

Alteração da expressão de genes angiogénicos em tecido erétil diabético – em busca de novos alvos terapêuticos

Angiogenic gene alterations in diabetic erectile tissue – searching for new therapeutic targets

Autores

Ângela Castela^{1,2,6}, Raquel Soares², Rui Medeiros³, Ricardo Ribeiro³, Cátia Monteiro³, Pedro Vendeira⁴, Ronald Virag⁵ e Carla Costa^{2,6}

Instituições

¹ Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto (IBMC-UP)
² Departamento de Bioquímica (U38/FCT), Centro de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
³ Grupo de Oncologia Molecular, Instituto Português de Oncologia
⁴ Clínica Saúde Atlântica, Clínica Urológica Vendeira
⁵ Centre d'Exploration et Traitement de l'impuissance (CETI), Paris, França
⁶ Departamento de Biologia Experimental, Centro de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Correspondência

Carla Costa
 Departamento de Biologia Experimental – Departamento de Bioquímica (U38/FCT) – Centro de Investigação Médica – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
 Rua Dr. Plácido Costa – 4200-450 PORTO – Portugal
 E-mail: carcosta@med.up.pt

Data de Submissão: 10 de maio de 2012 | Data de Aceitação: 12 de dezembro de 2012

Resumo

Objetivos: A diabetes é um importante fator de risco vascular associado ao desenvolvimento e progressão da disfunção erétil (DE). Nos indivíduos diabéticos, a DE encontra-se associada a alterações na funcionalidade da vasculatura peniana. No entanto, permanecem por esclarecer quais os mecanismos moleculares envolvidos em alterações da função endotelial no corpo cavernoso (CC) diabético. Desta forma, pretendemos investigar se existem diferenças na expressão de genes angiogénicos em tecido cavernoso experimental de diabetes tipo 1 (DT1), potencialmente envolvidos na vasculopatia diabética e na insuficiência dos mecanismos de ereção.

Material e Métodos: A expressão diferencial de genes angiogénicos foi realizada em CC de ratos Wistar com DT1 (n= 5/grupo), numa fase precoce (2 semanas) e estabelecida (8 semanas) da doença e em controlos emparelhados pela idade. A avaliação molecular foi efetuada pelo sistema de *microarrays*, *Rat Angiogenesis OligoGEArray System (SuperArray, EUA)* e validada para genes selecionados por PCR quantitativo em tempo real (qrt-PCR).

Resultados: Os nossos resultados demonstraram que às 2 semanas de diabetes não existiam alterações na expressão de genes angiogénicos no CC entre os grupos controlo e diabético. Às 8 semanas, foram identificados vários genes sub-expressos em tecido cavernoso diabético, envolvidos em: atividade de quimiocinas; atividade da guanilato ciclase/biossíntese do monofosfato cíclico de guanosina; e diretamente em mecanismos angiogénicos. Os resultados foram validados por qrt-PCR para os genes do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Igf1*) e para o recetor do peptídeo natriurético 1 (*Npr1*).

Conclusões: A análise por *microarrays* identificou moléculas angiogénicas diferencialmente expressas em tecido cavernoso diabético, numa fase tardia da doença. Entre elas, o *Igf1* e o *Npr1* encontravam-se significativamente sub-expressos, e devido às suas relevantes funções na homeostasia vascular peniana e em mecanismos de vaso-relaxamento, deverão ser futuramente testados como potenciais alvos na prevenção/tratamento da DE diabética.

Palavras chave: Diabetes, disfunção erétil, angiogénese, *microarrays*, PCR quantitativo em tempo real

Abstract

Aims: Diabetes is an important vascular risk factor associated with the development and progression of erectile dysfunction (ED). Loss of erectile function in diabetic men involves alterations in the functionality of vascular endothelial cells lining the penile vasculature. However, the mechanisms impairing endothelial function in diabetic corpus cavernosum (CC) leading to ED have not been fully elucidated. We aim to investigate alterations in the expression of angiogenic genes in cavernosal tissue of an experimental model of type 1 diabetes (T1D), which can be potentially involved in diabetic vasculopathy and erectile insufficiency.

Material and Methods: The range of angiogenic molecular changes associated with ED in T1D, was assessed in penile tissue of streptozotocin (STZ)-induced male Wistar rats (n=5/group), in an early (2-week) and established stage (8-week) of diabetes. Differentially expressed genes were identified using the Rat Angiogenesis OligoGEArray System (SuperArray, EUA). Expression data was validated by quantitative real-time PCR (qrt-PCR).

Results: Our results demonstrated that in the early stage of diabetes there was no significant differential gene expression. However, between cavernosal tissue of control and of 8-week diabetic animals, we observed a downregulation in the expression of genes involved in chemokine activity, guanylate cyclase activity/cyclic guanosine monophosphate biosynthesis and directly in angiogenic mechanisms. Amongst the differentially expressed genes, the insulin-like growth factor-1 (Igf1) and the natriuretic peptide receptor-1 (Npr1) genes were further validated by qrt-PCR.

Conclusions: Microarray analysis provided evidence of several angiogenic molecules deregulated in cavernosal tissue in established diabetes. Amongst them, Igf1 and Npr1 differential expression were the most significant, and due to their relevant functions in penile vascular homeostasis and vasorelaxation activation, respectively, they might be a potential target for diabetic ED management.

Keywords: Diabetes, erectile dysfunction, angiogenesis, microarrays, quantitative real-time PCR

Introdução

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente de atingir e/ou manter uma ereção peniana suficiente para uma relação sexual satisfatória¹. Esta patologia afeta milhões de ho-

mens em todo o mundo, com um impacto negativo no seu bem-estar e na sua qualidade de vida, bem como no das suas parceiras. A diabetes está descrita como um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento e progressão da DE². De facto, estudos indicam que os diabéticos apresentam uma maior prevalência de DE, quando comparados com a população em geral, e que esta afeta cerca de 75% dos indivíduos diabéticos^{3,5}. A maioria dos doentes diabéticos não responde de forma tão eficiente às opções terapêuticas atualmente disponíveis, sendo os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 os mais amplamente utilizados, revelando-se crucial a necessidade de explorar terapias alternativas de prevenção e tratamento da DE associada à diabetes^{3,6}.

A condição de hiperglicemia é responsável por diversos desarranjos metabólicos e alteração do estado redox celular, promovendo ações deletérias características da diabetes, incluindo a neuropatia e a vasculopatia, a nível sistémico e cavernoso⁷. Apesar da etiologia da DE diabética ser multifatorial, está descrito que, desordens vasculares e disfunção endotelial desempenham um papel crucial na perda da função erétil^{8,9}. A disfunção endotelial, caracterizada por alterações na regulação normal da função e atividade biológica do endotélio, é responsável por condicionar os mecanismos de vasodilatação dependentes do endotélio e afetar o tónus da musculatura lisa, processos cruciais para a fisiologia normal da ereção¹⁰.

No entanto, permanecem por esclarecer quais os mecanismos angiogénicos que estão alterados e envolvidos na desregulação da integridade endotelial do tecido peniano diabético. Com o presente trabalho de investigação pretendeu-se avaliar alterações na expressão de genes angiogénicos em modelo experimental de diabetes tipo 1 (DT1). Com esta avaliação contribuiu-se para o conhecimento de vias moleculares angiogénicas envolvidas na vasculopatia da DE diabética, perspetivando futuras terapias para a DE associada à diabetes.

Material e Métodos

Elaboração de modelo animal de DT1

As experiências e manipulação animal foram conduzidas de acordo com as diretrizes éticas da Direção Geral de Veterinária (DGV) portuguesa na diretiva de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC), com a recomendação de 18 de Junho de 2007 proposta pelo Conselho das Comunidades Europeias. O estudo inclui ratos macho da estirpe Wistar (280-350g; Charles River Laboratories, Barcelona, Espanha) que foram mantidos em 12 horas de ciclos de luz/escuro com livre acesso a ração e a água. Num grupo de ratos induziu-se a DT1 por in-

jeção intraperitoneal de 50 mg/Kg de streptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal), dissolvida em tampão citrato 0.1 M a pH 4.5. A confirmação da diabetes foi efetuada por monitorização da glicemia (Accu-Check, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), sendo considerados diabéticos os animais que apresentavam níveis de glicose sanguínea superiores a 250 mg/dL. O grupo de ratos diabéticos foi posteriormente dividido em dois: um dos grupos foi sacrificado 2 semanas após injeção de STZ (grupo com diabetes inicial), o outro grupo sacrificado 8 semanas depois da administração de STZ (grupo com diabetes estabelecida). Como controlos, utilizaram-se dois grupos de ratos emparelhados pela idade, injetados apenas com tampão citrato. Efetuou-se a caracterização do modelo animal através da monitorização, do peso corporal e da pressão arterial sistólica. A pressão arterial foi medida usando o método de esfigmomanómetro de cauda (LE5001 Pressure Meter; PanLab, Barcelona, Espanha). Após o sacrifício, aos ratos de 2 e 8 semanas de diabetes e respetivos controlos, removeram-se os pénis que se conservaram a -80°C para posterior análise molecular.

Extração de ácido ribonucleico (ARN)

O ARN total do pénis foi extraído pelo método de TriPure (Roche Applied Science, Indianapolis, EUA). Para eliminação da contaminação com ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico utilizou-se o *kit* DNA-free™ (Ambion, Texas, EUA) seguido da purificação do ARN pelo *kit* RNeasy Mini (Qiagen, Califórnia, EUA). Procedeu-se posteriormente à quantificação e à determinação da pureza do ARN através da leitura espectrofotométrica da absorção a 260nm, 280nm e 230nm (NanoDrop™1000 Spectrophotometer; Thermo Scientific, Califórnia, EUA). A integridade do ARN foi analisada por eletroforese em gel de agarose desnaturante.

Análise por *microarrays*

A avaliação da expressão de genes angiogénicos em tecido erétil realizou-se pelo método de *microarrays*, usando o Rat Angiogenesis OligoGEArray® System (SuperArray, Maryland, EUA). As membranas do *kit* de *microarrays* continham um total de 128 sondas oligonucleotídicas que incluíam: 113 genes que codificam proteínas, direta ou indiretamente envolvidas em mecanismos angiogénicos, 3 referências negativas (brancos), 3 sequências artificiais, 7 genes de referência e 2 sequências artificiais pré-biotiniladas. Aproximadamente 3 µg de ARN total foram utilizados para gerar/amplificar cARN marcado com biotina (biotin-16-dUTP-cRNA) através do método TrueLabeling-AMP (SuperArray). As membranas OligoGEArray® foram pré-hibridizadas com a solução GEHyb, seguida de hi-

bridização com cARN biotilado (durante a noite a 60°C). As membranas foram depois incubadas com a enzima fosfatase alcalina conjugada com streptavidina, seguida da incubação com o substrato quimiluminiscente CDP-Start e posterior exposição a uma película específica de raio-X. As películas foram reveladas, procedeu-se à aquisição de imagem e posterior análise com o programa de *software* específico GEArray Analysis Software (SuperArray). Deste modo, os níveis de expressão relativa de cada gene foram determinados após a correção do *background*, subtração do valor global e normalização, ajustando os valores ao sinal de intensidade média do gene de referência gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*Gapdh*). A razão entre a expressão dos genes no tecido peniano diabético e controlo foi considerada significativa para valores abaixo de 1 e acima de 2. A avaliação por *microarrays* foi efetuada em duplicado para cada amostra em estudo.

PCR quantitativo em tempo real (qrt-PCR)

Procedeu-se à transcrição reversa do ARN total do pénis dos ratos de 8 semanas de diabetes e respetivos controlos em cADN com o *kit* SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Califórnia, EUA). Cada amostra de cADN (100ng/µl) foi usada em duplicado e procedeu-se à reação de amplificação por qrt-PCR utilizando o TaqMan® Gene Expression Master Mix e TaqMan® hydrolysis probes (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A partir da avaliação prévia por *microarrays* selecionaram-se dois genes alvo para validar por qrt-PCR: o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Igf1*) (assay_ID Rn99999087_ml) e o recetor do peptídeo natriurético 1 (*Npr1*) (assay_ID Rn00561678_ml). A amplificação foi efetuada no StepOne™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) num volume final de reação de 20µl com Gene Expression Master Mix 1x, sondas 250nM e primers 900nM, usando as seguintes condições: 1 ciclo, 50°C/2min; 1 ciclo, 95°C/10seg; 45 ciclos, 95°C/15seg e 60°C/1min. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo StepOne™ Software version 2.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Com este programa determinou-se para cada amostra os valores de *threshold cycle* (Ct). O método Ct comparativo foi usado para detetar a razão da expressão relativa dos genes, normalizados para os valores de Ct dos genes de referência, *Gapdh* (assay_ID Rn01775763_gl) e β-actina (*Actb*; assay_ID Rn00667869_ml) (TaqMan® Endogenous Controls; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). A expressão relativa de cada gene foi expressa como alteração relativa à amostra calibrador (média da expressão génica que corresponde aos valores do grupo controlo)¹¹. As alterações relativas na expressão dos genes em estudo foram calculadas pelo mé-

tudo $2^{-\Delta\Delta CT}^{12}$. As amostras foram preparadas e analisadas em paralelo, incluindo controlos negativos em todas as reações de amplificação.

Resultados

Monitorização do peso corporal e da tensão arterial sistólica do modelo animal de DT1

Foram incluídos no trabalho experimental, 10 ratos em cada grupo estudado para todas as metodologias experimentais.

De forma a caracterizar o modelo experimental de DT1, monitorizaram-se os seguintes parâmetros: o peso corporal e a tensão arterial sistólica (figura 1). Os resultados revelaram que a condição de diabetes induziu uma alteração significativa tanto no peso corporal como nos valores da tensão arterial sistólica no modelo experimental. Com o decorrer das 8 semanas de estudo, verificou-se que os animais diabéticos ganharam significativamente menos peso que os animais controlo. Na última semana do estudo os ratos diabéticos pesavam $275.2 \pm 14.6g$ (média \pm erro padrão - EP) em oposição aos ratos não diabéticos que apresentavam um peso de $341.8 \pm 6.7g$ ($p < 0.001$) (figura 1A). Relativamente à pressão arterial sistólica, registou-se um aumento significativo deste parâmetro nos animais diabéticos comparativamente aos controlos.

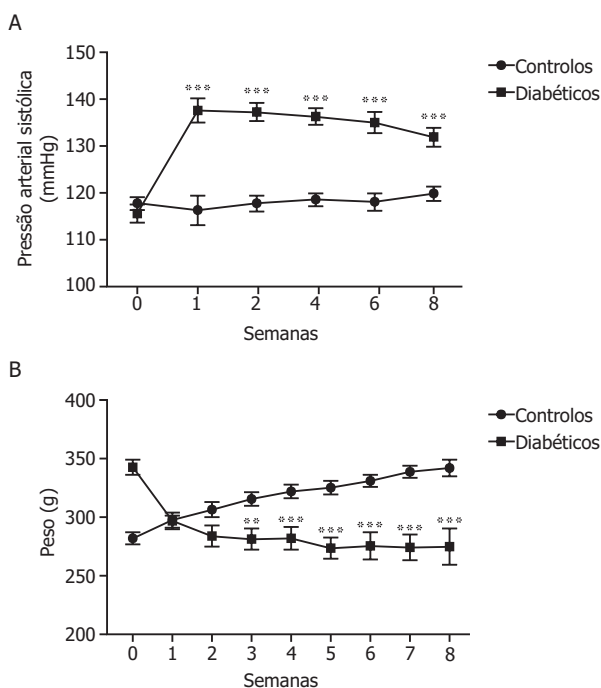


Figura 1 – Monitorização do peso corporal e da pressão arterial sistólica nos ratos diabéticos e respectivos controlos. A) Durante o decurso da experiência os animais diabéticos perderam significativamente mais peso do que os ratos controlos. B) Os ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo da pressão arterial sistólica ao longo do tempo, comparativamente aos animais controlos. Dados apresentados como Média \pm Erro padrão (EP); *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

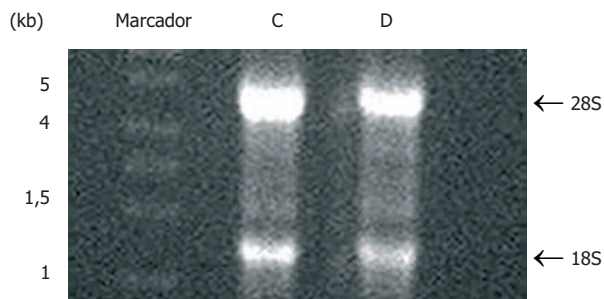


Figura 2 – Avaliação da integridade do ARN total extraído do tecido peniano, para posterior análise molecular. Através de uma eletroforese em gel de agarose desnaturante, observaram-se distintamente as bandas 28S e 18S do ARN ribossomal, sendo a primeira duas vezes mais intensa que a segunda. Confirmou-se deste forma que as amostras de ARN extraídas se encontravam íntegras. C- controlo; D- diabético

Nos ratos diabéticos observou-se desde a primeira semana do estudo um aumento dos valores da pressão arterial sistólica, que na oitava semana registaram valores médios de 131.37 ± 2.0 mmHg (média \pm EP) *versus* 119.3 ± 1.5 mmHg nos animais não diabéticos ($p < 0.001$) (figura 1B). Estes resultados validaram o modelo experimental, demonstrando que com a progressão da diabetes os animais apresentam alterações no peso e tensão arterial características da doença.

Avaliação dos parâmetros de pureza e integridade do ARN extraído do tecido peniano

Numa fase inicial, pretendeu-se otimizar o protocolo de extração de ARN de tecido erétil, uma vez que, para se obterem bons resultados na análise pelo método de *microarrays*, é essencial o uso de amostras de ARN de elevada qualidade. O protocolo de extração de ARN de tecido erétil permitiu obter amostras dentro dos parâmetros pretendidos. O cálculo da concentração do ARN total, a partir da leitura da absorvância a 260nm, demonstrou valores superiores a $11ng/\mu l$; a determinação da pureza a partir da razão entre os valores de absorvância a 260nm e a 280nm (comprimento de onda no qual absorvem as cadeias aromáticas dos aminoácidos) revelou valores superiores a 2 e, entre os valores a 260nm e a 230nm (comprimento de onda no qual absorvem os fenóis e outros compostos aromáticos), superiores a 1.7. A avaliação da integridade das amostras obteve-se mediante a visualização distinta das bandas 28S e 18S do ARN ribossomal, sendo a primeira duas vezes mais intensa que a segunda, através de uma eletroforese em gel de agarose desnaturante (figura 2).

Análise por *microarrays* da alteração na expressão de genes angiogénicos em tecido cavernoso diabético

Procedeu-se à análise da alteração de expressão de genes angiogénicos no tecido cavernoso diabético,

numa fase inicial e estabelecida da doença. O tecido cavernoso diabético e controlo para 2 e 8 semanas de diabetes foram avaliados através do *Rat Angiogenesis OligoGEArray System* e analisado com um *software* específico. Este processo permitiu uma avaliação global qualitativa e semi-quantitativa de 113 genes envolvidos direta e indiretamente em mecanismos de angiogénese.

Os resultados obtidos, expressos como rácio da expressão relativa Diabético/Controlo, sugeriram que não existem diferenças significativas na alteração da expressão de genes angiogénicos, entre ratos com uma diabetes inicial e os respetivos controlos. Os resultados obtidos para o grupo de ratos com uma diabetes estabelecida mostraram uma sub-expressão de dez genes angiogénicos no tecido cavernoso diabético, em comparação com os respetivos controlos. Quatro destes genes apresentam um rácio da expressão relativa Diabético/Controlo <1 (significativamente sub-expressos), tendo sido caracterizados e agrupados de acordo com a sua função molecular e processo biológico (tabela I). Estes genes encontram-se envolvidos: na atividade de quimiocinas; fator de necrose tumoral membro da superfamília de Ligandos 12, *Tnfsf12*; na atividade da Guanilato ciclase (GC)/biossíntese do monofosfato cíclico de guanósina (eGMP); recetor do peptídeo natriurético 1, *Npr1*; e diretamente em mecanismos angiogénicos; fator de crescimento semelhante à insulina 1, *Igf1* e Neuropilina, *Nrp* (tabela I).

Validação de genes selecionados por PCR-qrt

De modo a validar os resultados obtidos pelo método de *microarrays*, procedeu-se à técnica de PCR-qrt para dois genes: *Npr1* e *Igf1*. Estes genes foram selecionados por apresentarem as maiores diferenças em termos de rácio da expressão relativa Diabético/Controlo e importância ao nível da sua função biológica e/ou potencial papel nas complicações

Categorização funcional do gene	Nome do gene (símbolo do gene)	Rácio Diabético/Controlo
Atividade quimiocina	Fator de necrose tumoral membro da superfamília de ligandos 12 (<i>Tnfsf12</i>)	0.423*
Atividade de GC/biossíntese do eGMP	Recetor do peptídeo natriurético 1 (<i>Npr1</i>)	0.424*
Processo angiogénico	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (<i>Igf1</i>) Neuropilina (<i>Nrp1</i>)	0.043* 0.436

Tabela I - Categorização funcional dos genes angiogénicos sub-expressos em tecido cavernoso diabético. Alterações específicas são expressas como rácio da expressão relativa do gene no tecido peniano Diabético/Controlo menor que 1.0; *p<0.05

Símbolo do Gene	2 ^{-ΔΔCt}
<i>Igf1</i>	0,237**
<i>Npr1</i>	0,148**

Tabela II - Valores das alterações relativas da expressão genética por PCR quantitativo em tempo real calculadas pelo método 2^{-ΔΔCt} (**p=0.01)

vasculares associadas à DE diabética. Corroborando os dados obtidos pela análise de *microarrays*, a avaliação por PCR-qrt confirmou uma sub-expressão significativa de três vezes de ambos os genes *Npr1* e *Igf1* (p=0.003 e p=0.0021, respetivamente) no tecido erétil diabético de 8 semanas comparativamente com os controlos (tabela II).

Discussão

Estudos indicam que os homens diabéticos apresentam uma maior prevalência de DE, quando comparados com a população em geral^{3,5}. Distúrbios metabólicos associados à diabetes, como a hiperglicemia e o stress oxidativo, contribuem para a alteração da síntese e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e para modificações estruturais e funcionais do endotélio peniano, culminando com disfunção endotelial e DE^{7,10}. No entanto, permanecem por esclarecer quais os mecanismos moleculares envolvidos na desregulação da integridade endotelial do tecido peniano diabético, que comprometem os mecanismos de vasorelaxamento dependentes do endotélio, fundamentais para a função erétil normal. O nosso trabalho de investigação consistiu na avaliação por *microarrays* da expressão de genes relacionados com mecanismos angiogénicos em tecido erétil diabético, em dois estadios diferentes da doença, numa fase inicial (2 semanas) e estabelecida (8 semanas). Encontram-se publicados, até à data, dois estudos em que foram efetuadas análises moleculares semelhantes por um sistema de *affymetrix chips*, em modelo animal diabético^{13, 14}. Um destes estudos analisou, numa fase estabelecida da doença, genes envolvidos em múltiplas funções biológicas¹³. O segundo estudo focou-se, num estadio mais precoce da doença, na análise de genes relacionados com alterações ao nível da musculatura lisa cavernosa¹⁴. O nosso trabalho de investigação é pioneiro na avaliação de alterações de genes relacionados com a vasculatura cavernosa em diferentes estadios da diabetes. Os resultados revelaram que numa fase inicial da diabetes não existem alterações significativas na expressão de genes associados à função vascular. De facto, está descrito que numa fase avançada da doença se observam alterações vasculares significativas em CC diabético e consequentemente modificações hemodinâmicas¹⁵. Con-

sideramos válido assumir que alterações endoteliais significativas deverão acontecer principalmente com a progressão da diabetes. Relativamente às alterações verificadas no tecido cavernoso diabético às 8 semanas, identificaram-se alguns genes sub-expressos, cuja sua categorização funcional permitiu categorizar em: genes envolvidos diretamente em mecanismos de angiogénese (*Nrp1*, *Igf1*), na atividade da GC/biossíntese do cGMP (*Npr1*) e na atividade de quimiocinas (*Tnfsf12*). A redução de expressão de genes, como *Igf1*¹⁶ e *Npr1*,¹⁷ foi associada a complicações da diabetes observadas noutros sistemas de órgãos, sugerindo a existência de mecanismos moleculares análogos relacionados com esta patologia. A análise por *microarrays* permite apenas uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa da alteração da expressão génica, desta forma é essencial validar esses resultados por um método quantitativo, o PCR-qrt. Selecionaram-se dois genes, o *Igf1* e o *Npr1*, cuja escolha se baseou nas diferenças significativas em termos de rácio da expressão relativa Diabético/Controlo e na sua importância biológica em mecanismos vasculares e de vasorelaxamento. A redução da expressão do gene *Igf1* poderá ter efeitos deletérios na função erétil diabética, uma vez que está reportado que a transferência do gene *Igf1* através de adenovírus para o pénis de ratos diabéticos levou a um aumento da sua capacidade erétil.¹⁸ De facto, o gene *Igf1* apresenta relevantes funções biológicas tanto como mediador angiogénico como estimulador da miogénese, eventos cruciais para a homeostasia do endotélio peniano e da função das células do músculo liso cavernosas^{19, 20}. Relativamente ao gene *Npr1* este codifica um receptor membranar GC com um domínio tirosina cinase e está envolvido na biossíntese do cGMP e na regeneração vascular²¹, apresentado um papel relevante nos eventos de vasorelaxamento²². De salientar, que este é um estudo pioneiro na avaliação da expressão diferencial de genes relacionados com os mecanismos de angiogénese em tecido erétil diabético, realizado pelo método de *microarrays*, em que reportamos a diminuição de expressão dos genes *Igf1* e *Npr1*, confirmada posteriormente por PCR-qrt.

Conclusões

Em conclusão, com este trabalho científico demonstrou-se uma sub-expressão significativa em quatro genes envolvidos em mecanismos de angiogénese em tecido cavernoso experimental de DT1. Destes genes, o *Igf1* e *Npr1* foram selecionados de acordo com a sua relevante função biológica, ao nível dos componentes cavernosos vasculares e da musculatura lisa. Estes resultados sugerem que os genes *Igf1* e *Npr1* desempenham um papel crucial na manutenção da homeostasia cavernosa e função erétil, deven-

do ser futuramente testados como potenciais alvos preventivos/terapêuticos na DE diabética.

Agradecimentos

Trabalho financiado pelo Prémio Abbott Urologia 2008, Associação Portuguesa de Urologia

Referências

1. Lue TF, Giuliano F, Montorsi F, et al. Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in men. *J Sex Med* 2004; 1: 6-23.
2. Bortolotti A, Parazzini F, Colli E, Landoni M. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. *Int J Androl* 1997; 20: 323-34.
3. Saenz de Tejada I, Angulo J, Celtek S, et al. Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med* 2005; 2: 26-39.
4. Rosen RC, Fisher WA, Eardley I, Niederberger C, Nadel A, Sand M. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. *Curr Med Res Opin* 2004; 20: 607-617.
5. Zheng H, Fan W, Li G, Tam T. Predictors for erectile dysfunction among diabetics. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 71: 313-19.
6. Saenz de Tejada I, Anglin G, Knight JR, Emmick JT. Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2159-64.
7. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-20.
8. Costa C, Soares R, Castela A, et al. Increased endothelial apoptotic cell density in human diabetic erectile tissue – comparison with clinical data. *J Sex Med* 2009; 6: 826-35.
9. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl* 2003; 24: S17-37.
10. Costa C, Virag R. The endothelial-erectile dysfunction connection: an essential update. *J Sex Med* 2009; 6: 2390-404.
11. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, et al. Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68: 213-9.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

13. Sullivan CJ, Teal TH, Luttrell IP, Tran KB, Peters MA, Wessells H. Microarray analysis reveals novel gene expression changes associated with erectile dysfunction in diabetic rats. *Physiol Genomics* 2005; 23: 192-205.
14. Hipp JD, Davies KP, Tar M, et al. Using gene chips to identify organ-specific, smooth muscle responses to experimental diabetes: potential applications to urological diseases. *BJU Int* 2007; 99: 418-30.
15. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, et al. Effect of combination endothelial nitric oxide synthase gene therapy and sildenafil on erectile function in diabetic rats. *Int J Impot Res* 2004; 16: 21-9.
16. Yang H, Scheff AJ, Schaleh DS. Effects of streptozotocin-induced diabetes mellitus on growth and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the rat. *Metabolism* 1990; 39: 295-301.
17. Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, et al. Mechanisms underlying the diabetes-induced hyporeactivity of the rabbit carotid artery to atrial natriuretic peptide. *Pharmacol Res* 2011; 63: 190-8.
18. Pu XY, Hu LQ, Wang HP, Luo YX, Wang XH. Improvement in erectile dysfunction after insulin-like growth factor-1 gene therapy in diabetic rats. *Asian J Androl* 2007; 9: 83-91.
19. Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol Ther* 2004; 9: 46-55.
20. Kim M, Hwang EC, Park IK, Park K. Insulin-like growth factor-1 gene delivery may enhance the proliferation of human corpus cavernosal smooth muscle cells. *Urology* 2010; 76: 511 e515-9.
21. Kuhn M, Volker K, Schwarz K, et al. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase-a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2019-30.
22. Andrade E, Andrade PM, Borra RC, Claro J, Srougi M. cDNA microarray analysis of differentially expressed genes in penile tissue after treatment with tadalafil. *BJU Int* 2008; 101: 508-12.