

Expressão do VEGF e dos receptores Flt-1 e Flk-1 no corpo cavernoso do rato. Acção do envelhecimento e da orquidectomia

J. Santos^a, D. Neves^a, N. Tomada^b, H. Almeida^a e P. Vendeira^{a,b}

^aServiço e Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina Universidade do Porto. Porto. Portugal.

^bServiço de Urologia do Hospital de S. João. Porto. Portugal.

RESUMO

O envelhecimento e os estados hipogonádicos são factores de riscos reconhecidos para a disfunção erétil (ED) contribuindo ambos para a deterioração vascular do tecido do pénis. Aliás, a incidência de patologia cardiovascular está intimamente relacionada com a prevalência de disfunção erétil que pode mesmo ser considerada um sinal precoce de problemas cardiovasculares. A disfunção erétil vasculogénica, nomeadamente a disfunção cavernosa veno-oclusiva que ocorre em 2/3 dos casos de ED, é causada por relaxamento deficiente da célula muscular lisa no corpo cavernoso do pénis associado a insuficiência vascular, assim como, alterações estruturais no tecido muscular liso cavernoso, nos nervos, e no endotélio. No sentido de avaliar as modificações no corpo cavernoso associadas a deterioração do endotélio, estudou-se a expressão do VEGF e seus receptores de membrana específicos VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 por imunofluorescência no microscópio confocal, no corpo cavernoso de ratos Wistar controlo, idosos (12 e 18 meses) e orquidectomizados (90 dias de orquidectomia bilateral).

Os resultados de imunohistoquímica mostraram que a expressão tanto do VEGF como do VEGFR-1 se observou nas fibras musculares lisas, particularmente naquelas que rodeiam o endotélio vascular, sendo a expressão endotelial muito reduzida, em especial nos ratos controlo e orquidectomizados. A expressão do VEGFR-2 estende-se ao endotélio em qualquer dos grupos estudados, animais controlo – 2 meses, orquidectomizados, e envelhecidos (12 e 18 meses). Contudo, nos ratos mais idosos (12 e 18 meses), observa-se uma alteração que resulta na maior co-localização do VEGF com VEGFR-1. Estes resultados sugerem uma regulação positiva do VEGFR-1 no corpo cavernoso do rato durante o envelhecimento, sendo clara uma expressão aumentada nas células endoteliais.

Palavras chave: Angiogénese. disfunção erétil. Envelhecimento. Orquidectomia. VEGF. VEGFR-1. VEGFR-2.

ABSTRACT

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-specific receptors (Flt-1 and Flk-1) on rat corpus cavernosum. Influence of aging and orchidectomy

Aging and hypogonadic states are known risk factors for erectile dysfunction (ED). Both states contribute to vascular damage to the penile tissue. The incidence of cardiovascular disease correlates closely with the prevalence of ED, which is considered to be an early sign of impending cardiovascular problems. Vasculogenic ED, namely corporal venoocclusive dysfunction, which occurs in two-thirds of cases of ED, is caused by impairment of smooth muscle relaxation in the penile cavernosa associated with vascular insufficiency as well as structural alterations in the cavernous smooth muscle, nerves, and endothelium. To evaluate corpus cavernosum modifications associated with endothelial damage, expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-specific membrane receptors (VEGFR-1/Flt-1 and VEGFR-2/Flk-1) was studied through confocal immunofluorescence in the corpus cavernosum of control, aged (12 and 18 months) and orchidectomized (90 days of bilateral orchidectomy) Wistar rats.

Immunohistochemical results demonstrated that both VEGF and VEGFR-1 were expressed in smooth muscle fibers, particularly in those surrounding the vascular endothelium, while endothelial expression was very low, especially in control and orchidectomized rats. VEGFR-2 expression was extended to the endothelium in all three groups: control group (2 months old), orchidectomized, and aged animals (12 and 18 months old). In aged rats, a shift resulting in VEGF and VEGFR-1 colocalization in the endothelial cell was observed. Our findings suggest an upregulation of VEGFR-1 in rat corpora cavernosa during aging, with a clear increase in expression by endothelial cells.

Key words: Erectile dysfunction. Hypertension pattern. Primary care.

Correspondência: Dr. J. Santos.
Serviço e Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina.
Universidades do Porto.
Prof. Hernâni Monteiro. 4200-319 Porto. Portugal.
Correio electrónico: delmagal@med.up.pt

INTRODUÇÃO

O envelhecimento e os estados hipogonádicos são factores de risco bem estabelecidos para a disfunção erétil (ED), uma doença que atinge mais de 10% da população masculina na Europa. A prevalência da ED está estreitamente relacionada com a incidência de patologia cardiovascular sendo considerada por alguns autores um sinal precoce de problemas cardiovasculares emergentes¹. A disfunção erétil vasculogénica, nomeadamente a disfunção veno-oclusiva do corpo cavernoso que ocorre em 2/3 dos casos de ED, é causada pelo relaxamento deficiente da célula muscular lisa no corpo cavernoso do pénis associada a insuficiência vascular, e também por alterações estruturais no músculo liso cavernoso, nervos e endotélio. Recentemente, o estudo do endotélio vascular e dos mecanismos de angiogénese têm sido alvo de uma atenção crescente. Aliás, a evidência da correlação entre as modificações que se observam no endotélio vascular com o desenvolvimento da disfunção erétil, levaram Goldstein a constatar, de um modo simples e abrangente, *ED (erectile dysfunction) = ED (endothelium dysfunction)*². A angiogénese, processo a partir do qual são formados novos vasos a partir de outros pré-existentes, parece ser regulado pelo balanço entre factores estimuladores e repressores da angiogénese³. O VEGF (vascular endothelial growth factor) é um mitogénio específico da célula endotelial, promove a migração e proliferação da célula muscular lisa⁴ e pode considerar-se o principal factor de crescimento vascular envolvido na angiogénese fisiológica e patológica⁵. O VEGF é essencial para a sobrevivência da célula endotelial, e liga-se especificamente a dois receptores de membrana com função de tirosine cinase, Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase-1 receptor*) e KDR/Flk-1 (*kinase insert domain-containing receptor*).

No presente estudo, efectuou-se o estudo por imunohistoquímica (IH) e imunofluorescência (IF) da expressão do VEGF e dos seus receptores específicos de membrana, (VEGFR-1 ou Flt-1 e VEGFR-2 ou Flk-1) no corpo cavernoso de ratos normais, envelhecidos e orquidectomizados. Em trabalhos anteriores encontrámos co-localização dos dois receptores do VEGF em corpo cavernoso de ratos idosos, o que não se verifica nos animais mais jovens⁶. Foi ainda demonstrada a expressão de Flt-1 e Flk-1 em culturas de células cavernosas humanas⁷, contudo, o papel dos receptores do VEGF na vascularização do pénis, e a influência do envelhecimento e da depleção androgénica na sua expressão ainda não são conhecidos. Deste modo, é nosso intento ajudar no esclarecimento dos mecanismos de vascularização no pénis e assim contribuir para novas estratégias de prevenção e terapêutica.

MÉTODOS

Ratos machos Wistar obtidos na colónia do IBMC da Universidade do Porto foram divididos em 4 grupos experimentais (n=10); Grupo I – controlo (adultos jovens – 2 meses); Grupo II – orquidectomizados (90 dias de orquidectomia bilateral); Grupos III e IV – ratos idosos, respectivamente 12 e 18 meses. Os ratos foram sacrificados por decapitação, procedendo-se à colheita de sangue do tronco e fragmentos de pénis. A testosterona sérica foi quantificada por RIA usando um kit comercial (IBL-Hamburg).

Para os estudos morfológicos, alguns dos fragmentos do pénis foram fixados em formaldeído a 10% durante 24 h sendo incluídos em parafina. Prepararam-se secções com espessura de 4-6 µm que foram colocadas em lâminas revestidas com 0.1% poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, St Louis, MO) para proceder à detecção por imunohistoquímica do VEGF e dos receptores do VEGF. A detecção do VEGF foi efectuada usando um anticorpo de cabra policlonal anti-VEGF (diluído 1/50) (R&D), e dos Flt-1 e Flk-1 utilizando anticorpos policlonais respectivamente de cabra anti-Flt-1 (diluído 1/200), e de coelho anti-Flk-1 (diluído 1/500) (Santa Cruz – Biotechnology). Procedeu-se em seguida à ligação de um anticorpo secundário biotinilado adequado, e do complexo estreptavidina-peroxidase (DakoCytomation) seguido da reacção da peroxidase com 3,3'-diaminobenzidina e *counterstaining* com hematoxilina. Efectuou-se a detecção simultânea do VEGF com os seus receptores por imunofluorescência usando combinações de um anticorpo policlonal anti-VEGF (diluído 1/100) (R&D) com anticorpo policlonal produzido no coelho anti-VEGFR-1 (diluído 1/200) (LabVision) e anticorpo monoclonal de rato anti-VEGF (R&D) com anticorpo policlonal produzido no coelho anti-VEGFR-2 (diluído 1/200) (LabVision) a que se seguiu incubação com uma mistura de anticorpos secundários anti-cabra ou anti-rato conjugado com AlexaTM 568 (vermelho) e anti-coelho conjugado com AlexaTM 488 (verde), ambos diluídos a 1/200. As imagens obtidas foram observadas e captadas num microscópio confocal (Bio-Rad).

Para análise de proteínas, os fragmentos de pénis foram homogeneizados mecanicamente durante 20 minutos em tampão de lise (Tris 50mM pH 7.2, NaCl 0.1M, EDTA 5mM, Triton X-100 0.5%, PMSF 0.2%), sendo em seguida sonificados por 5 X 10 sec a 10% potência máxima (Bandelin, Sonopuls HD2070). Procedeu-se à quantificação de proteína total⁸ e à análise por SDS-PAGE⁹ em gel de 10% poli-acrilamida. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Biorad, pore

0.45 μm)¹⁰ e procedeu-se à detecção por Western blot de VEGF, Flt-1 e FLk-1, usando um anticorpo monoclonal anti-VEGF (R&D) e anticorpos policlonais produzidos no coelho para os receptores do VEGF (Lab-Vision), respectivamente. As bandas das proteínas específicas foram reveladas por método adequado.

RESULTADOS

Os níveis de testosterona sérica foram quantificados em todos os animais dos vários grupos experimentais, os ratos jovens controlo (2 meses) apresentaram um valor médio de 2.36 ng/ml (tabela 1), os ratos mais velhos com 12 e 18 meses apresentaram valores de 2.78 e 2.70 ng/ml, respectivamente (tabela 1). Após orquidectomia, os valores de testosterona total baixaram em todos os indivíduos para cerca de 0.02 ng/ml o que confirma a depleção androgénica neste grupo de animais.

A detecção por imunohistoquímica do VEGF revela a sua expressão nas células musculares lisas, particularmente nas que se justapõem ao endotélio em qualquer dos modelos estudados (2, 12 e 18 meses e

Grupo	Testosterona (ng/ml)
I	2,36 \pm 0,90
II	0,02 \pm 0,01
III	2,78 \pm 0,42
IV	2,70 \pm 0,52

p < 0,01.

orquidectomizado) (figs. 1 a-d). Um padrão semelhante foi encontrado para a imunohistoquímica do VEGFR-1, havendo uma localização dispersa deste péptido no tecido muscular liso, particularmente no que rodeia o endotélio vascular, sendo a marcação endotelial muito ténue tanto nos ratos controlo (fig. 2a) como nos orquidectomizados (fig. 2b). Nos ratos idosos, observa-se uma alteração na localização do Flt-1, tornando-se evidente a localização endotelial (fig. 2c e 2d, respectivamente).

A detecção por imunohistoquímica do VEGFR-2 nos ratos controlo observou-se no endotélio circundando os vasos de maior calibre do pénis do rato, assim como, nas trabéculas sinusoidais do corpo cavernoso (fig. 3a). O mesmo padrão de localização foi

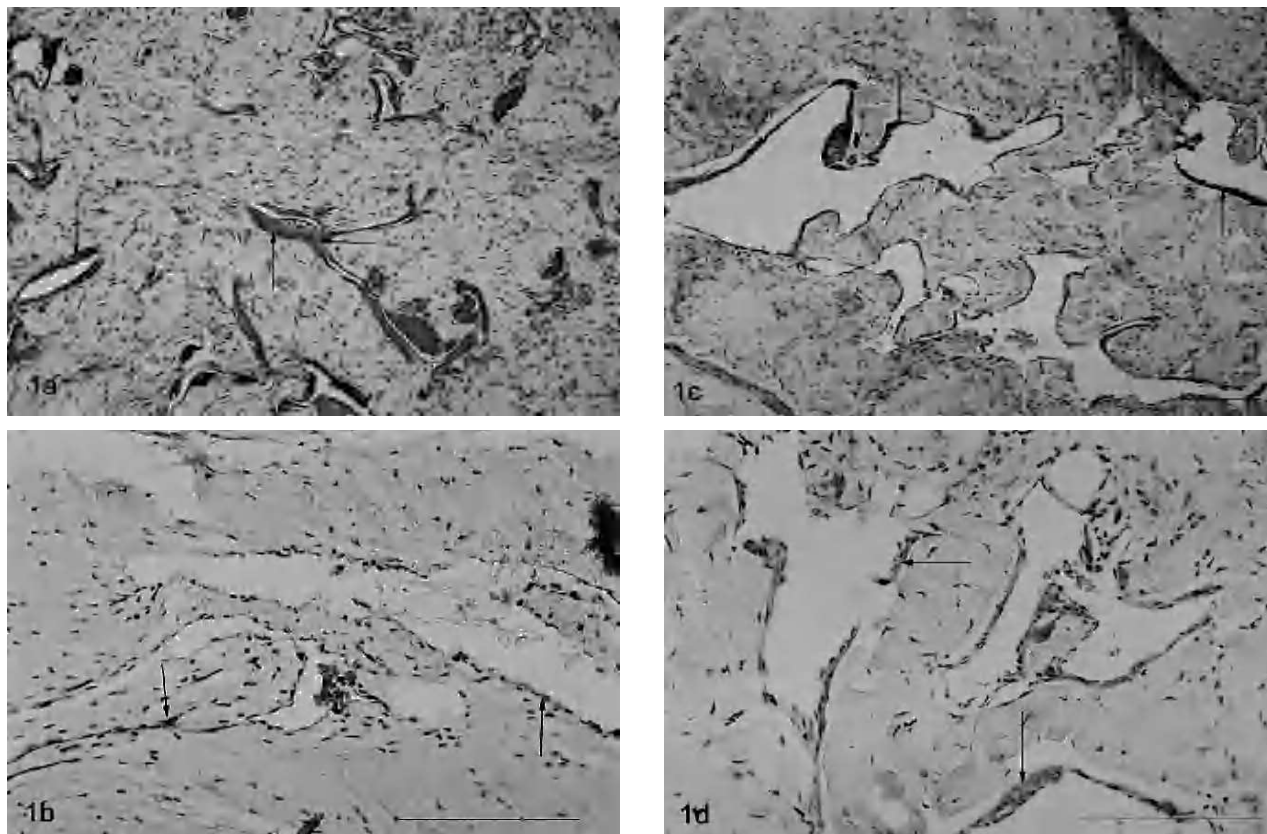


Figura 1. Imunohistoquímica do VEGF em tecido cavernoso do rato de 2 meses (fig. 1a), orquidectomizado (fig. 1b), 12 meses (fig. 1c) e 18 meses (fig. 1d). Notar a presença do VEGF no tecido muscular perivascular (setas). Barra – 50 μm .

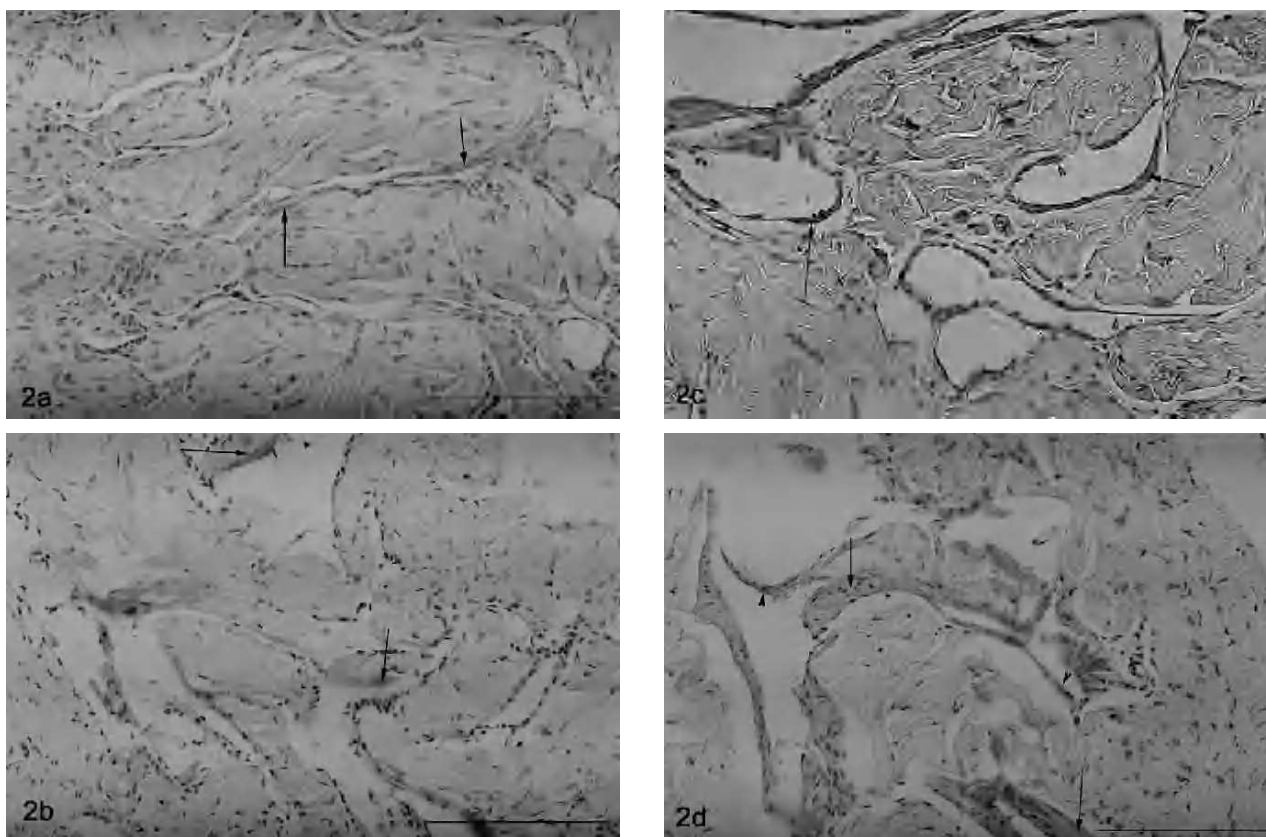


Figura 2. Detecção do Flt-1 por imunohistoquímica presente no tecido muscular liso (setas) nos ratos controlo – 2 meses (fig. 2a) e nos ratos orquidectomizados (fig. 2b), a marcação endotelial é escassa. Nos ratos mais idosos 12 e 18 meses, observa-se uma alteração na expressão do VEGFR-1, nomeadamente um aumento da expressão endotelial (cabeça de seta) associado à marcação na célula muscular lisa (fig. 2c e 2d). Barra – 50 μ m.

também observado nos ratos orquidectomizados (fig. 3b), contudo a expressão total parece diminuída devido a uma atrofia perceptível do tecido. Nos animais mais idosos (12 e 18 meses) aparentemente ocorre um aumento do calibre dos vasos penianos, que apresentam também uma marcação forte endotelial relativa ao Flk-1 (fig. 3c e 3d, respectivamente).

A marcação conjunta do VEGF e seus receptores em microscopia confocal, demonstra co-localização entre o VEGF e o VEGFR-1 no músculo liso perivascular, nos animais jovens (fig. 4a) e orquidectomizados (fig. 4b), acentuando-se nos animais mais velhos (figs. 4c e 4d). A detecção do VEGF e VEGFR-2 por microscopia confocal evidenciou pouca co-localização. No entanto o VEGF e o seu receptor 2 parecem ser expressos concomitantemente no endotélio dos vasos do corpo cavernoso nos ratos de 18 meses (fig. 5d), o que aparentemente não acontece nem nos ratos mais jovens (fig. 5a e 5c) nem no rato orquidectomizado (fig. 5b).

A análise electroforética das proteínas totais do corpo cavernoso, evidenciou múltiplos péptidos; entre os

quais uma banda de 25 kDa que com grande probabilidade corresponde ao VEGF. A detecção por Western blot com o anticorpo específico, revelou uma intensidade crescente nas fracções isoladas de ratos cuja idade variou de 2 para 18 meses (fig. 6a). A detecção por Western blot do Flt-1 demonstrou uma banda de 180 kDa (fig. 6b) com intensidade superior nos ratos mais velhos (18 meses) o que está de acordo com os resultados obtidos por imunohistoquímica (fig. 2d). O Flk-1 apresenta uma massa molecular aparente de 200 kDa (fig. 6c) sendo expresso em todas as fracções proteicas analisadas por Western blotting, sem evidência de variações quantitativas importantes, excepto nos ratos orquidectomizados onde a expressão de Flk-1 parece ser mais baixa (fig. 6c).

DISCUSSÃO

A função erétil declina ao longo do envelhecimento, estando a correlação bem estabelecida no humano¹¹; a prevalência da disfunção erétil completa varia em

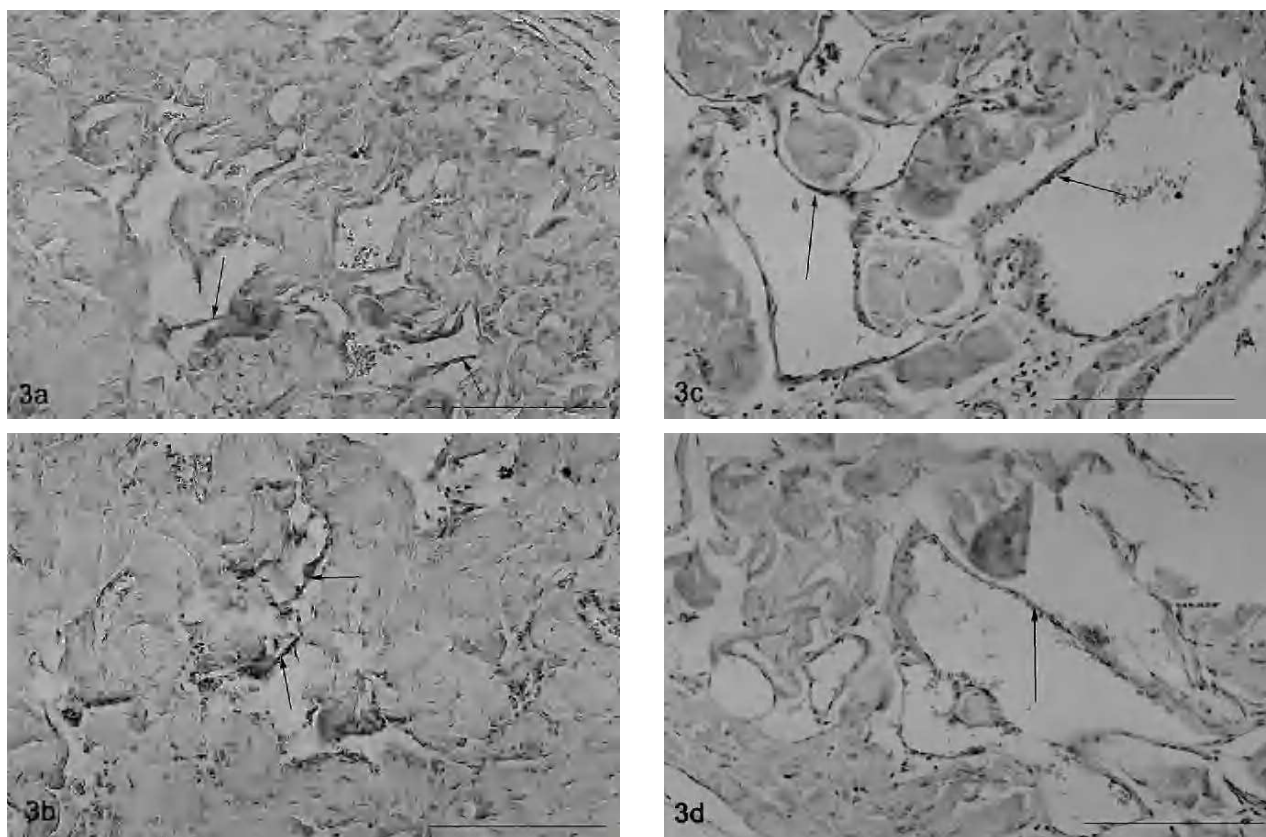


Figura 3. Detecção por imunohistoquímica do Flk-1 que se observa no endotélio vascular (setas) nos ratos de 2 meses (fig. 3a), orquidectomizados (fig. 3b), 12 (fig. 3c) e 18 meses (fig. 3d). Barra – 50 µm.

média de 5 para 15% entre os 40 e os 70 anos. O declínio da função erétil já foi também demonstrado no rato em experiências *in vivo* e *in vitro*¹². A fisiologia do declínio da função erétil ao longo do envelhecimento tem sido difícil de esclarecer devido a condições e factores concomitantes que influenciam e potencialmente agravam, tais como, o consumo de tabaco, o alcoolismo, a hipertensão arterial, a hipercolesterolemia, a diabetes e a variação androgénica. Trabalhos prévios, em que foram utilizados modelos de animais com dieta controlada e condições ambientais favoráveis e estáveis demonstraram que o envelhecimento conduz por si só, a uma atrofia generalizada do tecido erétil reduzindo a obediência do corpo cavernoso, acompanhada de cinéticas mais lentas tanto da erecção como da detumescência¹².

A erecção do pénis é um evento vascular regulado em primeira mão pelo relaxamento do músculo liso tanto arterial como corporal, o que vai ter um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo no pénis durante os processos de erecção e detumescência¹³. Estudos recentes sugerem que factores de crescimento vascular, como o VEGF, contribuem para a modulação da vascularização do pénis do rato⁴. Isto é

apoiado pela demonstração *in vivo* de que a injeção intracavernosa de VEGF, assim como, a terapia génica mediada por adenovírus com VEGF¹⁴, melhoram a função erétil nos ratos idosos¹⁵. O VEGF, que pode ser considerado o factor de crescimento angiogénico mais potente, assim como os seus receptores, foram originalmente caracterizados no endotélio mas a sua presença foi também demonstrada nas células musculares lisas cavernosas humanas⁷.

O objectivo principal deste trabalho é caracterizar a expressão tanto do VEGF como dos seus receptores VEGFR – 1 e 2 no corpo cavernoso do rato durante o envelhecimento. Tanto quanto é do nosso conhecimento, é a primeira vez que o estudo dos receptores do VEGF é feito no rato. De modo a avaliar a acção isolada da depleção androgénica, por vezes associada ao envelhecimento, usámos também um grupo de ratos orquidectomizados.

No rato adulto jovem, a expressão do VEGFR-2 foi encontrada exclusivamente no endotélio, enquanto o VEGF e o seu receptor VEGFR-1 foi detectado no músculo liso perivascular. Após orquidectomia observámos uma desorganização aparente da vascularização do corpo cavernoso, sem no entanto encontrar alte-

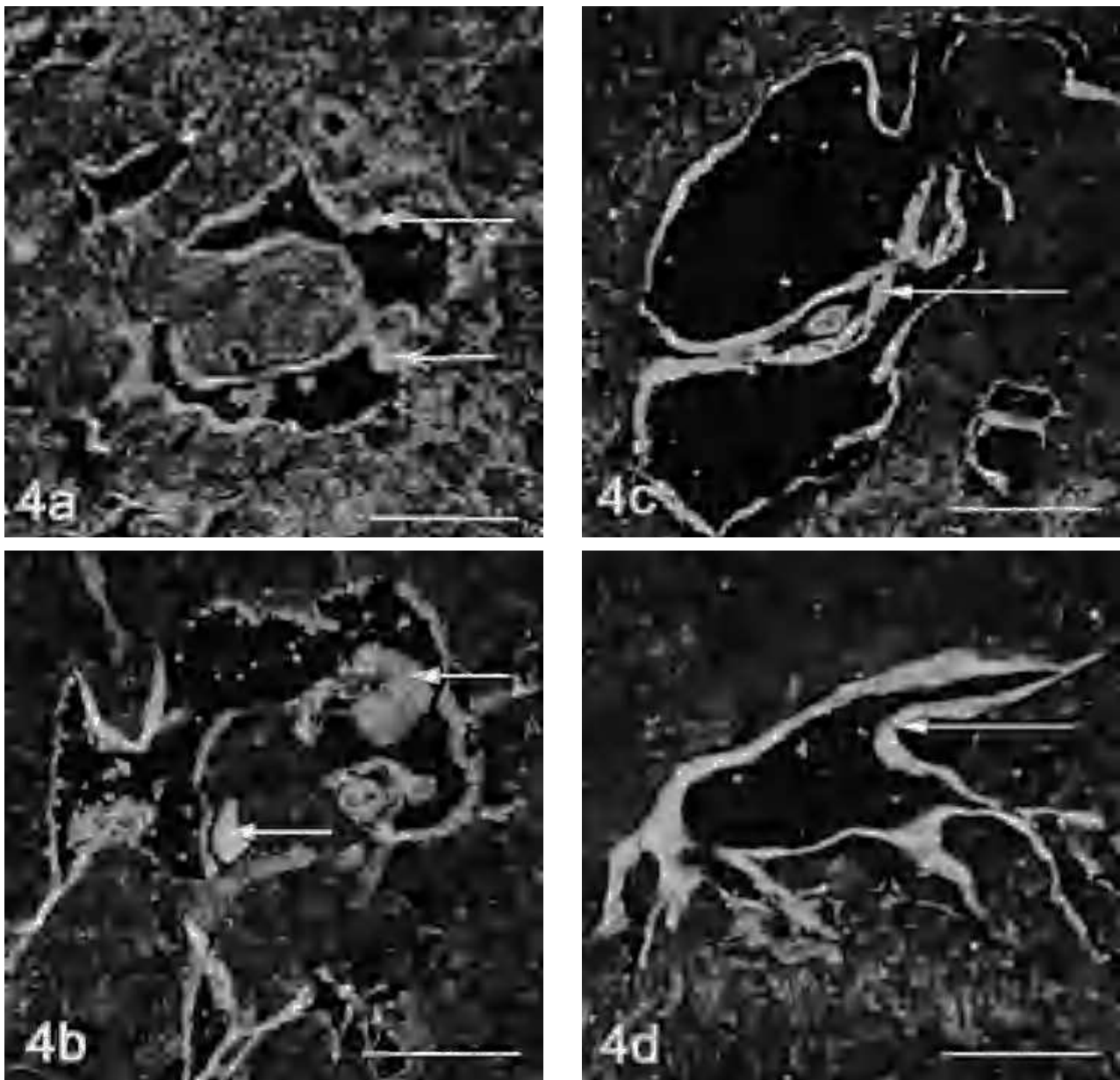


Figura 4. Detecção dupla do VEGF (vermelho) e VEGFR-1 (verde) por imunofluorescência no corpo cavernoso do rato. Nos animais de 2 meses (fig. 4a) e orquidectomizados (fig. 4b) observa-se uma marcação que evidencia a expressão tanto de VEGF como de VEGFR-1 na camada muscular perivascular. Em alguns locais observa-se co-localização (seta). Nos ratos mais velhos 12 (fig. 4c) e 18 meses (fig. 4d) a co-expressão é mais evidente observando-se em toda a camada de músculo liso perivascular (seta). Barra – 100 μ m.

ração na localização celular quer do VEGF, quer dos seus receptores. Em consonância com este resultado, está a observação por Western blotting da expressão do VEGF e do Flt-1, que demonstrou bandas com intensidade sobreponível nos ratos controlo e orquidectomizados com idade semelhante; por outro lado a expressão do Flk-1 é inferior nos ratos orquidectomizados. Deste modo, podemos concluir que apesar do corpo cavernoso do pénis permanecer um órgão androgênio-dependente mesmo no adulto¹⁶, a pri-

vação da testosterona aparentemente não conduz a deterioração vascular significativa, nem mesmo a repressão da expressão de factores de crescimento vascular e receptores específicos.

Nos ratos mais idosos (12 e 18 meses), cujos vasos aparentemente aumentam de calibre e apresentam uma camada mais espessa de tecido muscular liso, os nossos achados evidenciam que tanto a expressão do VEGF e VEGFR-1 como a do VEGFR-2 modificam. Os nossos resultados levam-nos a concluir, que duran-

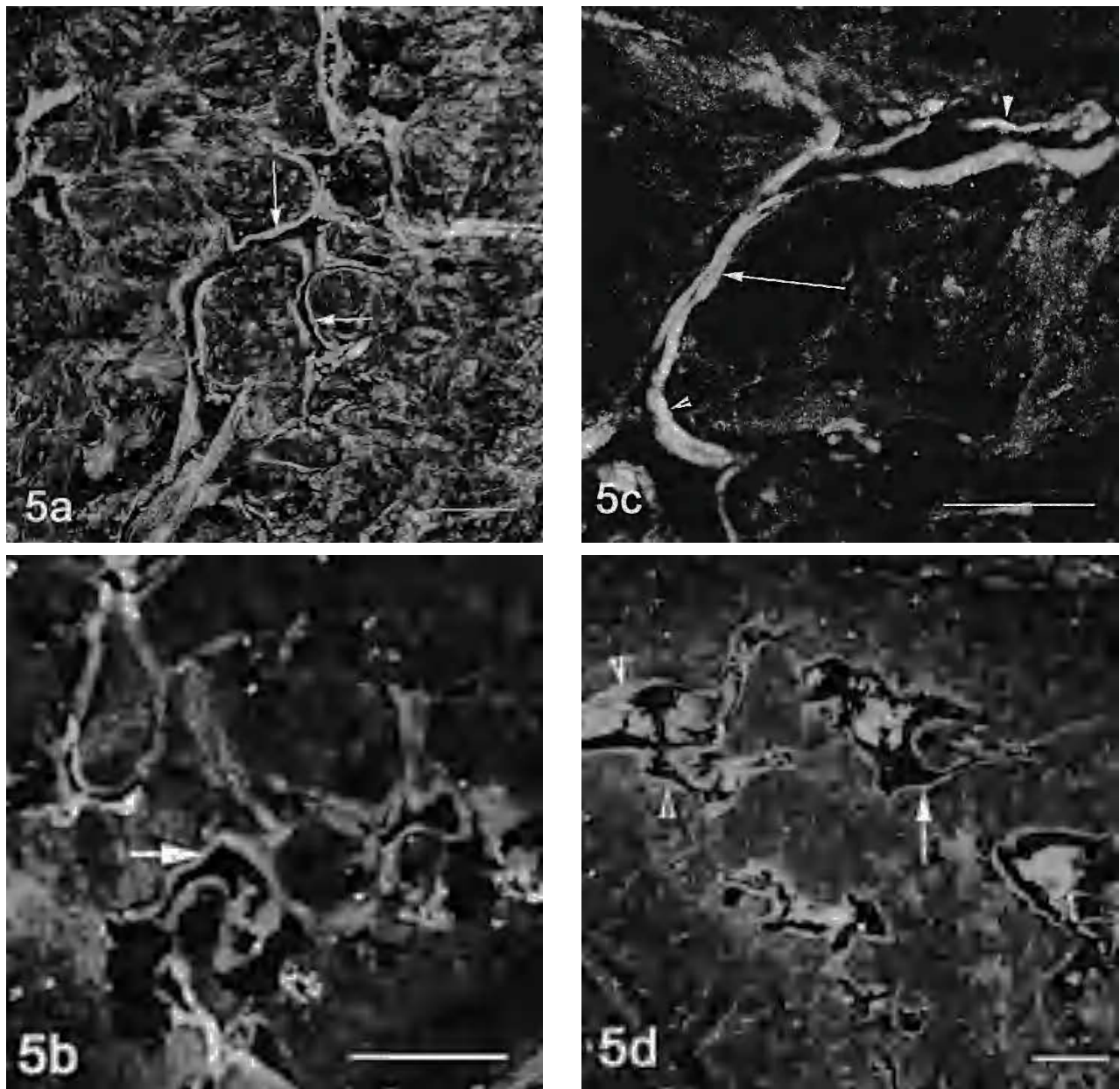


Figura 5. Detecção conjunta do VEGF (vermelho) e VEGFR-2 (verde) por imunofluorescência no corpo cavernoso do rato. Nos animais de 2 meses (fig. 5a) e orquidectomizados (fig. 5b) há pouca co-localização sendo o VEGFR-2 expresso no endotélio (setas). Nos ratos mais velhos 12 (fig. 5c) e 18 meses (fig. 5d) a co-expressão é mais evidente observando-se em pontualmente no endotélio (cabeça de seta). Barra – 100 μ m.

te o envelhecimento a expressão do VEGF aumenta até aos 9 meses de idade do animal (resultado não mostrado) e que declina progressivamente dos 9 aos 18 meses no rato, contudo a expressão total do VEGF é superior aos 12 e 18 meses do que no rato jovem, o que é evidente por Western blotting. A expressão dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 também aumenta com a idade, sendo evidente um aumento da expressão do Flt-1 nas células endoteliais onde co-localiza com o Flk-1⁶. Resumidamente, os nossos resultados

sugerem que tanto a expressão do VEGFR-1 como a do VEGFR-2 no corpo cavernoso do rato idoso são independentes de uma via mediada por androgénio.

A função exacta dos receptores 1 e 2 do VEGF no pénis ainda não está esclarecida, nem tão pouco o modo como o envelhecimento e a privação androgénica modulam a expressão de factores de crescimento vascular e a angiogénese no corpo cavernoso. No entanto, a compreensão dos eventos que regulam a vascularização do pénis contribuirá para a identificação de

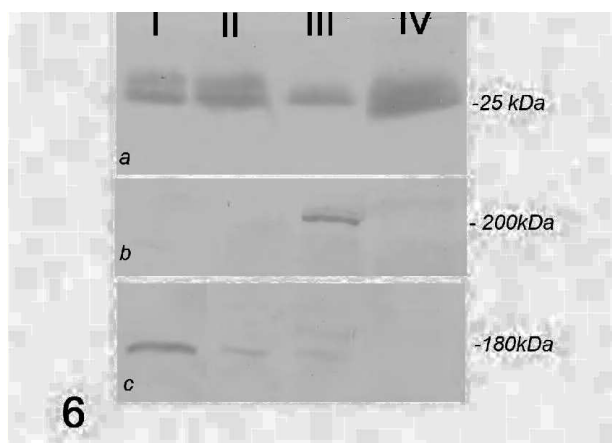


Figura 6. Análise por Western blotting do VEGF (fig. 6a) com massa molecular aproximada de 25kDa, a banda correspondente ao VEGF apresenta uma intensidade superior nas amostras isoladas de animais com 12 e 18 meses (colunas II e III) e orquidectomizados (coluna IV) quando comparados com animais de 2 meses (coluna I). O VEGFR-1 (fig. 6b) foi detectado com uma massa molecular aproximada de 180 kDa, apresentando uma banda mais intensa nos animais mais idosos (coluna III). O VEGFR-2 cuja massa molecular é 200 kDa (fig. 6c) não apresenta diferenças significativas nos animais mais idosos, apresentando, no entanto, uma banda de menor intensidade nos animais orquidectomizados (coluna IV).

novas terapêuticas no sentido de incrementar a vascularização tecidual e o fluxo de sangue para o pênis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Carlos Reguenga por colaboração técnica no sistema de análise de imagem de proteínas. Agradecem ainda à Dr. Isabel Gramaxo e ao Laboratório de Radioisótopos do Hospital de S. João-Porto por ajuda técnica.

Bibliografia

1. Cheitlin MD. Erectile dysfunction: the earliest sign of generalized vascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:185-6.
2. Goldstein I. The association of ED (erectile dysfunction) with ED (endothelium dysfunction) in the International Journal of Impotence Research: The Journal of Sexual Medicine. *Int J Impot Res.* 2003;15:229-30.
3. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med.* 1995;1:27-31.
4. Liu X, Lin CS, Graziottin T, et al. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation and migration of cavernous smooth muscle cells. *J Urol.* 2001;166:354-60.
5. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1358-66.
6. Neves D, Santos J, Tomada N, et al. Ageing and orchiectomy modulate expression of VEGF receptors (Flt-1 and Flk-1) on corpus cavernosum of the rat. Aceite para publicação em *Annals of the New York Academy of Sciences.*
7. Rajasekaran M, Kasyan A, Allilain W, et al. Ex vivo expression of angiogenic growth factors and their receptors in human penile cavernosal cells. *J Androl.* 2002;24:85-90.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
10. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4.
11. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.* 1994;151:54-61.
12. Calabrò A, Italiano G, Pescatori ES, et al. Physiological aging and penile erectile function: a study in the rat. *Eur Urol.* 1996;29:240-4.
13. Christ GJ. The penis as a vascular organ. The importance of corporal smooth muscle tone in the control of erection. *Urol Clin North Am.* 1995;22:727-45.
14. Rogers RS, Graziottin TM, Lin CS, 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.* 2003;15:26-37.
15. Park K, Ahn KY, Kim MK, et al. Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor improves erectile function in aged rats. *Eur Urol.* 2004;46:403-7.
16. Schultheiss D, Baldalyan R, Pilatz A, et al. Androgen and estrogen receptors in the human corpus cavernosum penis: immunohistochemical and cell culture results. *World J Urol.* 2003;21:320-4.