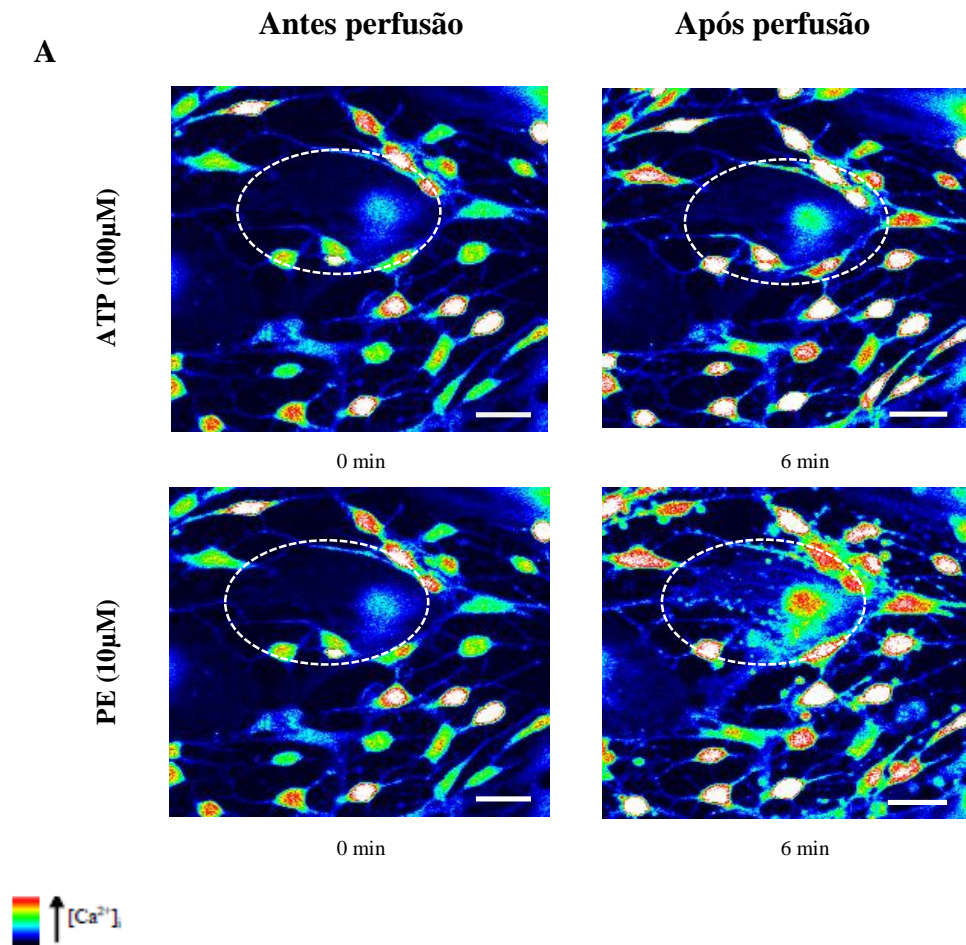
Com recurso à técnica de imunofluorescência indireta, foi possível caracterizar a identidade das células em cultura obtidas a partir do TCR. As células isoladas de TCR são culturas mistas de células musculares lisas e de células endoteliais. Confirmou-se a presença de células musculares lisas, recorrendo à marcação com um anticorpo específico contra a proteína contráctil,  $\alpha$ -actina (Chung et al., 2012). A presença de células endoteliais foi inferida, por estas células não exibirem imunorreatividade contra a proteína contráctil,  $\alpha$ -actina (verde) e por apresentam imunorreatividade contra o marcador específico da superfície das células endoteliais, PECAM-1 (anti-CD31) (Privratsky et al., 2010) (Figura VIII).

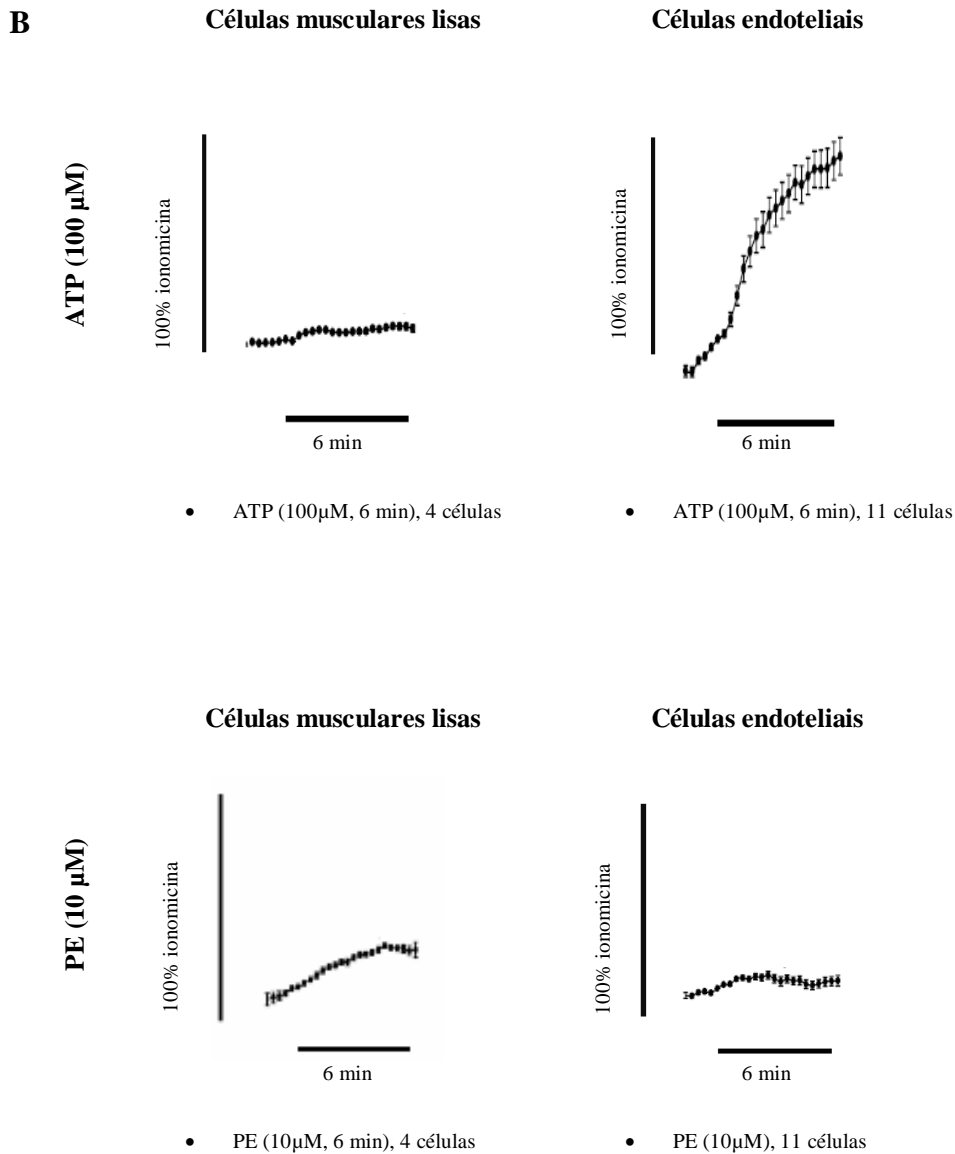


**Figura VIII:** Marcação imunocitoquímica de células de tecido cavernoso de ratazana. Co-culturas de células musculares lisas e de células endoteliais com 3 dias de subcultura. **(a e d)** As células musculares lisas exibem imunorreatividade positiva contra anti-msSMA-FITC (marcação a verde). **(b e e)** As células endoteliais exibem imunorreatividade positiva contra o marcador de superfície, PECAM-1 (marcação a vermelho). **(c)** Sobreposição das duas imagens (a) e (b). Imagens obtidas por microscopia confocal (Olympus FV1000, Japan). A escala corresponde a 50  $\mu$ m.

## 2. Caracterização funcional das culturas celulares de TCR por microscopia confocal: Análise das oscilações do $\text{Ca}^{2+}$ intracelular em resposta a agonistas específicos

Avaliou-se a resposta diferencial de células de TCR presentes em co-culturas de células musculares lisas e células endoteliais com 10 dias de evolução. As células foram previamente marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW e estimaram-se as oscilações dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por microscopia confocal funcional (Figura IX). As respostas de cada uma das células foram registadas na presença de ATP (100  $\mu\text{M}$ , agonista P2) e na presença de PE (10  $\mu\text{M}$ , agonista  $\alpha$ -adrenérgico). As células endoteliais reagem preferencialmente à aplicação de ATP (100  $\mu\text{M}$ ), enquanto as células musculares lisas respondem de forma mais significativa à PE (10  $\mu\text{M}$ ) através de aumentos dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura IX).

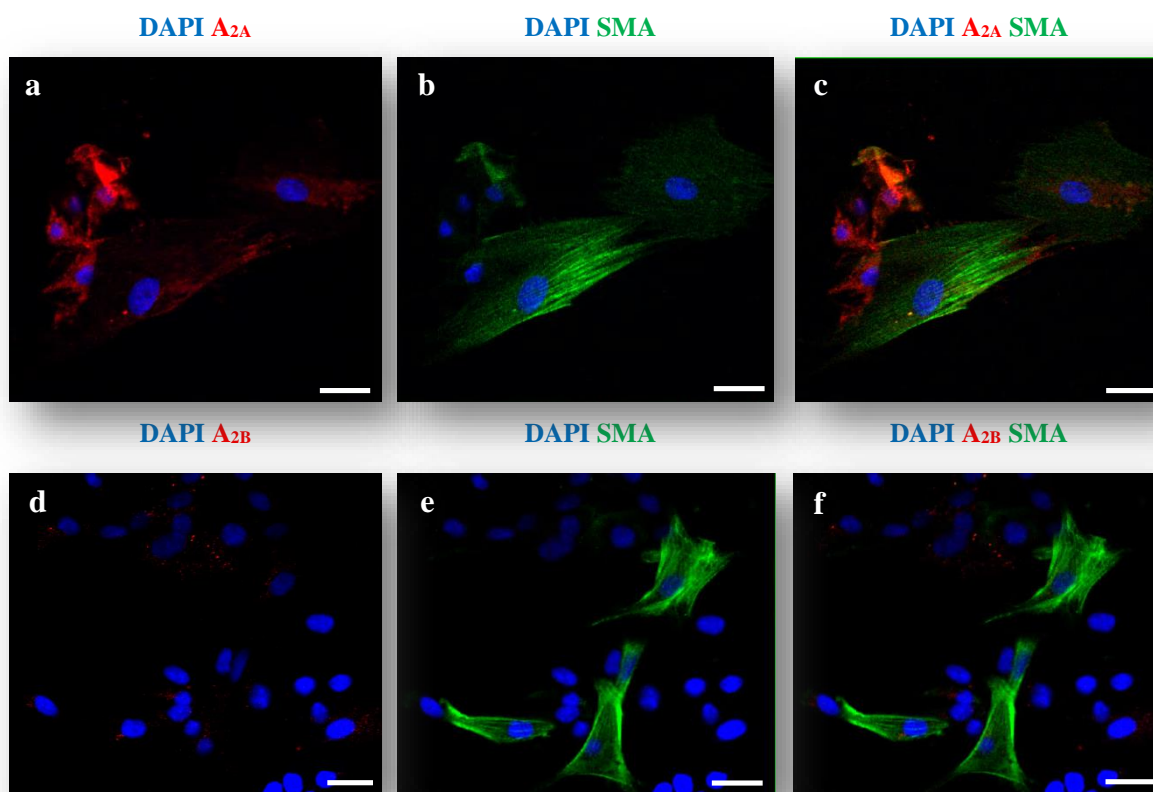




**Figura IX:** Co-culturas de células musculares lisas e células endoteliais obtidas de tecido cavernoso de ratazana com 10 dia de subcultura. As células foram incubadas com a sonda sensível ao cálcio, Fluo-4NW (2.5  $\mu$ M, em PBS contendo 2,5% de ácido plurónico), durante 50 min a 37°C; Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  foram monitorizados num microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão) de 20 em 20 segundos. As células foram perfundidas (1ml/min) com uma solução de Tyrode; o ATP (100  $\mu$ M,  $n=1$ ) e a fenilefrina (PE 10  $\mu$ M,  $n=1$ ) foram aplicados durante 6 minutos. **(A)** Imagens de microscopia confocal das células marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW antes e após aplicação dos fármacos (ATP 100  $\mu$ M e PE 10  $\mu$ M). Célula muscular lisa delimitada por círculo, flanqueada por células endoteliais. A escala corresponde a 50  $\mu$ m. **(B)** Oscilações dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzido pelo ATP (100  $\mu$ M, 6 min) e por PE (10  $\mu$ M, 6 min) em células musculares lisas e endoteliais. Entre a aplicação dos fármacos, as células foram lavadas com a solução de Tyrode durante 9 min. Os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram calibrados para o sinal de cálcio induzido pelo ionóforo ionomicina (5 $\mu$ M, 100% de resposta). Cada ponto representa a média obtida a partir de 4 células musculares lisas e 11 células endoteliais. As barras pretas horizontais na parte inferior dos gráficos indicam o período de exposição ao fármaco. As barras verticais representam o desvio padrão.

### 3. Expressão de recetores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> em co-culturas celulares de TCR

Estudos realizados anteriormente no nosso laboratório demonstram o papel da adenosina no relaxamento de TCH por via da ativação dos recetores A<sub>2A</sub> (musculares) e A<sub>2B</sub> (endoteliais) (Faria et al., 2006). Por outro lado, o efeito relaxante da adenosina no TCR parece ser devido apenas à ativação de recetores do subtipo A<sub>2A</sub> (Valente, 2008; Viais, 2011). Neste trabalho avaliou-se a expressão destes dois recetores da adenosina em co-culturas de células musculares e endoteliais isoladas do TCR por imunocitoquímica. Os resultados mostram que a presença de recetores A<sub>2A</sub> é mais evidente nas endoteliais, embora também exista nas células negativas para a marcação contra a proteína contráctil do músculo liso,  $\alpha$ -actina (SMA). Não se observou marcação específica contra o recetor A<sub>2B</sub> nas células isoladas do TCR (Figura X).

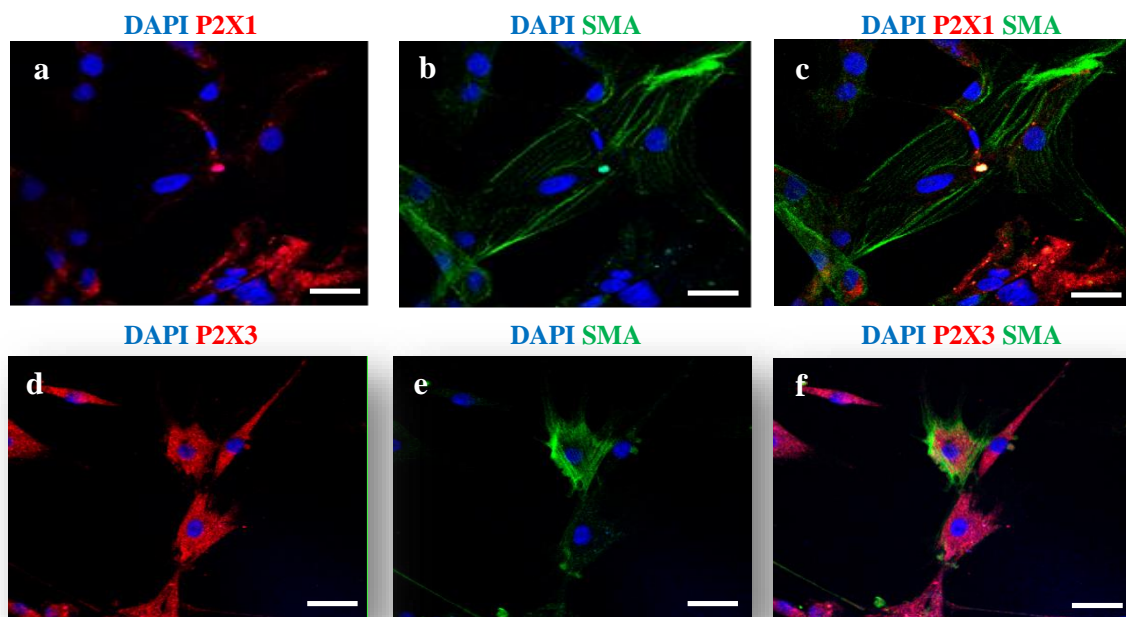


**Figura X:** Marcação imunocitoquímica de células musculares lisas e células endoteliais do TCR em co-cultura com 3 e 4 dias de evolução. **(a)** Imunorreatividade positiva para o anticorpo contra os recetores A<sub>2A</sub> (vermelho). **(b)** Imunorreatividade positiva para o anticorpo específico de células musculares lisas (anti-msSMA-FITC, verde). **(c)** Sobreposição das duas imagens (a) e (b). **(d)** Imunorreatividade positiva para o anticorpo contra os recetores A<sub>2B</sub> (vermelho). **(e)** Imunorreatividade positiva para o anticorpo específico de células musculares lisas (anti-msSMA-FITC, verde). **(f)** Sobreposição das duas imagens (d) e (e). Imagens obtidas através de microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão). A escala corresponde a 50  $\mu$ m.

#### 4. Papel dos recetores ionotrópicos P2X1 e P2X3 nas células musculares lisas e endoteliais do TCR

##### 4.1. Expressão de recetores ionotrópicos P2X1 e P2X3 em co-culturas celulares de TCR

Para avaliar a presença de recetores do tipo P2X1 e P2X3 em células musculares lisas e em células endoteliais de TCR, realizaram-se ensaios de imunofluorescência indireta (Figura XI). Os ensaios de imunolocalização revelaram a presença de recetores P2X1 em células que expressam imunorreatividade contra o marcador anti-msSMA-FITC e também em células negativas para a marcação contra a  $\alpha$ -actina, embora nas últimas a densidade de marcação seja menor. Os ensaios de imunolocalização revelaram a presença de recetores P2X3 tanto em células que expressam imunorreatividade contra o marcador anti-msSMA-FITC (músculo liso) como em células em que a marcação para a actina foi negativa (células endoteliais) (Figura XI).

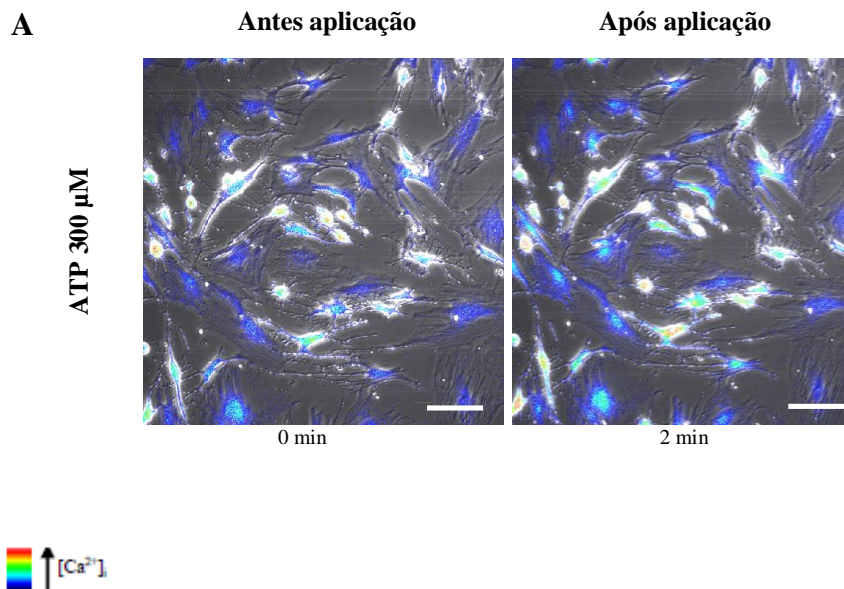


**Figura XI:** Marcação imunocitoquímica de células de tecido cavernoso de ratazana em co-culturas de células musculares lisas e células endoteliais com 3 e 7 dias de evolução. (a) As células exibem imunorreatividade positiva contra anticorpo dos recetores P2X1 (vermelho). (b) As células apresentam imunorreatividade positiva contra anticorpo específico para células musculares lisas (anti-msSMA-FITC, verde). (c) Sobreposição das duas imagens (a) e (b). (d) As células exibem imunorreatividade positiva contra anticorpo dos recetores P2X3 (vermelho). (e) As células apresentam imunorreatividade positiva contra anticorpo específico para células musculares lisas (anti-msSMA-FITC, verde). (f) Sobreposição das imagens (d) e (e). Imagens obtidas através de microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão). Escala corresponde a 50  $\mu$ m.

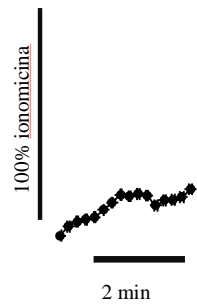
#### 4.2. Envolvimento do recetor P2X1 e P3X3 nas oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ causadas pelo ATP em co-culturas de células de TCR

A incubação com ATP (300  $\mu$ M, 2 min) causou aumentos da  $[Ca^{2+}]_i$  tanto nas células musculares como nas células endoteliais isoladas do TCR controlo. O aumento dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  foi sustentado, embora de pequena amplitude das células musculares lisas. Este padrão foi diferente do efeito transitório observado nas células endoteliais; nestas células, a aplicação de ATP (300  $\mu$ M) causou um pico rápido do  $[Ca^{2+}]_i$  que regressou ao nível basal 1 minuto após a aplicação (Figura XII). Apenas o aumento sustentado do  $[Ca^{2+}]_i$  observado nas células musculares lisas foi prevenido pelo antagonista seletivo dos recetores P2X1, NF 023 (3  $\mu$ M, 6 min). O transiente de  $[Ca^{2+}]_i$  observado nas células endoteliais incubadas com ATP (300  $\mu$ M) não foi significativamente alterado pelo NF 023 (3  $\mu$ M, 6 min) (Figura XII).

O antagonista seletivo dos recetores P2X3, A 317491 (100 nM) atenuou ( $P < 0.05$ ) as oscilações intracelulares do  $[Ca^{2+}]_i$  produzidas pelo ATP (300  $\mu$ M) tanto nas células musculares lisas como nas células endoteliais isoladas do TCR (Figura XII). Estes resultados confirmam a presença de recetores P2X3 funcionantes em ambos os tipos celulares, tal como foram observados por imunocitoquímica (Figura XI).

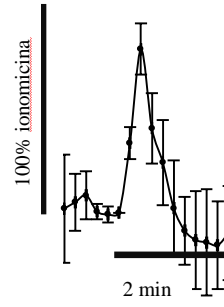


**B Células musculares lisas**



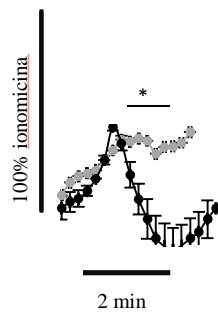
● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 28 células

**Células endoteliais**



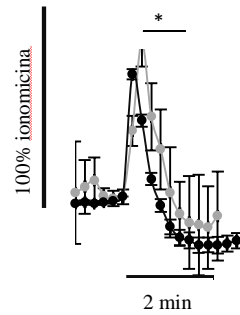
● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 18 células

**C Células musculares lisas**



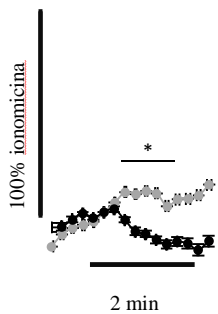
● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 28 células  
● + NF 023 (3  $\mu$ M, 6 min), 20 células

**Células endoteliais**



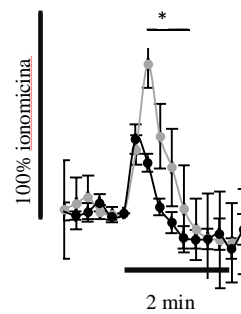
● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 18 células  
● + NF 023 (3  $\mu$ M, 6 min), 25 células

**D Células musculares lisas**



● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 28 células  
● + A 317491 (100 nM, 6 min), 22 células

**Células endoteliais**



● ATP (300  $\mu$ M, 2 min), 18 células  
● + A 317491 (100 nM, 6 min), 9 células

**Figura XII:** Co-cultura de células musculares lisas e de células endoteliais obtidas de tecido cavernoso de ratazana, com 5 dias de subcultura. As células foram incubadas com a sonda sensível ao cálcio Fluo-4NW

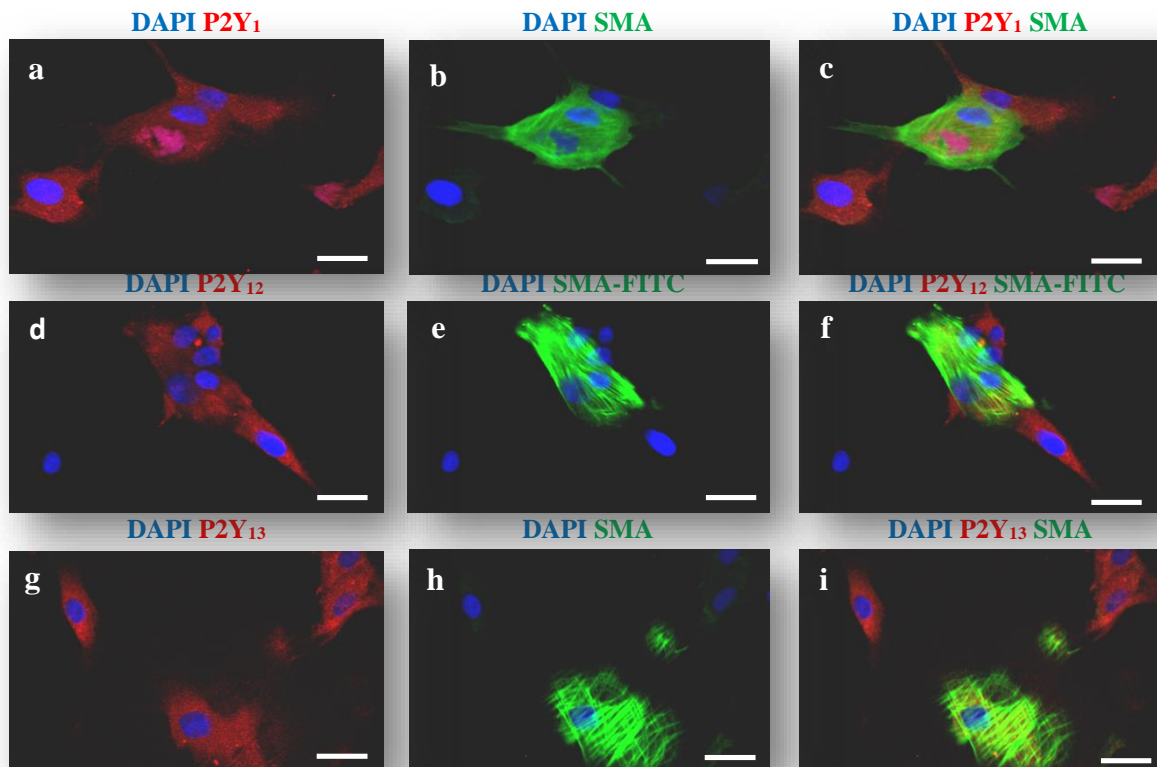
(2.5  $\mu\text{M}$ , em PBS contendo 2,5% de ácido plurónico), durante 50 min a 37°C; Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  foram monitorizados em microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão) de 20 em 20 segundos. As células foram perfundidas (1ml/min) com uma solução de Tyrode. **(A)** Imagens de microscopia confocal das células marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW, antes e após aplicação de ATP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ). Escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Oscilações dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causadas pela aplicação de ATP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ). Cada ponto representa a média de 28 células musculares e 18 células endoteliais; **(C)** Oscilações dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causadas pela aplicação de ATP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ) na ausência do agonista representado a cinzento. Cada ponto representa a média de 28 células musculares e 18 células endoteliais; e na presença do antagonista seletivo P2X1, NF 023 (3  $\mu\text{M}$ , 6 min,  $n=1$ ), representado a preto. Cada ponto representa a média obtida a partir de 20 células musculares e de 25 células endoteliais. Os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram calibrados para o sinal de cálcio induzido pelo ionóforo ionomicina (5 $\mu\text{M}$ , 100% de resposta). **(D)** Oscilações dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por ATP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ), na ausência de antagonista, representado a cinzento. Cada ponto representa a média obtida a partir de 28 células musculares e 18 endoteliais; e na presença do antagonista seletivo P2X3, o A 317491 (100 nM, 6 min,  $n=1$ ), representado a preto. Cada ponto representa a média obtida a partir de 22 células musculares e 9 endoteliais; Transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram calibrados para o sinal de cálcio induzido pelo ionóforo ionomicina (5 $\mu\text{M}$ , 100% de resposta). As barras pretas horizontais, inferiores a cada gráfico, indicam o período de exposição fármaco. As barras verticais representam o desvio padrão. \* $P < 0.05$  representa uma diferença significativa.

Comparando a atenuação da resposta das células ao ATP (300  $\mu\text{M}$ ) pelos antagonistas seletivos para os recetores P2X1 e P2X3, verifica-se que nas células musculares lisas ambos os compostos antagonizam o efeito do nucleótido. A atenuação do efeito do ATP é mais evidente na fase mais tardia da resposta. O mesmo não se verificou nas células endoteliais. Nestas células, o efeito do antagonista P2X3, A 317491 (100 nM), foi mais evidente que o do antagonista P2X1, NF 023 (0,3  $\mu\text{M}$ ), sugerindo que os recetores P2X3 estão predominantemente envolvidos nos transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP nas células endoteliais do tecido cavernoso de ratazana.

## 5. Papel dos recetores metabotrópicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> nas células musculares lisas e endoteliais de TCR

### 5.1. Expressão de recetores metabotrópicos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> em co-culturas celulares de TCR

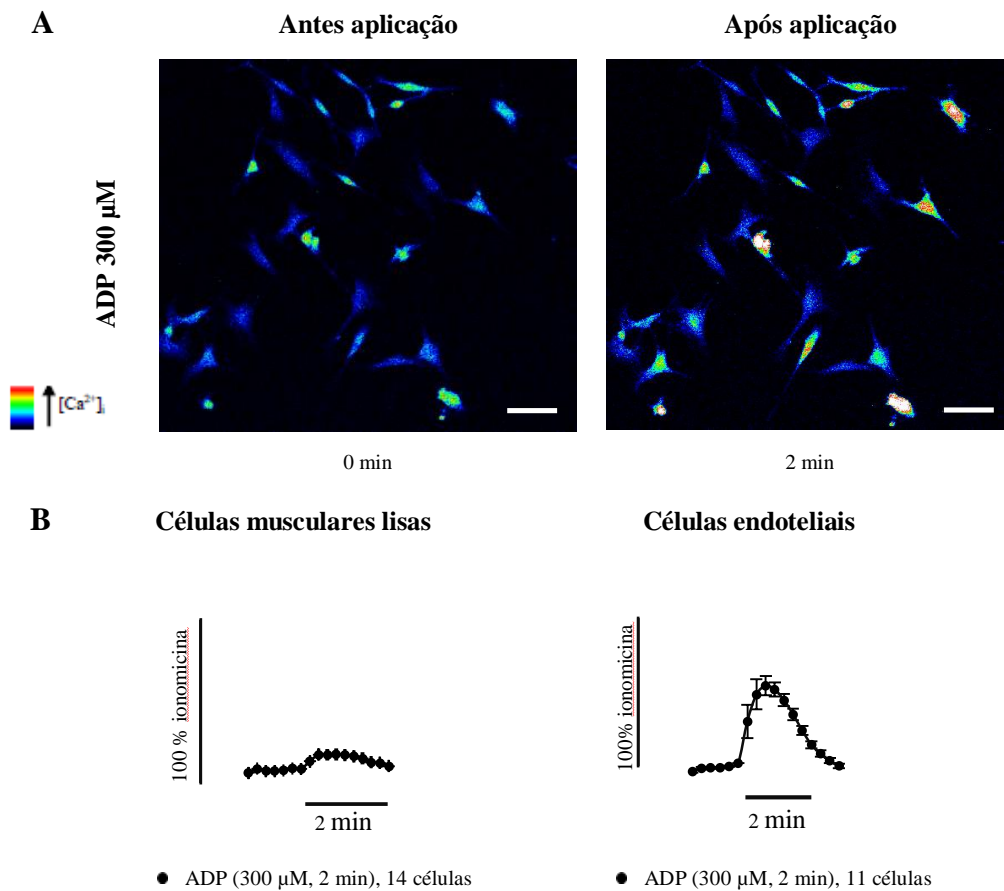
A presença de recetores P2Y em culturas celulares isoladas de TCR foi avaliada através de ensaios de imunofluorescência indireta (Figura XIII). As células exibem imunorreatividade contra os recetores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> (vermelho) observada tanto em células musculares lisas (SMA positivas, verde) como em células (endoteliais) negativas para este marcador, embora nas últimas a densidade destes recetores seja maior.

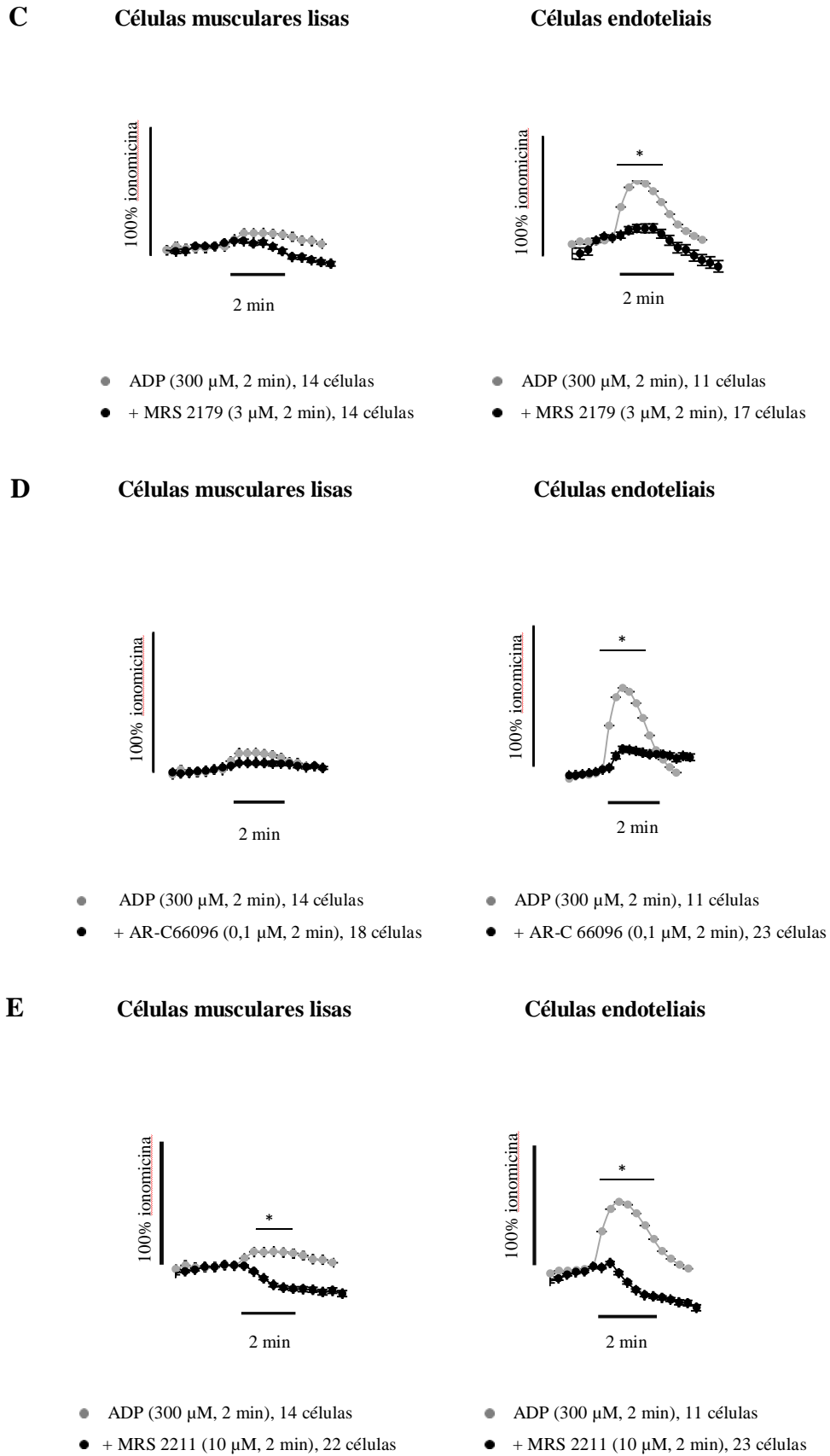


**Figura XIII:** Marcação imunocitoquímica de células de TCR, em co-cultura de células musculares lisas e endoteliais, com 6 dias de subcultura. **(a)** Células marcadas positivamente para recetores P2Y<sub>1</sub> (vermelho). **(b)** As células apresentaram imunorreatividade positiva em relação ao marcador específico para células musculares lisas, SMA-FITC (verde). **(c)** Sobreposição das duas imagens (a) e (b). **(d)** Células marcadas positivamente para recetores P2Y<sub>12</sub> (vermelho). **(e)** As células apresentaram imunorreatividade positiva em relação ao marcador específico para células musculares lisas, SMA-FITC (verde). **(f)** Sobreposição das duas imagens (d) e (e). **(g)** Células marcadas positivamente para recetores P2Y<sub>13</sub> (vermelho). **(h)** Células apresentaram imunorreatividade positiva em relação ao marcador específico para células musculares lisas, SMA-FITC (verde). **(i)** Sobreposição das duas imagens (g) e (h). Imagens obtidas através de microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão). A escala corresponde a 50  $\mu$ m.

## 5.2. Envolvimento dos recetores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> nas oscilações de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> causadas pelo ADP em co-culturas de células de TCR

A incubação com ADP (300 μM, 2 min) causou aumentos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tanto nas células musculares como nas células endoteliais isoladas do TCR (Figura XIV). O aumento dos níveis de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> foi sustentado, embora de pequena amplitude das células musculares lisas. Este padrão foi diferente do efeito transitório observado nas células endoteliais; nestas células, a aplicação de ADP (300 μM) causou um aumento transitório dos níveis de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que regressou ao nível basal antes da suspensão da sua aplicação (Figura XIV). O aumento dos níveis de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> observado tanto nas células musculares lisas como nas células endoteliais foi prevenido na presença de antagonistas seletivos dos recetores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub>, respetivamente MRS 2179 (0,3 μM), AR-C 66096 (0,1 μM) e MRS 2211 (10 μM), aplicados 6 minutos antes do ADP (300 μM), (Figura XIV). Estes resultados confirmam a funcionalidade dos recetores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> expressos nas células musculares lisas (SMA positivas) e endoteliais (SMA negativas) por imunocitoquímica (ver Figura XIV).





**Figura XVI:** Co-cultura de células musculares lisas e células endoteliais obtidas de tecido cavernoso de ratazana controlo, com 3 dias de subcultura. As células foram incubadas com sonda sensível ao cálcio Fluo-

4NW (2.5  $\mu\text{M}$ , em PBS contendo 2,5% de ácido plurónico), durante 50 min, a 37°C; Os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  foram monitorizados em microscópio confocal (Olympus FV1000, Japão) de 20 em 20 segundos. As células foram perfundidas (1ml/min) com uma solução de Tyrode. **(A)** Imagens de microscopia confocal das células indicadas marcadas com a sonda fluorescente Fluo-4NW, antes e após aplicação de ADP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ). Escala corresponde a 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Oscilações dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por ADP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ). Cada ponto representa a média obtida a partir de 14 células musculares lisas e 11 endoteliais; **(C)** Oscilações dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por ADP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ), na ausência do antagonista, representado a cinzento. Cada ponto representa a média obtida a partir de 14 células musculares lisas e 11 endoteliais; e na presença do antagonista seletivo do recetor  $\text{P2Y}_1$ , o MRS 2179 (0,3  $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ), representado a preto. Cada ponto representa a média obtida a partir de 14 células musculares lisas e 17 células endoteliais; **(D)** Oscilações dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por ADP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ) na ausência de antagonista, representado a cinzento. Cada ponto representa a média obtida a partir de 14 células musculares lisas e 11 endoteliais; e oscilações dos níveis de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido por ADP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ), na presença do antagonista do recetor seletivo  $\text{P2Y}_{12}$ , AR-C 66096 (0,1  $\mu\text{M}$ ), 2 min,  $n=1$ ), representado a preto. Cada ponto representa a média obtida a partir de 18 células musculares lisas e 23 endoteliais; **(E)** Oscilações dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzido por ATP (300 $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ) na ausência de antagonista, representado a cinzento. Cada ponto representa a média obtida a partir de 14 células musculares lisas e 11 endoteliais; e na presença do antagonista seletivo do recetor  $\text{P2Y}_{13}$ , MRS 2211 (10  $\mu\text{M}$ , 2 min,  $n=1$ ), representado a preto. Cada ponto representa a média obtida a partir de 22 células musculares lisas e 23 endoteliais. Transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foram calibrados para o sinal de cálcio induzido pelo ionóforo ionomicina (5 $\mu\text{M}$ , 100% de resposta). As barras pretas horizontais, inferiores a cada gráfico, indicam o período de exposição fármaco. As barras verticais representam o desvio padrão. \* $P < 0.05$  representa uma diferença significativa.

Comparando a atenuação da resposta das células ao ADP (300  $\mu\text{M}$ ) pelos antagonistas seletivos para os recetores  $\text{P2Y}_1$ ,  $\text{P2Y}_{12}$  e  $\text{P2Y}_{13}$ , verifica-se que a mesma foi observada tanto nas células endoteliais como nas células musculares lisas. No entanto, a atenuação do efeito do ADP foi mais evidente nas células endoteliais, sugerindo que os recetores  $\text{P2Y}_1$ ,  $\text{P2Y}_{12}$  e  $\text{P2Y}_{13}$  estarão provavelmente mais envolvidos nos transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzidos pelo ADP nas células endoteliais do tecido cavernoso de ratazana confirmando as observações por imunohistoquímica (Figura XIII).

## **Capítulo IV - Discussão**

Embora se tenha demonstrado o papel fundamental dos modelos animais na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção erétil, surgiu a necessidade de estabelecer um protocolo exequível usando culturas primárias de tecido cavernoso de ratazana para se investigarem os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DE de origem vasculogénica. Considerando que o tecido cavernoso consiste numa mistura heterogénea constituída maioritariamente por células musculares lisas e células endoteliais, o isolamento dos dois componentes celulares a partir do TCR pode oferecer a possibilidade de definir as características moleculares e funcionais de cada tipo celular numa matriz mais simples.

Porém, inúmeras dificuldades técnicas foram encontradas na obtenção de culturas primárias a partir de TCR, sendo de salientar a reduzida quantidade de células viáveis obtidas no final do processo de isolamento deste tecido (Chung et al., 2012). Face a estes resultados houve a necessidade de recorrer à alteração do meio de cultura DMEM, para M199, um meio mais enriquecido em sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas entre outros, mostrando ser o mais adequado para o crescimento e manutenção deste tipo de células (Pilatz et al., 2005; Yin et al., 2012). Outra condicionante a salientar, diz respeito à dificuldade na obtenção de culturas primárias de TC isentas de contaminações bacterianas, porventura devido à excessiva manipulação do tecido (Chung et al., 2012). Este fator prolongou o tempo necessário para a otimização do protocolo. Para reduzir possíveis origens de contaminação microbiológica resultante do tempo de exposição / manipulação do tecido, utilizou-se uma técnica asséptica e a desinfeção sistemática de uma região alargada da pele do animal. O tempo de exposição do tecido recolhido ao meio de descontaminação AB10x foi aumentado para 3 ciclos de 30 minutos cada e dessa forma conseguiram, por fim, obter-se culturas isentas de contaminações bacterianas.

Outro fator que prolongou a otimização desta técnica de isolamento e cultura celular foi o facto destas células se destacarem muito facilmente das caixas de cultura, perdendo-se uma grande quantidade de células durante o processo de manutenção das culturas devido a mudanças de meio, marcação imunocitoquímica e ensaios funcionais. Houve, assim, a necessidade de seleccionar um fator de adesão que prolongasse a viabilidade celular até ao final do processo. Para tal, recorreu-se ao revestimento prévio das caixas de cultura com gelatina 2% em H<sub>2</sub>O (Sigma). Quando em contacto com uma superfície de adesão porosa, as células polarizam de forma similar à situação *in vivo*, verificando-se um melhoramento da funcionalidade das células e uma maior proliferação

celular (Freshney et al., 2006). Nestas condições as células não se destacaram da superfície das caixas durante o processo de caracterização fenotípica e ensaios funcionais, revelando ser um procedimento fundamental para a obtenção e manutenção de células de TCR viáveis (Yin et al., 2012).

No sentido de aumentar a densidade e promover a viabilidade das culturas, recorreu-se à literatura para determinar o processo de isolamento que mais se adequava a esta investigação. Destacaram-se dois tipos de protocolos, a técnica do explante (Chung et al., 2012; Doyle et al., 2012) e a técnica da dissociação enzimática (Pilatz et al., 2005; Song et al., 2009; Yin et al., 2012). Estas técnicas diferem fundamentalmente no processo inicial de isolamento das células em que, no segundo caso, se recorre a enzimas para auxiliar a digestão do tecido. Na execução de ambas as técnicas, já com as alterações acima descritas, foi possível observar diferenças no tempo de crescimento, na densidade e na viabilidade celular. Pela técnica do explante, as células apresentam uma morfologia característica das células de tecido cavernoso, permanecendo viáveis durante mais tempo. De destacar, também, que o processo de migração celular a partir dos explantes foi mais acelerado, atingindo-se a confluência desejada 10-12 dias após o início da cultura, enquanto na digestão enzimática foram necessários mais de 15 dias. Além do processo ser mais moroso, na digestão enzimática, as células expressavam alguns sinais de envelhecimento e, conseqüentemente, uma taxa de viabilidade inferior. De acordo com os resultados obtidos, a técnica do explante demonstrou ser a mais adequada a um protocolo de rotina no isolamento do TCR para obter co-culturas de células musculares lisas e endoteliais. O recurso a enzimas digestivas proteolíticas, como a colagenase e protéase, acelera o processo de dissociação das células por clivagem das suas ligações. No entanto, neste caso, tornou-se uma desvantagem. Face aos resultados desta investigação, estas enzimas, parecem provocar efeito de toxicidade interferindo na integridade celular devido à destruição de proteínas da superfície (Ryan, 2008; Bernas et al., 2010; Yin et al., 2012).

A caracterização fenotípica e avaliação da expressão de recetores purinérgicos nas células de tecido cavernoso em cultura são possíveis através da técnica de imunofluorescência indireta. Neste caso, por se tratarem de co-culturas de células musculares lisas e endoteliais, houve a necessidade de caracterizar cada tipo celular envolvido recorrendo a anticorpos específicos, para posteriormente se avaliar quais os recetores purinérgicos presentes em cada tipo celular (Privratsky et al., 2010; Chung et al., 2012).

As culturas celulares isoladas de TCR apresentam uma população heterogénea e, através das imagens obtidas (Figura VIII), foi possível detetar duas populações celulares distintas. Algumas células apresentam imunorreatividade positiva contra a proteína contráctil,  $\alpha$ -actina (anti-msSMA-FITC), característica das células musculares lisas (Chung et al., 2012). No entanto, verificou-se que outras células não marcavam positivamente com o anticorpo (anti-msSMA-FITC), sendo detetadas pela marcação nuclear por DAPI e através da marcação com o anticorpo anti-PECAM-1/CD31 (anti-gtPECAM-1/CD31) (Figura VIII) (Privratsky et al., 2010; Chung et al., 2012). As células que apresentam imunorreatividade contra a  $\alpha$ -actina (marcação verde) exibem uma morfologia característica, apresentam maiores dimensões e um padrão estriado com inúmeros prolongamentos característicos das fibras musculares. As restantes células que não marcam positivamente com esse anticorpo (anti-msSMA-FITC) e apresentam imunorreatividade contra o marcador de superfície das células endoteliais, PECAM-1/CD31, são células de menores dimensões e revelam uma morfologia fusiforme e muitas vezes poliédrica com um padrão de marcação “pontilhado”, sugerindo a tendência para se disporem em formas circulares (neovasos).

Estes resultados sugerem que, nesta fase de diferenciação, as células endoteliais e musculares lisas vasculares em co-cultura apresentam uma morfologia típica, muitas vezes distinta, mas nem sempre fácil de observar ao microscópio na ausência de marcadores específicos. Por se tratar de um estudo preliminar, a caracterização imunofenotípica destas células carece de um maior número de quantificações, principalmente porque a marcação para o PECAM-1/CD31 não foi consistente em todos os ensaios. Por este motivo, optou-se por recorrer sistematicamente à marcação com SMA nos ensaios de imunocitoquímica; face aos resultados apresentados, considerou-se que as células SMA positivas seriam do tipo muscular, enquanto as células negativas para a marcação contra SMA seriam do tipo endotelial.

Devido às dificuldades na diferenciação morfológica destes dois tipos celulares em culturas de células viáveis para estudos funcionais, tentou-se neste trabalho encontrar uma alternativa à diferenciação imunofenotípica. Para tal, recorreu-se a um método baseado na resposta diferencial das células musculares e endoteliais marcadas com uma sonda fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-4NW, por microscopia confocal funcional.

Os recetores adrenérgicos  $\alpha_1$  são uma família de recetores acoplados à proteína G que, quando ativados, promovem o aumento dos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  pela ativação de vias de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intra e extracelulares. Estes recetores estão presentes no músculo liso vascular (Vargas & Gorman, 1995). Ao ativar os recetores  $\alpha_1$  das fibras musculares lisas, a PE induz o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  estimulando a contração muscular (Thiele et al., 2011). Como as células endoteliais são pobres em recetores deste tipo, é de presumir que estas respondam de forma diferencial à PE.

O ATP tem a capacidade de induzir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana celular por intermédio de canais iónicos ativado por recetores P2X, principalmente em células excitáveis (e.g. células musculares). O ATP também tem a capacidade de ativar a libertação deste catião a partir das reservas intracelulares, por ativação de recetores metabotrópicos P2Y em células com elevada resistência à despolarização, como as células do endotélio vascular. A elevação dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  no endotélio vascular pode promover a síntese e libertação de substâncias vasoativas (como o NO e a prostaciclina), conduzindo à vasodilatação (Calvert et al., 2008). Assim, a avaliação da cinética de ativação / dessensibilização dos recetores P2 nas células endoteliais e musculares do TCR, a par da resposta muscular induzida pelo agonista  $\alpha_1$ , poderão constituir a base do método proposto para a identificação e caracterização das duas populações celulares, mantendo a sua viabilidade funcional.

Os resultados mostram que as células endoteliais reagem ao ATP (100  $\mu\text{M}$ ) através de um aumento rápido, embora transitório, dos níveis intracelulares de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este padrão de resposta foi diferente do aumento sustentado e de pequena amplitude que as células musculares exibem em resposta ao ATP (100  $\mu\text{M}$ ) (Figura IX). Contrariamente às células endoteliais, as células musculares lisas exibem uma resposta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  consistente e sustentada quando incubadas com o agonista dos recetores  $\alpha_1$  adrenérgicos, PE (10  $\mu\text{M}$ ) (Figura IX).

Sabe-se que as células endoteliais expressam recetores P2Y para o ATP, cuja ativação estimula a atividade da fosfolipase C, gerando DAG e  $\text{IP}_3$ . Por sua vez, o  $\text{IP}_3$  promove a libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático para o citosol (Pearson et al., 1983; Palmer et al., 1998). O resultado funcional do aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células endoteliais é promovido pela ativação da eNOS, através da interação da  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina com o domínio de ligação  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina da eNOS (Michel et al.,

1997; Marrero et al., 1999). A síntese, e subsequente libertação de NO, desencadeiam o relaxamento das fibras musculares lisas dos corpos cavernosos penianos e, conseqüente ereção. Observando as repostas ao ATP nas duas populações celulares isoladas do TCR pode concluir-se que os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  resultantes foram superiores nas células endoteliais relativamente às células musculares lisas.

Estudos funcionais em TCH realizados no nosso laboratório sugerem que recetores  $A_{2A}$  da adenosina são expressos em células musculares lisas, interferindo no mecanismo de relaxamento muscular. Já os recetores  $A_{2B}$  localizam-se, aparentemente, nas células endoteliais. Considerando estes resultados, surgiu o interesse de avaliar a expressão e distribuição regional dos recetores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  em células de TCR. Para tal, realizaram-se ensaios de imunocitoquímica, em cultura de células isolada de TCR controlo, recorrendo a marcação diferencial de modo a identificar a presença destes recetores em células musculares lisas, co-localizadas com  $\alpha$ -actina e em células endoteliais, que não expressam marcação anti-SMA-FITC. As células de TCR em cultura exibem imunorreatividade positiva contra recetor  $A_{2A}$ , tanto em células musculares lisas (positivas para SMA) como em células negativas para o marcador SMA, que apresentam uma morfologia semelhante às células endoteliais (Figura X). A presença de recetores  $A_{2A}$  nas células musculares lisas vai de encontro aos resultados funcionais obtidos em TCH, justificando a preponderância deste recetor no mecanismo de relaxamento do tecido cavernoso. A expressão dos recetores  $A_{2A}$  em células endoteliais isoladas de TCR justifica o facto do efeito relaxante do agonista seletivo destes recetores, CGS21680C, depender da libertação de NO e prostanóides a partir do endotélio vascular neste modelo animal (Valente, 2008; Viais, 2011).

De forma semelhante, pode verificar-se através das imagens obtidas (Figura X) que os recetores  $A_{2B}$  não estão expressos em ambos os tipos celulares de TCR. Estes resultados são contrários aos estudos funcionais verificados em TCH; neste tecido estes recetores parecem estar presentes nas células endoteliais. A disparidade dos resultados reforça a hipótese de que o mecanismo envolvido na ereção do modelo animal estudado pode não ser exatamente o mesmo da resposta erétil humana. Esta hipótese é também apoiada por estudos anteriores realizados no nosso laboratório que sugerem que o efeito da adenosina, no relaxamento do TCR é menos pronunciado em ratazanas, quando comparando com o registado no humano (Valente, 2008; Viais, 2011). No entanto, serão necessários mais ensaios para confirmar estes resultados.

Está descrito que os recetores P2X1 são responsáveis por respostas vasoconstritoras, como consequência de liberação de ATP a partir de nervos perivasculares simpáticos (Burnstock, 1986; Gur et al., 2009). No entanto pouco se sabe relativamente aos mecanismos envolvidos na vasoconstrição mediada P2X. Para avaliar a presença de recetores do tipo P2X1 e P2X3 em células musculares lisas e em células endoteliais de TCR controlo, realizaram-se ensaios de imunofluorescência indireta utilizando marcadores específicos (Figura XI). Os ensaios de imunolocalização revelaram a presença de recetores P2X1 tanto nas células musculares lisas como nas células endoteliais, embora nas últimas a densidade destes recetores seja menor. Os ensaios de imunolocalização revelaram a presença de recetores P2X3 tanto em células que expressam imunorreatividade contra o marcador anti-msSMA-FITC (músculo liso) como em células em que a marcação para a  $\alpha$ -actina foi negativa (células endoteliais) (Figura XI).

A expressão de recetores P2X1 nas células musculares lisas do tecido cavernoso justifica a sua implicação no processo de detumescência (Lee et al., 2000; Lewis & Evans, 2000; Wang et al, 2002); a identificação de recetores P2X1 em células endoteliais, embora rara também já foi verificada (Ray et al., 2002; Harrington & Mitchell, 2004 Gur et al., 2009). Contrariamente aos dados relativos aos recetores P2X1, pouco se sabe sobre o envolvimento de recetores P2X3 na ereção. Os resultados obtidos neste estudo mostraram uma marcação mais exuberante dos recetores P2X3, comparativamente aos recetores P2X1 em células isoladas de TCR. Estas diferenças podem justificar o envolvimento preferencial dos recetores P2X3 na atividade contráctil do tecido cavernoso de ratazana (dados não mostrados) e reforçam as diferenças existentes entre o funcionamento do tecido cavernoso de ratazana e o humano.

Neste estudo, avaliou-se o envolvimento dos recetores P2X1 e P2X3 na regulação dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  recorrendo a antagonistas seletivos. Nas células musculares lisas, o efeito do ATP (300  $\mu$ M) foi atenuado pelos antagonistas seletivos dos recetores P2X1 e P2X3, respetivamente NF 023 (3  $\mu$ M) e A 317491 (100 nM). O mesmo não se passou nas células endoteliais, onde apenas o antagonista dos recetores P2X3 teve um efeito de atenuação significativa da resposta do ATP, enquanto o NF 023 foi inoperante (Figura XII). O antagonista seletivo dos recetores P2X3, A 317491 (100 nM) atenuou ( $P < 0.05$ ) as oscilações intracelulares do  $[Ca^{2+}]_i$  produzidas pelo ATP (300  $\mu$ M) tanto nas células musculares lisas como nas células endoteliais isoladas do TCR (Figura XII). Estes

resultados confirmam a presença de recetores P2X3 funcionantes em ambos os tipos celulares, tal como foram observados por imunocitoquímica (Figura XI).

Resultados anteriores mostraram que a ativação de recetores P2X3, mas também P2X1, pelo ATP contraria parcialmente o efeito relaxante do nucleótido no TCR, apoiando os dados obtidos nas experiências onde se demonstrou que o ATP favorece a acumulação de  $[Ca^{2+}]_i$  nas células musculares lisas em cultura por intermédio da estimulação de recetores ionotrópicos P2X1 e P2X3. Permanece por explicar a repercussão sobre o funcionamento do tecido cavernoso resultante dos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ATP, por via da ativação de recetores P2X3 nas células endoteliais isoladas do TCR. Em estudos anteriores do nosso grupo (Faria et al., 2012, Soc. Port. Farmacologia), demonstrou-se que o ATP induz uma resposta contráctil transitória no tecido cavernoso humano através da ativação de recetores P2X1 que leva à libertação endotelial de prostanóides, nomeadamente  $TXA_2$ , capazes de estimular recetores TP no músculo liso vascular. O envolvimento de recetores ionotrópicos P2X3 no tecido cavernoso humano carece de investigação, no entanto ensaios preliminares realizados no nosso laboratório em TCH não incluem a influência do P2X3 neste mecanismo.

De forma análoga, para avaliar a expressão de recetores metabotrópicos P2Y envolvidos na atividade das células musculares lisas e endoteliais do TCR recorreu-se a ensaios de imunofluorescência indireta. Os resultados mostram que as células musculares lisas (SMA positivas), bem como as células (endoteliais) negativas para o marcador muscular, expressam recetores dos subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> sensíveis ao ADP; embora se verifique uma marcação mais intensa nas células endoteliais (Figura XIII). Estes resultados complementam os dados publicados em estudos anteriores demonstrando a presença de recetores P2Y<sub>1</sub> tanto em células endoteliais como em células musculares lisas do TCR (Gur et al., 2009). Os resultados do estudo da dinâmica de  $[Ca^{2+}]_i$  nas células musculares e endoteliais do TCR em co-cultura comprovam que todos estes recetores se encontram funcionantes. À semelhança do ATP, a incubação das células com ADP (300  $\mu$ M) causou aumentos dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  tanto nas células musculares lisas (aumento ligeiro mas sustentado) como nas células endoteliais (aumento rápido de maior amplitude, mas transitório). Em qualquer dos tipos celulares, os aumentos do  $[Ca^{2+}]_i$  induzidos pelo ADP (300  $\mu$ M) foram atenuados pelos antagonistas seletivos dos recetores P2Y<sub>1</sub> (MRS 2179, 0,3  $\mu$ M), P2Y<sub>12</sub> (AR-C66096, 0,1  $\mu$ M) e P2Y<sub>13</sub> (MRS 2211, 10  $\mu$ M) (Figura XIV). Também no tecido cavernoso humano, o bloqueio dos recetores P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> atenuou a

resposta contráctil do ADP, embora esta não tenha sido modificada na presença do antagonista seletivo P2Y<sub>1</sub>, MRS 2179 (0,3 µM) (Faria et al., 2012, Soc. Port. Farmacologia). Estudos demonstram a expressão do recetor P2Y<sub>12</sub> em plaquetas e referem que este recetor também pode ser expresso em células endoteliais dos capilares cerebrais e em células do músculo liso vascular contribuindo para a vasoconstrição (Wihlborg et al., 2004). No entanto, o papel preciso do recetor P2Y<sub>12</sub> nesses locais ainda está sob investigação (Marteau et al., 2003).

Aparentemente, tanto no homem (Faria et al., 2012) como na ratazana (Govindan et al., 2010), os recetores P2Y<sub>1</sub> estão predominantemente envolvidos no relaxamento do tecido cavernoso, que é subsequente à libertação de fatores relaxantes derivados do endotélio (Ralevic & Burnstock, 1998). O efeito relaxante produzido pela ativação de recetores P2Y<sub>1</sub> parece tornar-se mais evidente em doentes diabéticos com DE vasculogénica (Faria et al., 2008), uma situação em que as ações dos outros dois recetores sensíveis ao ADP, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub>, se encontram atenuadas. Se o aumento dos níveis de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> produzido pela ativação de recetores P2Y<sub>1</sub> nas células endoteliais pode explicar facilmente a libertação de fatores relaxantes derivados do endotélio, como o NO por indução da NOS, já não é tão fácil compatibilizar a acumulação intracelular de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nas células musculares lisas com o efeito relaxante do tecido cavernoso produzido pela ativação deste recetor.

## **Conclusão**

Ao longo deste trabalho foi possível estabelecer um protocolo simples e eficaz para obtenção de culturas primárias de células de TCR. Este trabalho sugere alterações aos protocolos experimentais existentes na literatura que nos parecem fundamentais para garantir o sucesso do isolamento e viabilidade das células de TCR. Recorrendo a técnica de imunofluorescência indireta foi, ainda, possível caracterizar fenotipicamente as células isoladas do TCR, o que permitiu confirmar a presença de células musculares lisas e endoteliais nas co-culturas isoladas deste tecido. Isto é, encontraram-se células imunorreativas contra a proteína contrátil  $\alpha$ -actina, marcador específico de células musculares lisas, e células que marcam positivamente com o anticorpo anti-PECAM-1/CD31, marcador específico de células endoteliais. Para além da marcação imunofenotípica, estas células apresentam morfologias características. Constatámos que as células musculares lisas apresentam maiores dimensões, inúmeros filamentos de actina e exibiam um padrão citoplasmático estriado, característico das fibras musculares, enquanto as células endoteliais apresentam menor tamanho, forma fusiforme evoluindo para polidédrica e um padrão citoplasmático pontilhado.

Paralelamente estabeleceu-se um protocolo experimental para diferenciar funcionalmente estas células em co-cultura mantendo a sua viabilidade. Para tal, avaliámos a dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em célula única, por microscopia confocal com sonda fluorescente, em resposta a agonistas específicos. As células com características morfológicas das células musculares lisas reagiram à PE (10  $\mu\text{M}$ ) com uma elevação sustentada dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ ; estas células responderam muito pouco à perfusão com ATP (100  $\mu\text{M}$ ). Já as células com características morfológicas das células endoteliais (PECAM-1/CD31<sup>+</sup> e SMA<sup>-</sup>) responderam de forma vigorosa à aplicação de ATP (100  $\mu\text{M}$ ), sendo notável um aumento significativo dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto a aplicação de PE (10  $\mu\text{M}$ ) não alterou significativamente a fluorescência basal. Este método permite, assim, diferenciar funcionalmente as células musculares das células endoteliais em tempo real e sem que estas percam a viabilidade para ensaios visando a sua caracterização da sua atividade.

Este trabalho revelou-se importante na avaliação da atividade dos recetores purinérgicos em co-culturas de células musculares e endoteliais do TCR, visando a sua utilização como modelo para o estudo da disfunção erétil vasculogénica. Mostrámos que os recetores  $A_{2A}$  da adenosina parecem estar localizados tanto nas células musculares lisas como em células endoteliais, e que os recetores  $A_{2B}$  não são expressos nestas células,

justificando a ação predominante dos primeiros no relaxamento do TCR. Parece existir, contudo, uma discrepância entre a expressão / localização destes dois subtipos de recetores no tecido cavernoso humano e de ratazana, já que no homem os recetores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  parecem estar localizados respetivamente nas fibras musculares e no endotélio vascular enquanto na ratazana o papel dos recetores  $A_{2A}$  parece predominar nas duas células e os  $A_{2B}$  não se expressam neste modelo animal.

O tecido cavernoso humano e de ratazana também parecem diferir no que respeita à expressão funcional dos dois recetores ionotrópicos  $P2X_1$  e  $P2X_3$ . Enquanto o recetor responsável pelo efeito contracturante do ATP no homem parece ser o recetor  $P2X_1$ , esse predomínio é repartido na ratazana com os recetores  $P2X_3$ . Relativamente aos recetores metabotrópicos  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{12}$  e  $P2Y_{13}$  sensíveis ao ADP, a sua expressão e atividade sobre os níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  foi confirmada tanto nas células musculares como nas células endoteliais. Enquanto os recetores  $P2Y_{12}$  e  $P2Y_{13}$  parecem exercer um efeito duplo (contracturante e relaxante) no tecido cavernoso humano e de ratazana, os recetores  $P2Y_1$  possuem um efeito relaxante preferencial, sobretudo no homem, que não pode ser explicado facilmente pelas variações intracelulares dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$ .

## **Referências Bibliográficas**

Abbraccio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A. & Weisman, G.A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, **58** (3), 281-341.

Amorim, R. (2009). Mecanismos envolvidos no relaxamento do tecido cavernoso induzido por purinas: Será a ratazana um bom modelo animal para o estudo da disfunção erétil humana?. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica*.

Andersson, K.E. & Holmquist, F. (1990). Mechanisms for contraction and relaxation of human penile smooth muscle. *Int J Impot Res*, **2**, 209–225.

Andersson, K.E. (2001). Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev*, **53** (3), 417–450.

Angulo, J., González-Corrochano, R., Cuevas, P., Fernández, A., La Fuente, J.M., Rolo, F., Allona, A. & Sáenz de Tejada, I. (2010). Diabetes exacerbates the functional deficiency of NO/cGMP pathway associated with erectile dysfunction in human corpus cavernosum and penile arteries. *J Sex Med*, **7** (2), 758-768.

Arcuino, G., Lin, J.H.C., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J. & Nedergaard, M. (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** (15), 9840-9845.

Argiolas, A. & Melis, M.R. (2005). Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Prog Neurobiol*, **76**, 1- 21.

Barrow, S.L., Sherwood, M.W., Dolman, N.J., Gerasimenko, O.V., Voronina, S.G. & Tepikin, A.V. (2006). Movement of calcium signals and calcium-binding proteins: firewalls, traps and tunnels. *Biochem Soc Trans*, **34**, 381-384.

Becker, A.J., Uckert, S., Stief, C.G., Truss, M.C., Machtens, S., Scheller, F., Knapp, W.H., Hartmann, U. & Jonas, U. (2001). Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology*, **57** (1), 193-198.

Bernas, M.J., Cardoso, F.L., Daley, S.K., Weinand, M.E., Campos, A.R., Ferreira, A.J., Hoying, J.B., Witte, M.H., Brites, D., Persidsky, Y., Ramirez, S.H. & Brito, M.A. (2010). Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an *in vitro* cellular model of the blood-brain barrier. *Nat Protoc*, **5** (7), 1265–1272.

Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4** (7), 517-529.

Burnett, A.L. (1995). Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod*, **52**(3), 485-489.

Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, **147**, 172–181.

Burnstock, G. (2007a). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, **87**, 659 -797.

Burnstock, G. 2007b. Purine and Pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci*, **64** (12), 1471-1483.

Burnstock, G. (2010). Control of vascular tone by purines and pyrimidines. *British Journal of Pharmacology*, **161** (3), 527–529.

Calvert, R.C., Khan, M.A., Thompson, C.S., Mikhailidis, D.P. & Burnstock, G. (2008). A functional study of purinergic signalling in the normal and pathological rabbit corpus cavernosum. *BJU international*, **101** (8), 1043 – 1047.

- Chitale, K. (2009). Type 1 and type 2 diabetic-erectile dysfunction: same diagnosis (ICD-9), different disease?. *Journal of Sexual Medicine*, **6** (3), 262-268.
- Choi, J., & Husain, M. (2006). Calmodulin-mediated cell cycle regulation: new mechanisms for old observations. *Cell Cycle*, **5** (19), 2183-2186.
- Chung, H., Jung, S.H., Ryu, J.K., Kim, B., Kim, H.S., Yang, S.K. (2012). Isolation and Characterization of Smooth Muscle Cells from Rat Corpus Cavernosum Tissue for the Study of Erectile Dysfunction. *Korean Journal of Urology*, **53** (8), 556-563.
- Christ, G.J., Lerner, S.E., Kim, D.C. & Melman, A. (1995). Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I. Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *Journal of Urology*, **153** (6), 1998-2003.
- Coelho, M.F. & Santos, P.B. (2011). Erectile dysfunction of vascular cause. *Acta Med Port*, **24** (2), 379-382.
- Colgan, S.P., Eltzsching, H.K., Eckle, T. & Thompson, L.F. (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*, **2** (2), 351-360.
- Craig, R. & Woodhead, J.L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Curr Opin Struct Biol*, **16** (2), 204-212.
- Cunha, R.A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*, **38** (2), 107-125.
- Dean, R.C. & Lue, T.F. (2005). Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urol Clin North Am*, **32** (4), 379-395.
- Dimitriadis, F., Giannakis, D., Pardalidis, N., Zikopoulos, K., Paraskevidis, E., Giotitsas, N., *Et al.* (2008). Effects Of phosphodiesterase 5 Inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian Journal Of Andrology*, **10** (1), 115-133.
- Dias, J.S. (2006). Disfunção erétil: não sofra em silêncio. *Revista Saúde Pública*, **52** (3).
- Doyle, C., Sergeant, G.P., Hollywood, M.A., McHale, M.G. & Thornbury, K.D. (2012) Effects of Phenylephrine on Spontaneous Activity and L-Type Ca<sup>2+</sup> Current in Isolated Corpus Cavernosum Myocytes". *J Sex Med*, **9** (11), 2795-2805.
- Episex-pt (2006). Sociedade Portuguesa De Andrologia - SPA, Com apoio da Pfizer.
- Fan, M., Qin, W. & Mustaf, S.J. (2003). Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **284**, 1012-1019.
- Faria, M., Magalhaes-Cardoso, T., Lafuente-de-Carvalho, J.M., & Correia-de-Sa, P. (2006). Corpus cavernosum from men with vasculogenic impotence is partially resistant to adenosine relaxation due to endothelial A(2B) receptor dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, **319** (1), 405-413.

- Faria, M., Magalhaes-Cardoso, T., Lafuente-de-Carvalho, J.M., & Correia-de-Sa, P. (2008). Decreased ecto-NTPDase1/CD39 activity leads to desensitization of P2 purinoceptors regulating tonus of corpora cavernosa in impotent men with endothelial dysfunction. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **27**, 761–768.
- Feldman, H.A., Goldstein, I., Hatzichristou, D.G., Krane, R.J. & McKinlay, J.B. (1994). Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, **151** (1), 54-61.
- Fox, I.H. & Kelley, W.N. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annual Review of Biochemistry*, **47**, 655-686.
- Francis, S.H., Busch, J.L. & Corbin, J.D. (2010). cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol Rev*, **62** (3), 525–563.
- Freshney, R.I. (2006). *Basic Principles of Cell Culture*. Jonh Wiley & Sons, Inc. I, 22.
- Furuya, K., Sokabe, M. & Furuya, S. (2005). Characteristics of subepithelial fibroblasts as a mechano-sensor in the intestine: cell-shape-dependent ATP release and P2Y1 signaling. *J Cell Sci*, **118**, 3289-3304.
- Giugliano, F., Maiorino, M., Bellastella, G., Gicchino, M., Giugliano, D. & Esposito, K. (2010). Determinants of erectile dysfunction in Type 2 diabetes. *Int J Impot Res*, **22** (3), 204-209.
- Govindan, S., Taylor, E.J. & Taylor, C.W. (2010). Ca(2+) signalling by P2Y receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, **160** (8), 1953-1962.
- Haskó, G. & Cronstein, B.N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. **25** (1), 33-39.
- Gratzke, C., Angulo, J., Chitale, K., Dai, Y.T., Kim, N.N., Paick, J.S., Simonsen, U., Uckert, S., Wespes, E., Andersson, K.E., Lue, T.F. & Stief, C.G. (2010). Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med*, **7** (1), 445–475.
- Guagnini, F., Ferazzini, M., Grasso, M., Blanco, S. & Croci, T. (2012). Erectile properties of the Rho-kinase inhibitor SAR407899 in diabetic animals and human isolated corpora cavernosa. *J Transl Med*, **10**, 59.
- Gur, S., Kadowitz, P.J., Abdel-Mageed, A.B., Kendirci, M., Sikka, S.C., Burnstock, G. & Hellstrom, W.J.G. (2009). Management of Erectile Function by Penile Purinergic P2 Receptors in the Diabetic Rat. *J Urology*, **181** (5), 2375-2382.
- Harrington, L.S. & Mitchell, J.A. (2004). Novel role for P2X receptor activation in endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol*, **143** (5), 611-617.
- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coecke, S., Gstraunthaller, G. & Lewis, D. (2002). Good Cell Culture Practice. *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, **30**, 407-414.

- Henriksen, Z., Hiken, J.F., Steinberg, T.H. & Jorgensen, N.R. (2006). The predominant mechanism of intercellular calcium wave propagation changes during long-term culture of human osteoblast-like cells. *Cell Calcium*, **39**, 435-444.
- Hsieh, C.H., Liu, S.P., Hsu, G.L., Chen, H.S., Molodysky, E., Chen, Y.H. & Yu, H.J. (2012). Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: Clinical implications for physicians and surgeons. *Med Sci Monit*, **18** (7), 118–125.
- Hsu, G.L., Hsieh, C.H., Wen, H.S., Hsu, W.L., Wu, C.H., Fong, T.H., Chen, S.C. & Tseng, G.F. (2004). Anatomy of the human penis: the relationship of the architecture between skeletal and smooth muscles. *J Androl*, **25** (3), 426-431.
- Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D. & Jameson, J.L. (2006). *Harrison - Medicina Interna, 16ª Edição*. edn. The MacGraw-Hill Companies.
- Kemp-Harper, B. & Schmidt, H.H. (2009). cGMP in the vasculature. *Handb Exp Pharmacol*, **191**, 447-467.
- Kilic, S., Salih, M., Anafarta, K., Baltaci, S. & Kosar, A. (1994). Adenosine: a new agent in the diagnosis of impotence. *Int J Impot Res*, **6**, 191-198.
- Lau, L.C. & Adaikan, P.G. (2006). Mechanisms of direct relaxant effect of sildenafil, tadalafil and vardenafil on corpus cavernosum. *European journal of pharmacology*, **541** (3), 184-90.
- Lee, H.Y., Bardini, M. & Burnstock, G. (2000). P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res*, **300** (2), 321–330.
- Lewis, C.J. & Evans, R.J. (2000). Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries. *J Auton Nerv Syst*, **81** (1-3), 69-74.
- Lippi, G., Plebani, M., Montagnana, M. & Cervellin, G. (2012). “Biochemical and genetic markers of erectile dysfunction”. *Adv Clin Chem*, **57**, 139-162.
- Lin, C.F., Juang, Y.Y., Wen, J.K., Liu, C.Y. & Hung, C.I. (2012). Correlations between Sexual Dysfunction, Depression, Anxiety, and Somatic Symptoms among Patients with Major Depressive Disorder. *Chang Gung Med J*, **35** (4), 323-331.
- Lohman, A.W., Billaud, M. & Isakson, B.E. (2012). Mechanisms of ATP release and signaling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res*, **95** (3), 269–280.
- Maas, R., Schwedhelm, E., Albsmeier, J. & Boger, R.H. (2002). The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med*, **7**(3), 213-225.
- Gil, V.M.M. (2010). Disfunção Eréctil, Diabetes e Risco Cardiovascular. *Revista Factores de Risco*, **17**, 86-88.

- Mantelli, L., Amerini, S., Ledda, F., Forti, G. & Maggi, M. (1995). The Potent Relaxant Effect of Adenosine in Rabbit Corpora Cavernosa Is Nitric-Oxide Independent and Mediated by  $\alpha_2$  Receptors. *Journal of Andrology*, **16** (4), 312-317.
- Marrero, M.B., Venema, V.J., Ju, H., He, H., Liang, H., Caldwell, R.B. & Venema, R.C. (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, **343** (2), 335-340.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.M. & Gonzalez, N.S. (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>13</sub> receptor. *Mol Pharmacol*, **64** (1), 104-112.
- Martínez-Jabaloyas, J.M. (2013). Prevalence of Co-Morbidities in Patients With Erectile Dysfunction. *Actas Urol Esp*, **37** (1), 33-39.
- Martinez-Salamanca, J.I., Martinez-Ballesteros, C., Portillo, L., Gabancho, S., Moncada, I. & Carballido, J. (2010). Physiology of erection. *Arch Esp Urol*. **63** (8), 581-588.
- Mas M. (2010). "Molecular mechanisms of penile erection. *Arch Esp Urol*. **63** (8), 589-598.
- Meena, B.L., Kochar, D.K., Agarwal, T.D., Choudhary, R. & Kochar A. (2009). Association between erectile dysfunction and cardiovascular risk in individuals with type-2 diabetes without overt cardiovascular disease. *Int J Diabetes Dev Ctries*, **29** (4), 150-154.
- Mehlin, C., Crittenden, C. & Andreyka, J. (2003). No-wash dyes for calcium flux measurement. *Biotechniques*, **34** (1), 164-166.
- Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D. & Michel, T. (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*, **272** (25), 15583-15586.
- Morelli, A., Filippi, S., Zhang, X.H., Luconi, M., Vignozzi, L., Mancina, R. & Maggi, M. (2005). Peripheral regulatory mechanisms in erection. *Int J Androl*, **28** (2), 23-27.
- Moro, S., Gao, Z.G., Jacobson, K.A. & Spalluto, G. (2006). Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists. *Med Res Rev*, **26**, 131-159.
- Musicki, B. & Burnett, A.L. (2006). eNOS function and dysfunction in the pénis. *Exp Biol Med (Maywood)*, **231** (2), 154-165.
- Naeinian, M.R., Shaeiri, M.R. & Hosseini, F.S. (2011). General Health and Quality of Life in Patients With Sexual Dysfunction. *Urol J*, **8** (2), 127-131.
- Noronha-Matos, J.B., Costa, M.A., Magalhães-Cardoso, M.T., Ferreirinha, F., Pelletier, J., Freitas, R., Neves, J.M., Sévigny, J., Correia-de-Sá, P. (2012). Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y<sub>6</sub> receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women. *J Cell Physiol*, **227** (6), 2694-2709.

- Palmer, R.K., Boyer, J.L., Schachter, J.B., Nicholas, R.A. & Harden, T.K. (1998). Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol*, **54** (6), 1118-1123.
- Pearson, J.D., Slakey L.L., & Gorden, J.L.(1983). Stimulation of endothelial prostacyclin production plays no role in endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. *Br. J. Pharmac*, **80** (1), 179-186.
- Pilatz, A., Schultheiss, D., Gabouev, A.I., Schlote, N., Mertsching, H., Jonas, U. & Stief, C.G. (2005). Isolation of Primary Endothelial and Stromal Cell Cultures of the Corpus Cavernosum Penis for Basic Research and Tissue Engineering. *European Urology*, **47** (5), 710–719.
- Priviero, F.B.M., Leite, R., Webb, R.C. & Teixeira, C.E. (2007). Neurophysiological basis of penile erection. *Acta Pharmacol Sin*, **28** (6), 751–755.
- Privratsky, J. R., Newman, D.K. & Newman, P.J. (2010). PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci*, **87** (3-4), 69-82.
- Qiu, X., Villalta, J., Lin, G. & Lue, T.F. (2012). Role of Hydrogen Sulfide in the Physiology of Penile Erection. *J Androl*, **33** (4), 529–535.
- Ralevic, V. & Burnstock, G. (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, **50** (3), 413-492.
- Raqeeb, A., Sheng, J., Ao, N. & Braun, A.P. (2011). Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid Ca<sup>2+</sup> mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells. *Cell Calcium*, **49** (4), 240–248.
- Ray, F.R., Huang, W., Slater, M. & Barden, J.A. (2002). Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis*, **162** (1), 55–61.
- Romeo, J.H., Seffel, A.D., Madhum, Z.T & Aron, D.C. (2000). Sexual function in men with diabetes type 2 association with glycemic control. *J Urol*, **163**, 788–91.
- Ryan, J.A. (2008). Introduction to Animal Cell Culture. Technical Bulletin. *Corning Incorporated*.
- Sáenz de Tejada. (2002). Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility?. *Int J Impot Res*, **14** (1), 6–10.
- Sáenz de Tejada, I., Angulo, J., Cellek, S., Gonzalez-Cadavid, N., Heaton, J., Pickard, R. & Simonsen, U. (2004). Physiology of erectile function, *J Sex Med*. **1** (3), 254-265.
- Schiel, R & Muller, U.A. (1999). Prevalence of sexual disorders in a selection-free diabetic population (JEVIN). *Diabetes Res Clin Pract*, **44** (2), 115-121.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D & Tate, P. (2004). *Anatomy and Physiology*. 6th Edition; edn. *The MacGraw-Hill Companies*, 1017.

Shabsigh, R., Kaufman, J., Magee, M., Creanga, D., Russell, D & Budhwani, M. (2010). Lack of awareness of erectile dysfunction in many men with risk factors for erectile dysfunction. *BMC Urol*, **10**, 18.

Shryock, J.C. & Belardinelli, L. (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* **79** (12), 2-10.

Shukla, N., Rossoni, G., Hotston, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., Tazzari, V., Persad, R., Angelini, G.D & Jeremy, J.Y. (2009). "Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats". *BJU Int*, **103** (11), 1522-1529.

Song, Y., Meht, N., Sheh, B., Saljooque, F., Sang, U.H. & Rajasekaran, M. 2008. Transdifferentiation of rat fetal brain stem cells into penile smooth muscle cells. *BJU International*, **104** (2), 257-262.

Sparks, H.V & Bardenheuer, H. (1986). Regulation of adenosine formation by the heart. *Circ Res*, **58**, 193-201.

Stone, T.W. (1985). *Purines: Phaemacology and Physiological Roles*, London, MacMillan,

Stout. C., Goodenough, D.A. & Paul, D.L. (2004). Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 507-512.

Tanagho, E.A. & McAninch, J.W. (2004). *Smith's General Urology*. 16th ed. McGraw-Hill.

Thiele, R.H., Nemergut, E.C., & Lynch, C. (2011). The clinical implications of isolated alpha(1) adrenergic stimulation. *Anesth Analg*, **113** (2), 297-304.

Tong, Y.C., Broderick, G., Hypolite, .J & Levin, R.M. (1992). Correlations of purinergic, cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. *Pharmacology*, **45**, 241-249.

Valente, M.J. (2008). Papel dos receptores da adenosina e do endotélio vascular no relaxamento do tecido cavernoso do pénis de ratazana: Comparação com o homem. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica*.

Vargas, H.M. & Gorman, A.J. (1995). Vascular alpha-1 adrenergic receptor subtypes in the regulation of arterial pressure. *Life Sci*, **57** (25), 2291-2308.

Ventegodt, S. (1998). Sex and the quality of life in Denmark. *Arch Sex Behav*, **27** (3), 295-307.

Viais, R. (2011). Comparação dos efeitos da adenosina e de outros agentes relaxantes dependentes do endotélio no tecido cavernoso de ratazana e de humano. *Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica*.

Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgardh-Nilsson, A., Andersson, M., Bornha, C., Gudbjartsson ,T., Jern, S. & Erlinge, D. (2002). P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, **40**, 841-853.

Wagner, G. & Mulhall, J. (2001). Pathophysiology and diagnosis of male erectile dysfunction. *BJU International*, **88** (3), 3-10.

Watras, J.M. (2009). Músculo Liso. *Berne y Levy Fisiología*. 6ª Ed.

Wihlborg, A.K., Wang, L., Braun, O.O., Eijolfsson, A., Gustafsson, R., Gudbjartsson, T. & Erlinge, D. (2004). ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **24** (10), 1810-1815.

Yiee, J.H. & Baskin, L.S. (2010). Penile Embryology and Anatomy. *The Scientific World Journal*, **10**, 1174–1179.

Yin, G.N., Ryu, J.K., Kwon, M.H., Shin, S.H., Jin, H.R., Song, K.M., Choi, M.J., Kang, D.Y., Kim, W.J. & Suh, J.K. (2012). Matrigel-Based Sprouting Endothelial Cell Culture System from Mouse Corpus Cavernosum Is Potentially Useful for the Study of Endothelial and Erectile Dysfunction Related to High-Glucose Exposure. *J Sex Med*, **9** (7), 1760–1772.

Zhang, X.H., Melman, A & Disanto, M.E. (2011). Update on corpus cavernosum smooth muscle contractile pathways in erectile function: a role for testosterone?. *J Sex Med*, **8** (7), 1865–1879.