

## Artigos Originais

# Distribuição do território endotelial e da expressão de VEGF em modelo experimental de pênis de rato.

## Efeitos da orquidectomia bilateral e do envelhecimento

N. Tomada<sup>1</sup>, J. Santos<sup>2</sup>, H. Almeida<sup>2</sup>, D. Neves<sup>2</sup>, P. Vendeira<sup>1,2</sup>

1 Serviço de Urologia do Hospital de S. João

2 Serviço e Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina e IBMC da Universidade do Porto

### Resumo

O envelhecimento e o hipogonadismo são factores de risco para a Disfunção Eréctil (DE), uma doença que afecta mais de 10% da população masculina adulta na Europa. Alterações estruturais no músculo liso e no endotélio cavernoso contribuem para a disfunção vascular e são responsáveis por várias formas de DE orgânica. A clarificação dos mecanismos angiogénicos no corpo cavernoso permitirão melhorar o nosso conhecimento relativo à prevenção e tratamento desta patologia. O VEGF (vascular endothelial growth factor) é o principal factor de crescimento vascular, essencial para a sobrevivência e proliferação da célula endotelial.

O objectivo deste estudo experimental foi a caracterização da vascularização no corpo cavernoso de rato, através da detecção imunohistoquímica (IC) de PECAM-1/CD31 (marcador endotelial) e avaliação da expressão do VEGF. Utilizamos modelos experimentais de ratos Wistar envelhecidos e hipogonádicos.

Verificou-se que a expressão de CD31 estava restrita ao endotélio que reveste as trabéculas sinusoidais do corpo cavernoso, que apresentam uma atrofia aparente nos ratos orquidectomizados. Nos ratos envelhecidos (12 e 18 meses) os vasos aumentaram de calibre e mostraram marcação intensa no endotélio. Observamos uma distribuição escassa do VEGF nas fibras musculares lisas, particularmente nas que rodeavam o endotélio vascular. Este resultado foi corroborado pela análise electroforética das proteínas totais do corpo

**Correspondência:**

Nuno Tomada  
Serviço de Urologia  
do Hospital de S. João  
Alameda Prof. Hernâni  
Monteiro  
4200-319 Porto  
– Portugal  
E-mail:  
nunotomada@sapo.pt

cavernoso por Western blot, que evidenciou uma banda de 25 kDa correspondente ao VEGF, com maior intensidade nos ratos orquidectomizados e envelhecidos.

**Palavras chave:** disfunção eréctil, PECAM-1, VEGF, orquidectomia, envelhecimento

## Abstract

Ageing and hypogonadic states are known risk factors for erectile dysfunction (ED), a disease that affects more than 10% of adult male population in Europe. Structural alterations in the cavernous smooth muscle and endothelium contribute to vascular dysfunction and cause several forms of organic ED. In this way, clarifying angiogenic mechanisms in corpus cavernosum, will improve knowledge about prevention and treatment of this pathology. VEGF (vascular endothelial growth factor) is the main vascular growth factor essential to endothelial cell survival and proliferation. The aim of the present experimental study is to characterize vascularization in corpus cavernosum of rat, which was done by immunohistochemical detection of PECAM-1/CD31 (endothelium marker) and by evaluation of VEGF expression. Experimental models of androgen depleted and aged male Wistar rats were employed. Immunohistochemical staining of CD31 was restricted to the endothelium lining corpus cavernosum sinusoidal trabeculae revealing an apparent vascular atrophy in orchidectomized rats. Aged animals (12 and 18 month) presented enlarged vessels with intense endothelial staining.

Concerning the VEGF expression, we observed a scattered distribution of this peptide in the smooth muscle fibres particularly in those that surround vessel endothelium. This result is corroborated by total corpus cavernosum protein analysis by Western blot that detected a 25 kDa protein band probably corresponding to VEGF, presenting higher intensity in older and orchidectomized rats.

**Key words:** erectile dysfunction, PECAM-1, VEGF, orchidectomy, ageing

## Introdução

A disfunção eréctil (DE), definida como a incapacidade persistente em obter e/ou manter uma erecção suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório, apresenta uma alta prevalência na população geral, estimando-se que afecte cerca de 152 milhões de homens em todo o mundo<sup>1,2</sup>. A etiologia vasculogénica é predominante, sendo que o envelhecimento e o hipogonadismo são conhecidos factores de risco para a disfunção eréctil<sup>3</sup>. O aumento dramático da prevalência desta patologia com o envelhecimento foi inicialmente demonstrado pelo *Massachusetts Male Aging Study*, verificando-se que a probabilidade de apresentar DE completa triplica entre os 40 e 70 anos de idade, variando de 5% para 15%<sup>4</sup>. Esta correlação tem sido corroborada em vários estudos epidemiológicos posteriores<sup>5-9</sup>.

Alterações estruturais e/ou ultraestruturais nos componentes fibroelásticos das trabéculas penianas, músculo liso cavernoso e endotélio contribuem para uma inadequada expansão sinusoidal diminuindo a rigidez do pénis erecto. Um dos factores responsáveis pela DE

vasculogénica parece ser a disfunção veno-oclusiva traduzida em modificações do fluxo arterial e do relaxamento do músculo liso cavernoso, e fibrose cavernosa. Pode também envolver a ruptura da integridade funcional do endotélio vascular, o que modifica a capacidade de resposta do endotélio a alterações hemodinâmicas locais e factores parácrinos e autócrinos, sendo esta situação conhecida como disfunção endotelial. Este termo refere-se à diminuição da capacidade de relaxamento do músculo liso dependente do endotélio, o que se deve à perda ou ao aumento da degradação de Óxido Nítrico (NO) na vasculatura<sup>10,11</sup>.

O declínio progressivo da secreção de androgénios observado no envelhecimento está hoje bem reconhecido, apresentando, contudo, uma extensa variabilidade inter-individual<sup>12-16</sup>. A deficiência androgénica parcial é caracterizada por sintomas sexuais específicos tais como a diminuição da líbido, e alterações da função eréctil e ejaculatória. Os androgénios afectam profundamente a fisiologia eréctil, em particular a função endotelial. A privação androgénica em modelo experimental (orquidectomia bilateral) está associada à DE

Tabela I

Testosterona (ng/ml) p<0.01	
Grupo I – Controlo	2.36 ± 0.90
Grupo II – Orquidectomizado	0.02 ± 0.01
Grupo III – 12 meses	2.78 ± 0.42
Grupo IV – 18 meses	2.70 ± 0.52

veno-oclusiva no espaço de 6 a 8 dias, com diminuição da expressão da Síntase do Óxido Nítrico (NOS) no tecido cavernoso, estando descrito que a reposição dos níveis de testosterona apresenta um efeito preventivo da DE<sup>17-19</sup>.

Por outro lado, o envelhecimento provoca a perda de terminações nervosas no pénis e alterações na capacidade de relaxamento do músculo liso, através do aumento do tónus adrenérgico e/ou a substituição por fibras de colagénio<sup>20</sup>. A célula endotelial no animal idoso apresenta diminuição da expressão da NOS e do Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)<sup>21</sup>.

O VEGF é um mitogénio específico da célula endotelial *in vitro*, e um factor de crescimento angiogénico *in vivo*. É produzido por várias células incluindo as células muscular lisa vascular, endotelial, e inflamatórias, e tem efeitos directos nas células musculares lisas e endoteliais vasculares através de receptores de membrana com actividade tirosina-cínase (VEGFR-1 e VEGFR-2)<sup>22-24</sup>. A Injecção Intracavernosa (IIC) de VEGF, em modelo de isquemia no rato, estimula a expressão da NOS endotelial (NOSe) e induzível (NOSi)<sup>25</sup>. Assim, além da estimulação directa do crescimento da célula endotelial, o VEGF possui a capacidade de estimular a produção de NO.

Uma vez que alteração dos nervos, endotélio e musculatura lisa cavernosas é a via final comum aos vários tipos de DE orgânica, as terapêuticas que conduzem à neovascularização, nomeadamente a IIC de VEGF, podem representar a chave para a prevenção e cura de muitas das formas da DE. A IIC de VEGF permite a restauração da integridade neuronal, do músculo liso, e do endotélio, traduzindo-se clinicamente por reversão da DE veno-oclusiva e por uma função erétil praticamente normal<sup>26,27</sup>.

Os acontecimentos celulares e moleculares envolvidos na regulação da neovascularização peniana ainda não são completamente conhecidos, pelo que uma melhor compreensão dos mesmos permitirá a identificação de novas abordagens terapêuticas. Os objectivos deste estudo incluíram a observação das consequências do envelhecimento e particularmente da privação an-

drogénica, na organização do endotélio e na expressão do VEGF no tecido cavernoso do rato.

## Métodos

### Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos machos estirpe Wistar provenientes da colónia do IBMC da Universidade do Porto, mantidos em condições de luz e temperatura controladas e alimentados *ad libitum* com água e dieta de laboratório. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo I – ratos controlo, adultos jovens com 2 meses de idade e 200-300 g de peso corporal. Grupo II – ratos submetidos a orquidectomia bilateral aos 2 meses de idade e sacrificados 90 dias após a intervenção.

Grupo III – ratos com 12 meses de idade. Grupo IV – ratos com 18 meses de idade. O sacrifício efectuou-se por decapitação fazendo-se recolha do sangue do tronco. O pénis foi removido e fixado em solução de formol 10% ou alternativamente em fixador de zinco (Tris HCl 0.1 M pH 7.4, Ca(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0.05%, Zn(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0.5%, ZnCl<sub>2</sub> 0.5 %, apropriado para detecção do PECAM-1) durante 24 h a 4°C. Procedeu-se à desidratação, inclusão em parafina e efectuaram-se cortes de 6 µm que foram aplicados em lâminas revestidas com poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, St Louis, MO).

### Quantificação hormonal

O sangue recuperado em tubos com EDTA centrifugou-se a 1000 g durante 40 min para isolar o plasma. A quantificação da testosterona total foi efectuada por Radioimunoensaio (RIA) usando kit comercial (IBL-Hamburg) no Laboratório de radioisótopos do Hospital de S. João-Porto.

### Imunocitoquímica

Os cortes histológicos de pénis foram desparafinados e desidratados. Procedeu-se à inibição da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em metanol) e recuperação antigénica por ebulição em tampão citrato (pH 6.0) em micro-ondas 1 min a que se sucedeu 10 min em *keep warm* (tratamento desnecessário para o CD31). Efectuou-se o bloqueio dos locais de ligação inespecífica dos anticorpos e incubou-se a 4°C *overnight* em câmara húmida, com anticorpo primário de ratinho monoclonal anti-PECAM-1 (CD31) diluído a 1:40 (clone TLD-3A12, Serotec Lda, UK) ou anticorpo primário de cabra policlonal anti-VEGF 1:50 (R&D Systems). Foram utilizados anticorpos secundários adequados, respectivamente,

anticorpo de cabra anti-ratinho biotilado diluído 1:200 (Dako), e imunoglobulina de ratinho anti-cabra biotilado 1:500 (clone GT-34, Sigma Diagnostics, St Louis, MO) 30 min, a que seguiu incubação com complexo estreptavidina-peroxidase 1:200 30 min (Dako). Após lavagens, procedeu-se à revelação com  $H_2O_2$  e DAB 3'-diaminobenzidina, *counterstaining* com hematoxilina e montagem da preparação definitiva com Entellan.

### Electroforese de proteínas e Western blot

Fragmentos de corpo cavernoso foram homogeneizados em tampão de lise (Tris 50 mM pH 7.2, NaCl 0.1 M, EDTA 5 mM, TritonX-100 0.5%) suplementado com PMSF (sulfureto de fenilmetilsulfonilo) 1:500 utilizando um homogeneizador mecânico (Heidolph) durante 20 min, a que sucedeu tratamento com 5 pulsos de 10s a 10% da potência num sonicador (Bandelin, Sonopuls HD2070). A quantificação das proteínas foi efectuada em duplicado pelo método de Bradford num espectrofotómetro Beckman DU 640 usando soluções de albumina sérica bovina como padrão. A separação de proteínas efectuou-se por SDS-PAGE num gel de 14% de acrilamida/bisetilenoacrilamida num sistema da Bio-Rad, seguindo-se transferência para membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, poro 0.45 mm) em equipamento Hoefer TE 42 a 20 V durante 2h. A eficácia da transferência foi verificada por coloração da membrana com solução aquosa de Ponceau S, a que se seguiram lavagens e incubação com solução de bloqueio (Tris 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, 0.5% de leite em pó sem gordura, Tween-20 0.1%), e incubação *overnight* com anticorpo primário monoclonal de ratinho anti-VEGF (1 mg/ml, R&D Systems). Após lavagens efectuou-se a revelação da membrana por quimioluminescência usando um kit comercial (Pierce, QB Perbio) de acordo com as instruções do fabricante e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase na diluição 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), sendo o tempo de exposição da película fotográfica (Kodak Biomax Light film) de 10-15 min. A intensidade do sinal foi quantificado pelo programa Kodak ID Image Analysis software.

## Resultados

### Quantificação hormonal

Os valores da testosterona sérica nos ratos orquidectomizados demonstram a depleção de androgénios testiculares, já que se verifica uma variação entre os animais dos grupos I e II, de  $2.36 \pm 0.90$  para  $0.02 \pm 0.01$

(tabela I) para a testosterona total no soro. Os animais idosos (12 e 18 meses) apresentam valores de testosterona um pouco superiores aos do controlo, respectivamente  $2.78 \pm 0.42$  e  $2.70 \pm 0.52$ .

### Imunohistoquímica

A detecção da glicoproteína endotelial PECAM-1 por imunohistoquímica evidenciou os vasos do corpo cavernoso, observando-se no rato do grupo I as trabéculas sinusoidais bem organizadas, assim como os vasos de maior calibre (Fig. 1a). No rato orquidectomizado, grupo II, observamos uma desorganização e atrofia da estrutura vascular (Fig. 1b) com diminuição aparente do lúmen dos vasos. No animal mais idoso, 12 e 18 meses (grupos III e IV, respectivamente), a marcação endotelial evidenciou vasos de calibre aumentado (Fig. 1 c e d, respectivamente) quando comparados com o controlo.

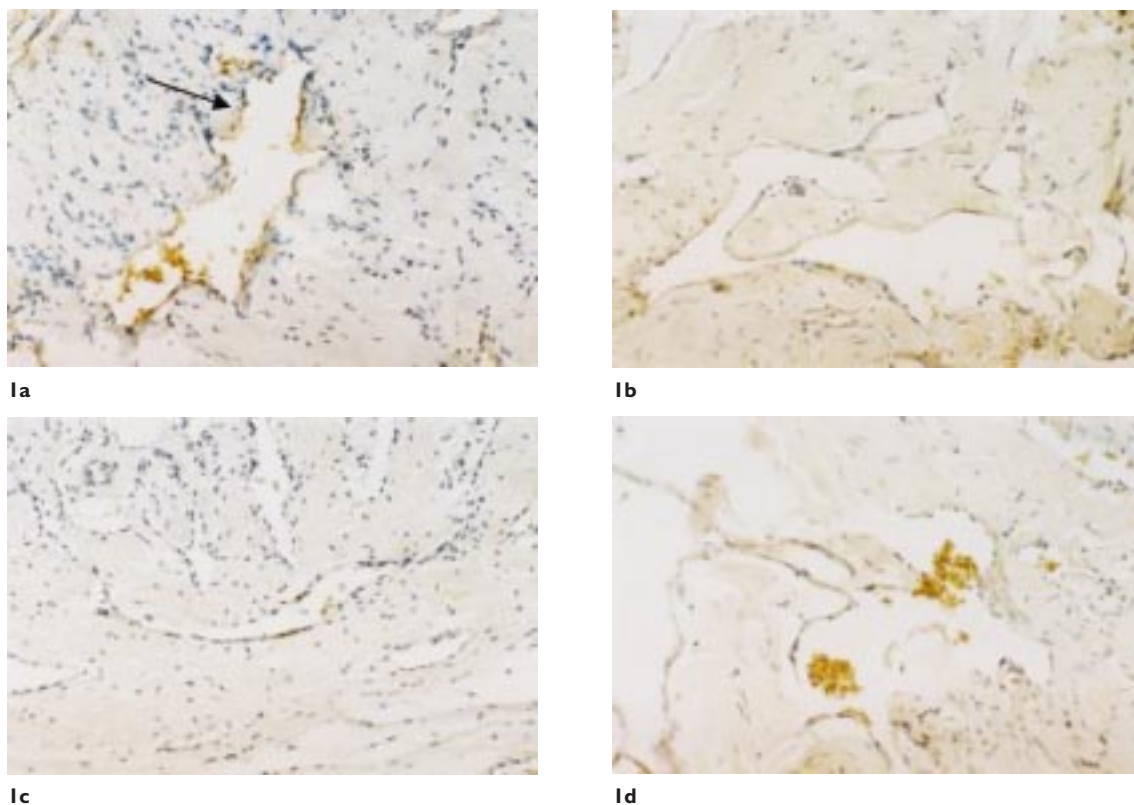
A pesquisa do VEGF em tecido cavernoso evidenciou a sua localização no tecido muscular liso no animal controlo, grupo I (Fig. 2a), e também no rato orquidectomizado, grupo II (Fig. 2b). Nos animais dos grupos III e IV, observou-se um aumento da marcação no tecido muscular liso perivascular (Fig. 2c e d).

### Electroforese de proteínas e Western blotting

A análise de proteínas totais de corpo cavernoso de rato por SDS-PAGE e Western blotting revelou a presença de uma banda com aproximadamente 25 KDa em todas as fracções estudadas, que parece corresponder ao VEGF. A intensidade da banda aumenta significativamente nas amostras proteicas de pénis de rato dos grupos II, III e IV, quando comparada com o controlo (grupo I), havendo, inclusivamente, aumento progressivo da intensidade da banda até aos 9 meses de idade (resultado não mostrado) e declínio da expressão do VEGF dos 9 até aos 18 meses de idade.

## Discussão

A DE associada ao envelhecimento pode ser atribuída a uma série de alterações estruturais e bioquímicas: insuficiente produção de NO durante a neurotransmissão devido à perda de terminais nervosos para e no pénis; redução dos níveis de NO pela *down-regulation* da NOS endotelial (NOS-e) secundária a lesão endotelial associada a patologias concomitantes como a diabetes e doença vascular; libertação excessiva de neurotransmissores adrenérgicos que aumentam o tónus do músculo liso cavernoso através da activação da



**Figura 1** – Detecção por imunohistoquímica da glicoproteína PECAM-1. Observa-se marcação endotelial (seta) nos vasos do corpo cavernoso, que se apresentam bem organizados no rato jovem (Fig. 1a). No rato orquidectomizado (Fig. 1b) observa-se uma aparente atrofia da estrutura vascular. Nos animais mais idosos 12 e 18 meses (Fig. 1c e d, respectivamente) a marcação endotelial evidenciou vasos de calibre aumentado quando comparados com o controlo.

Endotelina-1 e da Rho-cinase; e, alteração do relaxamento do músculo liso cavernoso por degradação excessiva da GMPc pela PDE-5 ou perda relativa de células musculares lisas e sua substituição por fibras de colagénio<sup>20</sup>.

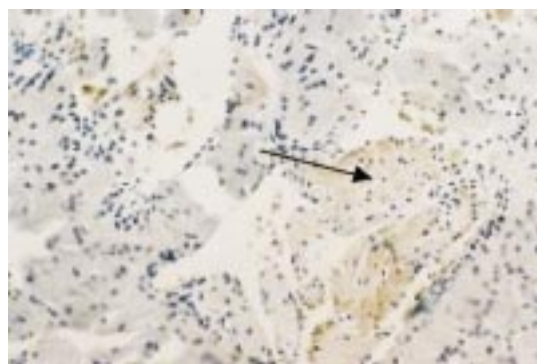
Apesar da evidência experimental de reversão da DE com a IIC de VEGF, o mecanismo exacto pelo qual o VEGF regula a função eréctil não é completamente compreendido. Além do seu papel angiogénico, e do seu envolvimento no trofismo neuronal e muscular, o VEGF também regula a expressão da NOS-e nas células endoteliais. O decréscimo da expressão do VEGF observado no envelhecimento peniano sugere que alterações na síntese deste factor de crescimento podem contribuir para as modificações fisiológicas e morfológicas no tecido eréctil induzidas pela idade<sup>31</sup>.

Independentemente da etiologia da DE orgânica, a disfunção veno-oclusiva é um denominador final comum resultante da atrofia do músculo liso e deposição de colagénio. Quando ratos com DE vasculogénica estabelecida são tratados com uma única IIC de VEGF, a sua função eréctil retorna quase ao normal, apresentando

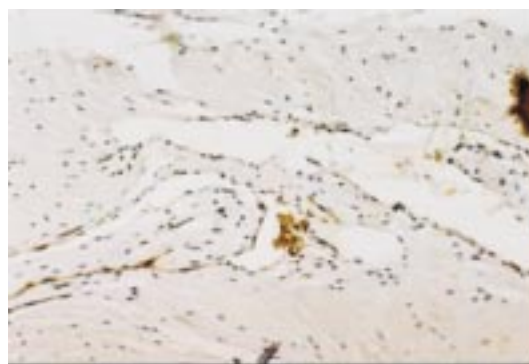
reversão do defeito veno-oclusivo. O estudo ultra-estrutural evidenciou ainda hiperplasia e hipertrofia das células endoteliais, e a restauração da integridade neuronal e do músculo liso no tecido cavernoso<sup>32,33</sup>.

No presente estudo em modelo de animal mais idoso, 12 e 18 meses, a marcação endotelial evidenciou vasos de calibre aumentado (Fig. 1c e d, respectivamente) quando comparados com o controlo. Também observamos um aumento na expressão do VEGF até à idade de 9 meses a que se seguiu uma diminuição gradual dos 9 aos 18 meses.

Estas observações corroboram as previamente descritas por Rajasekaran et al<sup>21</sup>. Neste estudo foram observadas alterações na expressão diferencial de factores relaxantes (NOS-e e VEGF) e constritores (Endotelina-1) do endotélio no envelhecimento, que podem ser responsáveis pelo aumento da prevalência da DE neste grupo etário<sup>21</sup>. Nos ratos idosos, a IIC de VEGF aumentou a expressão do VEGF e NOS-e, constatando-se a melhoria da resposta vasoactiva do músculo liso cavernoso, provavelmente devida a alterações da integridade do músculo liso e endotélio trabecular<sup>34</sup>.



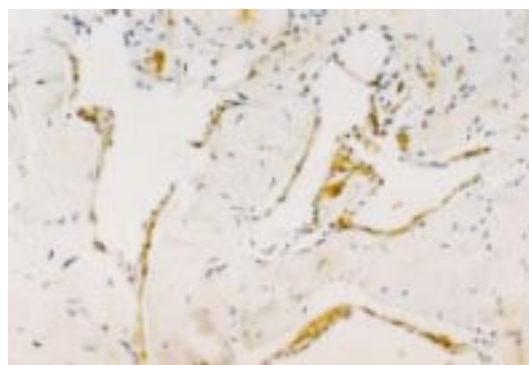
2a



2b



2c



2d

**Figura 2** – Detecção por imunohistoquímica do VEGF. Observa-se sempre no tecido muscular liso perivascular (seta) tanto no animal controlo (Fig. 2a) como no rato orquidectomizado (Fig. 2b). Nos animais de 12 e 18 meses (Fig. 2c e d, respectivamente) observou-se um aumento da marcação.

A erecção peniana é um fenómeno dependente dos androgénios. No homem o hipogonadismo primário ou secundário está associado a DE, e após tratamento androgénico verifica-se aumento do número de erecções, tumescência peniana nocturna, episódios de masturbação e líbido. Também foi observada a presença de receptores androgénicos no tecido erétil<sup>35</sup>. Contudo a dependência androgénica para a função do músculo liso do tecido cavernoso permanece contravérs.

No rato, a castração cirúrgica provoca DE vasculogénica no espaço de 6 a 8 dias.

Poderá envolver a suprarregulação da via da RhoA/Rho Cinase com contracção do músculo liso, perda da capacidade de estimulação da NOS, e/ou indução da apoptose<sup>36,37</sup>. Embora não existam estudos experimentais no que se refere à expressão do VEGF no tecido cavernoso neste grupo de risco para a DE, verificou-se que no tecido prostático que a síntese de VEGF está diminuída, e que a testosterona induz a síntese deste factor de crescimento<sup>17-19</sup>. No presente modelo de animal orquidectomizado, observámos uma desorganização e atrofia da estrutura vascular com

diminuição aparente do lúmen dos vasos, mas sem alterações significativas na expressão do VEGF quando comparados com animais da mesma idade. Os nossos resultados sugerem um papel dos androgénios testiculares na manutenção das características histológicas do corpo cavernoso do rato.



**Figura 3** – Detecção por Western blotting do VEGF. Em todas as amostras estudadas observou-se uma banda com massa molecular aproximada de 25 kDa. A expressão do VEGF aumentou com a idade do rato dos 2 (coluna 2m) até aos 12 meses (coluna 12m), verificando-se uma diminuição dos 12 para os 18 meses (colunas 12m e 18m, respectivamente). Após orquidectomia há um aparente aumento da expressão do VEGF (coluna Orq).

No estudo de Rogers *et al.* demonstrou-se que tanto a reposição de testosterona como de VEGF apresentam um efeito preventivo da DE, quando administradas imediatamente após castração<sup>32</sup>. A morfologia e conteúdo de músculo liso penianos apresentam deterioração tanto na qualidade como na quantidade do músculo liso após castração. Estas alterações normalizaram nos animais que receberam testosterona ou VEGF, sendo evidência de preservação da integridade do tecido cavernoso com este tratamento preventivo. Após tratamento com VEGF, também se verificou restauração da integridade neuronal, tal como hiperplasia e hipertrofia das células endoteliais.

O estudo imunocitoquímico de marcadores endoteliais e factores de crescimento endotelial são fundamentais para a compreensão da organização vascular e angiogénese no tecido eréctil, assim como dos mecanismos envolvidos na diminuição da função eréctil associados ao envelhecimento e ao hipogonadismo. As alterações observadas na organização do endotélio e expressão de VEGF nestes grupos de risco para a DE, e a sua reversão com terapêutica com factores de crescimento vascular, justificam o aprofundamento do conhecimento destes mecanismos em novos estudos experimentais.

## Bibliografia

- 1- Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, et al: Guidelines on Erectile Dysfunction. *Eur Urol*, 41: 1-5, 2002
- 2- McKinlay JB: The Worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 12:56, 2000
- 3- Melman A, Gingell JC: The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Urol*, 161: 5-11, 1999
- 4- Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, et al: Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 151: 54-61, 1994
- 5- Melman A, Gingell JC: The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Urol*, 161: 5-11, 1999
- 6- Lewis RW: Epidemiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*, 28 (2): 209- 16, 2001
- 7- Nehra A, Kulaksizoglu H: Global perspectives and controversies in the epidemiology of male erectile dysfunction. *Curr Opin Urol*, 12:493-496, 2002
- 8- Kubin M, Wagner G, Fugl-Meyer AR: Epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 15:63-71, 2003
- 9- Martin-Morales A, Sanchez-Cruz JJ, Saenz de Tejada I, et al: Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the epidemiologia de la disfuncion erectile masculine study. *J Urol*, 166:569-574, 2001
- 10- Sullivan ME, Keoghane SR, Miller MAW: Vascular risk factors and erectile dysfunction. *BJU Int* 2001; 87: 838-45.
- 11- Bivalacqua TJ, Usta ME, Champion HC, et al: Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of endothelium in erectile physiology and disease. *J Androl*, 24(6):S17-S37, 2003
- 12- Wespes E: Erectile dysfunction in the ageing man. *Curr Opin Urol*, 10:625-628, 2000
- 13- Seftel AD: Erectile dysfunction in the elderly: epidemiology, etiology and approaches to treatment. *J Urol*, 169: 1999-2007, 2003
- 14- Rhoden EL, Teloken C, Sogari PR, et al: The relationship of serum testosterone to erectile function in normal aging men. *J Urol*, 167: 1745-1748, 2002
- 15- Morales A, Heaton JPW, Carson CC: Andropause: a misnomer for a true clinical entity. *J Urol*, 163: 705-712, 2000
- 16- Shirai M, Yamanaka M, Shiina H, et al: Down regulation of androgen, estrogen and progesterone receptor genes and protein is involved in ageing-related erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 15: 391-396, 2003
- 17- Mills TM, Lewis RW, Stopper VS: Androgenic maintenance of inflow and venoocclusion during erection in the rat. *Biol Reprod*, 59: 1413-1418, 1998
- 18- Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT: Effects of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod*, 51: 234-238, 1994
- 19- Mills TM, Dai Y, Stopper VS, Lewis RW: Androgenic maintenance of erectile response in the rat. *Steroids*, 64: 605-609, 1999
- 20- Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J: Molecular pathophysiology and gene therapy of aging-related erectile dysfunction. *Experimental Gerontology*, XX: 1-6, 2004
- 21- Rajasekaran M, Kasyan A, Jain A, et al: Altered growth factor expression in the aging penis: the Brown-Norway rat model. *J Andrology*, 23: 393-399, 2002
- 22- Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factoring regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280:C1358-1366, 2001
- 23- Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6):669-676, 2003
- 24- Rajasekaran M: Ex vivo expression of angiogenic growth factors and their receptors in human penile cavernosal cells. *J Androl*, 24:85-90, 2002
- 25- Lin C-S, Ho H-C, Chen K-C, et al: Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor induces nitric oxide synthase isoforms. *BJU Int*, 89:955-960, 2002
- 26- Burchardt M, Burchardt T, Anastasiadis A, et al: Application of angiogenic factors for therapy of erectile dysfunction: protein and DNA transfer of VEGF 165 into the rat penis. *Urology*, 66:665-670, 2005
- 27- Lee MC, El-Sakka AI, Graziottin TM, et al: The effect of vascular endothelial growth factor on a rat model of traumatic arteriogenic erectile dysfunction. *J Urol*, 167: 761-767, 2002
- 28- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

- 29- Laemmli. U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- 30- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- 31- Liu X, Lin CS, Graziottin T, et al: Vascular endothelial growth factor promotes proliferation and migration of cavernous smooth muscle cells. *J Urol*, 166:354-360, 2001
- 32- Rogers RS, Graziottin TM, Lin C-S, et al: Intracavernosal vascular endothelial growth factor (VEGF) injection and adeno-associated virus-mediated VEGF gene therapy prevent and reverse venogenic erectile dysfunction in rats. *Int J Impot Res*, 15:26-37, 2003
- 33- Byrne R, Henry G, Rao D, et al: Vascular endothelial growth factor restores corporeal smooth muscle function in vitro. *J Urol*, 165:1310-1315, 2001
- 34- Park K, Ahn K, Kim M-K, et al: Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor improves erectile function in aged rats. *Eur Urol*: 46, 403-407, 2004
- 35- Godec CJ, Bates H and LaBrousse K: Testosterone receptors in corpora cavernosa of penis. *Urology*:26(3), 237-239, 1985
- 36- Lewis RW and Mills TM: Effect of androgens on penile tissue. *Endocrine*:23(2-3), 101-105, 2004
- 37- Traish A and Kim N: The physiological role of androgens in penile erection: regulation of corpus cavernosum structure and function. *J Sex Med*: 2, 759-770, 2005