UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

LETÍCIA NOGUEIRA LEITE

Consequências do consumo crônico de etanol sobre a reatividade e expressão dos componentes do sistema endotelinérgico em corpo cavernoso de rato

Ribeirão Preto

LETÍCIA NOGUEIRA LEITE

Consequências do consumo crônico de etanol sobre a reatividade e expressão dos componentes do sistema endotelinérgico em corpo cavernoso de rato

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Leite, Letícia Nogueira

Consequências do consumo crônico de etanol sobre a reatividade e expressão dos componentes do sistema endotelinérgico em corpo cavernoso de rato. Ribeirão Preto, 2013.

86 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Etanol. 2. Corpo Cavernoso. 3. Endotelina-1.

Nome: Nogueira Leite, Letícia.

Título: Consequências do consumo crônico de etanol sobre a reatividade e expressão dos componentes do sistema endotelinérgico em corpo cavernoso de rato

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

1:

Banca Examinadora

Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	

Aos meus pais que nunca permitiram que tivéssemos passarinhos presos...

"Deus me deu por gaiola a imensidade: Não roubes a minha liberdade... Quero voar! Voar!..." Olavo Bilac

AGRADECIMENTOS

Considerando que esta dissertação é resultado de uma caminhada que não começou na USP, agradecer acaba não sendo tarefa fácil. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a formação de quem sou hoje. E agradeço, particularmente, a algumas pessoas pela contribuição direta na construção deste trabalho:

A Deus pelo dom da vida e por todas as alegrias e experiências vividas ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, pela paciência, motivação, inspiração e principalmente pela oportunidade em integrar seu grupo de pesquisa e trabalhar sob sua orientação, da qual pude extrair novos conhecimentos e cultivar uma grande admiração pela sua pessoa e pelo seu profissionalismo.

Ao prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos e ao técnico de seu laboratório Dr. Riccardo Lacchini pela disponibilidade e colaboração com os experimentos de PCR.

À profa. Dra. Evelin Cappelari Carnio da Escola Enfermagem de Ribeirão Preto - USP e ao técnico de seu laboratório Marcelo Eduardo Batalhão pela disponibilidade e colaboração com as dosagens de nitrato.

Ao técnico e também amigo, Marcelo Eduardo Batalhão, um agradecimento mais que especial, por todo o suporte em todos os sentidos, durante este período.

Ao amigo de todas as horas Ulisses. Não há palavras que expressem o meu profundo agradecimento, por toda a ajuda prática, teórica e psicológica que, pacientemente, me concedeu.

Aos grandes amigos Paulinho, Janaína, Patrícia e Juliana pelo auxílio em todos os momentos durante o desenvolvimento deste projeto e por serem extremamente prestativos. Muito obrigada por estarem sempre disponíveis (domingo à noite, durante festas juninas...), e pela agradável convivência e amizade.

Às amigas de laboratório, Kátia, Jóice e Natália. Vocês foram muito importantes, cada uma no seu momento, cada uma na sua contribuição específica. Muito obrigada pelo compromisso, dedicação e principalmente, disposição!

Às alunas de IC, Ana Paula e Marjory, pela ajuda no dia a dia do laboratório e ótima convivência.

Ao Fernando Silva Carneiro e Zidonia pela disponibilidade e dicas valiosíssimas sobre o desenvolvimento do trabalho.

À amiga Hariane, pela imensa ajuda de sempre, pelos conselhos e pela partilha das angústias inerentes ao processo de produção desta pesquisa. Obrigada, Flor, por tornar meus dias de trabalho mais divertidos e animados!

Ao meu pai, que não tendo as mesmas oportunidades de estudo, valorizou e tornou possível cada um dos meus passos como estudante. À minha mãe, que apesar de não ser cientista me iniciou nos caminhos da ciência. E a ambos pela compreensão em relação às minhas poucas visitas, pela força e motivação que contribuíram muito para que este trabalho fosse realizado.

À minha irmã Letícia Nacano, sempre solícita, por suas palavras preciosas, apoio e auxílio dispensados desde que apareceu em minha vida.

À minha prima, Érica Cristine, meu sincero agradecimento pelas valiosas revisões durante a fase de correção dessa dissertação.

Ao Vinícius e seus pais que compreenderam minha ausência e sempre me apoiaram nesta caminhada. Sem vocês a minha vinda para Ribeirão Preto teria sido muito mais difícil.

Às queridas amigas Marô, Elô, Mila, Lorena e Maria que compartilharam minhas angústias e me aconselharam em todos os momentos desta caminhada. Aqui em Ribeirão Preto, vocês foram a minha família.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

Finalmente, sou grata pelo bem que recebi e igualmente pelos obstáculos.

"Sabendo que a tribulação produz a paciência e a paciência, a experiência e a experiência, a esperança." Romanos 5:3 e 4.

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia" Clarice Lispector

RESUMO

LEITE, LN. Consequências do consumo crônico de etanol sobre a reatividade e expressão dos componentes do sistema endotelinérgico em corpo cavernoso de rato. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo vasoconstritor que exerce um papel importante no controle do tônus do corpo cavernoso. No entanto, tem sido demonstrado que esse peptídeo também está envolvido na disfunção erétil (DE) associada ao diabetes mellitus e hipertensão. O consumo de etanol aumenta os níveis plasmáticos de ET-1 e a resposta contrátil a esse peptídeo em tecidos vasculares. Os objetivos deste trabalho foram o de estudar as consequências funcionais e celulares do consumo crônico de etanol sobre o sistema endotelinérgico no corpo cavernoso e identificar os mediadores envolvidos nessa resposta. Ratos Wistar foram divididos em dois grupos, os quais receberam água (controle) ou solução de etanol a 20% (vol./vol.) por seis semanas. Nossos resultados mostram que em tiras de tecido cavernoso, não houve alteração da resposta de relaxamento induzida pela adrenomedulina e nitroprussiato de sódio após tratamento com etanol. Com relação à acetilcolina, o consumo crônico de etanol reduziu o relaxamento induzido pelo referido agonista. Além disso, observou-se redução dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato no grupo etanol. Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento crônico com etanol reduz a síntese/liberação do NO tecidual sem prejuízo em sua via de sinalização. O tratamento com etanol aumentou os níveis plasmáticos de ET-1 e a resposta contrátil induzida por esse peptídeo em corpo cavernoso de ratos. A contração induzida pela fenilefrina ou KCl 120 mmol/L não foi afetada pelo tratamento com etanol, sugerindo que os efeitos do tratamento sobre a reatividade do corpo cavernoso não são inespecíficos. O antagonista dos receptores ET_B, o BQ788, não alterou a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais do grupo controle ou etanol. Não houve alteração da resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620, um agonista seletivo dos receptores ET_B. O tratamento com etanol não alterou os níveis de RNAm assim como a expressão protéica dos receptores ET_B. Esses resultados mostram que o aumento da contração induzida pela ET-1 após tratamento com etanol não está relacionado à redução do relaxamento mediado pelos receptores ET_B. Em nosso estudo o BQ123, antagonista seletivo dos receptores ETA, deslocou a curva cumulativa para ET-1 para direita em músculo cavernoso de ratos do grupo controle com consequente redução do valor de pD₂. O mesmo não foi observado no tecido de animais do grupo etanol, indicando que a resposta mediada pelos receptores ET_A está favorecida após o tratamento. O consumo de etanol não afetou os níveis de RNAm dos componentes do sistema endotelinérgico (ET-1, ECE-1, receptores ET_A e ET_B) e das isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (eNOS, nNOS e iNOS), porém aumentou a expressão protéica do receptor ET_A, da ET-1 e da iNOS no músculo cavernoso. O tratamento com etanol induziu aumento do estresse oxidativo sistêmico assim como dos níveis de ânions superóxido (•O₂-) no corpo cavernoso. As espécies reativas de oxigênio (ERO), os metabólitos derivados da NOS e da ciclooxigenase (COX) modulam negativamente a contração induzida por ET-1 e mostraram-se importantes no aumento da contração à ET-1 observada no corpo cavernoso de animais tratados com etanol. O Y27632, um inibidor da Rho-cinase, reduziu a resposta contrátil da ET-1 em corpo cavernoso de animais de ambos os grupos. Portanto, os resultados mostram que o tratamento com etanol aumenta a resposta contrátil da ET-1 por mecanismos que envolvem o aumento da expressão dos receptores ET_A e das ERO e a via da Rho-cinase.

Palavras chaves: Etanol, Corpo cavernoso, Endotelina-1, Reatividade.

ABSTRACT

LEITE, LN. Consequences of chronic ethanol consumption on the reactivity and expression of components of the endothelinergic system in the rat corpus cavernosum. Thesis (Masters) - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Endothelin-1 (ET-1) is a vasoconstrictor peptide that plays an important role in controlling the tone of the cavernosal smooth muscle (CSM). ET-1 is also involved in erectile dysfunction (ED) associated with diabetes mellitus and hypertension. Ethanol consumption increases plasma levels of ET-1 and the contractile response to this peptide in vascular tissues. This study aimed to investigate the cellular and functional consequences of chronic ethanol consumption on the endothelinergic system in CSM as well as the mediators involved in this response. Male Wistar rats were treated with ethanol 20% (vol./vol.) for 6 weeks. Reactivity experiments were performed on isolated CSM. Our findings show that adrenomedullin and sodium nitroprusside-induced relaxation was not altered after treatment with ethanol. On the other hand, acetylcholine-induced relaxation was reduced in CSM from ethanol-treated rats. Moreover, chronic ethanol consumption reduced plasma and CSM nitrate levels. These observations suggest that chronic ethanol consumption reduces NO synthesis/release but does not alter NO signaling pathway. Ethanol consumption increases plasma levels of ET-1 and the contractile response to this peptide in isolated CSM. Chronic ethanol consumption did not alter the contraction induced by phenylephrine or KCl 120mmol/L in isolated CSM strips. These observations suggest that the effects of chronic ethanol consumption on the CSM reactivity are nonspecific. BQ788, a selective ET_B receptor antagonist, did not alter ET-1induced contraction in CSM from both control and ethanol-treated rats. The relaxation induced by IRL1620, a selective ET_B receptors agonist, was not affected by ethanol consumption. mRNA levels and protein expression for ET_B receptor were not affected by ethanol consumption. We concluded that CSM hyper-reactivity to ET-1 is not related to reduction of ET_B receptor-mediated relaxation. BQ123, a selective ET_A receptor antagonist, shifted the concentration-response curve for ET-1 to the right in CSM from control rats. However, this response was not observed in CSM from ethanol group, indicating that the response mediated by the ET_A receptor is favored after ethanol treatment. It was found that chronic ethanol consumption did not alter mRNA levels for the components of the endothelinergic system (ET-1, ECE-1, ET_A and ET_B receptors) and the isoforms of nitric oxide synthase (NOS) (eNOS, nNOS and iNOS), but increased protein expression for ET_A receptor, ET-1 and iNOS. Ethanol induced systemic and cavernosal oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS), metabolites derived from cyclooxygenase (COX) and NOS, modulate negatively ET-1-induced contraction and appear to be important mediators of ethanol-induced ET-1 hyper-reactivity in the isolated CSM. Y27632, a Rho-kinase inhibitor, reduced ET-1induced contraction in CSM from both control and ethanol-treated rats. Our results show that chronic ethanol consumption increases ET-1 induced contraction in isolated CSM and that this response is mediated by the Rho-kinase pathway and an increase in ROS generation and ET_A receptor expression.

Keywords: Ethanol, Corpus cavernosum, Endothelin-1, Reactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC Adenilil ciclase

ACh Acetilcolina

ADH Álcool desidrogenase

AM Adrenomedulina

AMPc 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA Análise de variância

°C Unidade de temperatura Celsius

Ca²⁺ Cálcio

CaCl₂.H₂O Cloreto de cálcio diidratado

cDNA DNA complementar

CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais

cm Centímetro

CO₂ Dióxido de carbono

COX Enzima ciclooxigenase

Ct Ciclo threshold

DE Disfunção erétil

DEPC Dietil pirocarbonato

DMTU Dimetiltiouréia

EC₅₀ Concentração de droga que produz 50% do efeito máximo

ECE-1 Enzima conversora de endotelina-1

E_{max} Efeito máximo produzido pelo agonista

eNOS Enzima óxido nítrico sintase endotelial

EPM Erro padrão da média

ERK1/2 Quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2

ERO Espécies reativas de oxigênio

ET-1 Endotelina-1

ET_A Receptor da endotelina-1 do subtipo A

ET_B Receptor da endotelina-1 do subtipo B

fmol/L Unidade de concentração Fentomolar

g Unidade de medida Grama

GTP Trifosfato de guanosina

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HCl Ácido clorídrico

iNOS Enzima óxido nítrico sintase induzível

IP₃ Trifosfato de inositol

KCl Cloreto de potássio

KH₂PO₄ Fosfato de potássio monobásico

L Unidade de medida Litro

L-NAME Nω-nitro-L-arginina metil éster

MDA Bis-malonaldeído

mg Unidade de medida Miligrama

MgSO₄.7 H₂0 Sulfato de magnésio heptahidratado

mL Unidade de medida Mililitro

MLC₂₀ Cadeia leve da miosina

MLCP Fosfatase da cadeia leve da miosina

mmol/L Unidade de concentração Milimolar

mN Unidade de medida MiliNewton

NaCl Cloreto de sódio

NAD(P)H oxidase Nicotinamida-adenina-dinoclueotídeo (fosfato) oxidase

NaHCO₃ Bicarbonato de sódio

NANC Não-adrenérgico não-colinérgico

ng Unidade de medida Nanograma

NIH National Institute of Health

nm Nanômetro

nmol/L Unidade de concentração Nanomolar

nNOS Enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO Óxido nítrico

NO₂ Dióxido de nitrogênio

NOS Enzima óxido nítrico sintase

NPS Nitroprussiato de sódio

O₂ Gás oxigênio

•O₂ Ânion superóxido

O₃ Ozônio

•OH Radical hidroxila

OMS Organização Mundial da Saúde

ONOO Peroxinitrito

p<0,05 Valor mínimo de probabilidade menor que 0,05 estatisticamente

significativo

PCR Reação em cadeia da polimerase

 pD_2 Logaritmo negativo da EC_{50}

Peg-catalase Catalase polietilenoglicol

PG Prostaglandina

PGI₂ Prostaciclina

pH Potencial hidrogeniônico

Rho Família de genes homólogos da Ras

RhoA Membro A da pequena proteína G da família Rho

RNA Ácido ribonucleico

RNAm RNA mensageiro

SC-236 4-[5-(4-Clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazole-1-yl]-

benzenosulfonamida

SC-560 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazole

SDS Solução de dodecil sulfato de sódio

SENAD Secretaria Nacional Antidrogas

SOD Enzima superóxido dismutase

TBARS Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBE Tampão tris-borato-EDTA

TBS-T Tampão de salina Tris com Tween 20

Tiron 4,5-dihidroxi-ácido-1,3-benzenodisulfonico dissódico monohidratado

 TXA_2 Tromboxana A_2

URL Unidades relativa de luz

μg Unidade de medida Micrograma

μL Unidade de medida Microlitro

μmol/L Unidade de concentração Micromolar

VOC Canal para cálcio operado por voltagem

Y27632 Inibidor da Rho-cinase

1400W N-[3-(aminometil)benzil] acetamina

7-Ni 7-nitroindazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO17		
2 OBJETIVOS	26	
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28	
3.1 Animais	29	
3.2 Grupos experimentais	29	
3.3 Medida dos níveis de etanol no sangue	29	
3.4 Medida dos níveis de ET-1 no plasma	30	
3.5 Estudo funcional da reatividade do corpo cavernoso in vitro	30	
3.5.1 Protocolos experimentais para avaliação do efeito do tratamento com etano sobre a reatividade do corpo cavernoso		
3.5.2 Protocolos experimentais para o estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade do corpo cavernoso à ET-1		
3.5.2.1 Efeito dos antagonistas BQ788 e BQ123 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1	o 32	
3.5.2.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620		
3.5.2.3 Efeitos do tiron, peg-catalase e DMTU sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1		
3.5.2.4 Efeitos do L-NAME, 1400W e 7-nitroindazol sobre a resposta de contração induzida pela ET-1		
3.5.2.5 Efeitos do SC-560 e SC-236 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1		
3.5.2.6 Efeitos do Y27632 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1	34	
3.6 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma	34	
3.7 Detecção de •O2 tecidual pelo método de quimioluminescência da lucigenina	34	
3.8 Determinação dos níveis de nitrato plasmático e tecidual	35	
3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time-PCR)	36	
3.9.1 Extração e homogeneização do tecido	36	
3.9.2 Extração do RNA	36	
3.9.3 Precipitação do RNA.	36	
3.9.4 Quantificação do RNA	37	
3.9.5 Gel de integridade do RNA	37	
3.9.6 Reação de Transcriptase Reversa	37	
3.9.7 Real Time-PCR	38	
3.10 Western immunoblotting	39	

3.11 Análise estatística
4 RESULTADOS41
4.1 Medida dos níveis de etanol no sangue
4.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso dos animais
4.3 Medida dos níveis plasmáticos de ET-1
4.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso seco (g) das tiras de tecido cavernoso
4.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de corpos cavernosos44
4.5.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a contração máxima induzida pelo KCl 120 mmol/L em tiras do tecido cavernoso
4.5.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a contração induzida pela fenilefrina e ET-1 em tiras do tecido cavernoso
4.5.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o relaxamento induzido pela ACh, NPS e AM em corpo cavernoso
4.5.4 Mecanismos envolvidos no aumento da resposta de contração à ET-1 em corpo cavernoso de ratos induzido pelo tratamento com etanol
4.5.4.1 Efeito dos antagonistas seletivos para receptores ET _A e ET _B sobre a resposta de contração induzida pela ET-1
4.5.4.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620 em corpo cavernoso de ratos
4.5.4.3 Avaliação da participação de ERO no aumento da resposta de contração à ET-1 induzido pelo tratamento com etanol em corpos cavernosos
4.5.4.4 Avaliação dos efeitos das NOS no aumento da resposta de contração à ET-1 induzido pelo tratamento com etanol em corpos cavernosos
4.5.4.5 Avaliação dos efeitos do SC-560 e SC-236 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpos cavernosos
4.5.4.6 Avaliação dos efeitos do Y27632 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpos cavernosos
4.6 Efeito do consumo de etanol sobre o estresse oxidativo sistêmico e tecidual58
4.7 Consequência do consumo crônico de etanol sobre a concentração plasmática e tecidual de nitrato
4.8 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm
4.9 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão dos receptores ET _A e ET _B , ECE-1, ET-1, eNOS total e fosforilada (Ser ¹¹⁷⁷), iNOS e nNOS
5 DISCUSSÃO64
REFERÊNCIAS74
ANEXO85

I INTRODUÇÃO

A disfunção erétil (DE) é definida pelo *National Institute of Health* (NIH) *Consensus Statement* (1993) como a incapacidade de alcançar e/ou manter uma ereção peniana suficiente que permita uma relação sexual satisfatória. A DE é considerada um importante problema de saúde pública que afeta a vida dos pacientes e seus respectivos parceiros, sendo que sua prevalência aumenta consistentemente com a idade. Estima-se que mais de 150 milhões de homens no mundo são afetados pela DE e que esse número poderá dobrar até o ano de 2025 (Feldman et al., 1994).

Em um estudo realizado em 18 grandes cidades brasileiras, englobando as cinco regiões do país, Abdo e colaboradores (2006) entrevistaram 2862 homens com idade entre 18 e 70 anos. A prevalência de DE encontrada neste grupo foi de 45%. Outros estudos regionais realizados no Brasil demonstraram que a prevalência da DE varia de 31,9% a 46% (Moreira et al., 2001; Reis e Abdo, 2010). A DE compromete o bem-estar e a qualidade de vida dos pacientes e seus parceiros, além de alertar para a existência de outras doenças, principalmente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular. A presença de doenças cardiovasculares, assim como tabagismo, diabetes mellitus, estilo de vida sedentário e alcoolismo são considerados importantes fatores de risco para a DE (Feldman et al., 1994).

O pênis é constituído por um par de estruturas eréteis situadas em sua porção dorsal, os corpos cavernosos, e por uma terceira estrutura que se localiza ventralmente, o corpo esponjoso. O corpo esponjoso forma distalmente a glande peniana além de rodear e sustentar a uretra (Lue, 2003). Proximalmente, no períneo, os dois corpos cavernosos se bifurcam formando a crura. Cada corpo cavernoso (crus) insere-se na superfície inferior do ramo púbico do ísquio e é envolvido pelo músculo isquiocavernoso correspondente. O bulbo, que contém a uretra, atravessa o diafragma urogenital entre a crura (Figura 1) (Eardley; Sethia, 2003).

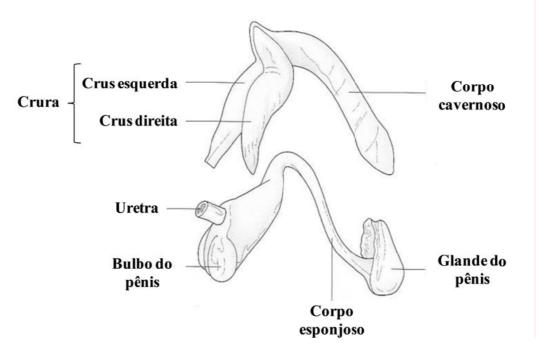


Figura 1: Representação esquemática da estrutura anatômica peniana. Esquema adaptado de Eardley e Sethia, 2003.

O interior de cada corpo cavernoso é constituído por pequenas cavidades vasculares, designadas sinusóides, lacunas ou espaços cavernosos, que são delimitados por endotélio, o que permite considerar o pênis um órgão essencialmente vascular. Os espaços sinusóides são sustentados por uma rede de trabéculas formadas por tecido muscular liso e conjuntivo, com fibras elásticas e de colágeno, onde existem numerosas arteríolas e terminações nervosas (Lue, 2003). A vasculatura do tecido erétil difere de vários leitos vasculares por ser composta de arteríolas e espaços sinusoidais preenchidos por sangue, onde ambos são delineados por células de músculo liso vascular e endotelial (Burnett, 1995; Andersson; Stief, 1997; Andersson, 2001).

A ereção peniana é determinada por mudanças de pressão nos sinusóides do tecido cavernoso. Durante o estímulo sexual, a liberação de óxido nítrico (NO) [predominantemente pela ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em nervos não adrenérgico não colinérgicos (NANC) e células endoteliais locais] estimula o relaxamento das células do músculo liso dos vasos e do corpo cavernoso (Burnett, 1995; Andersson; Stief, 1997; Andersson, 2001). A dilatação das arteríolas resulta em aumento do fluxo sanguíneo (impulsionado pela força da pressão arterial) para os sinusóides. Simultaneamente, ocorre relaxamento da musculatura lisa trabecular levando à dilatação dos espaços sinusoidais. O relaxamento do músculo liso vascular das artérias que irrigam o corpo cavernoso, juntamente com o relaxamento das células do músculo liso que delineiam os sinusóides, permite a estes expandir e acomodar o aumento do influxo sanguíneo. Ao expandirem-se contra a túnica albugínea, os sinusóides comprimem as veias responsáveis pelo efluxo sanguíneo e assim reduzem a drenagem venosa cavernosa (mecanismo veno-oclusivo) e aumentam a pressão intracavernosa. A resultante do aumento do influxo devido à dilatação arteriolar e à redução do efluxo resultante da veno-oclusão é a base da ereção peniana (Fregonesi et al., 1999).

O NO é o principal estimulador da vasodilatação do corpo cavernoso e da ereção peniana (Rajfer et al., 1992; Burnett, 1995). O NO é formado, a partir do aminoácido Larginina, pela ação enzimática da óxido nítrico sintase (NOS), que existe como três principais isoformas: nNOS, NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). As três isoformas estão presentes no pênis, contudo, nNOS e eNOS são as principais isoformas expressas constitutivamente no tecido cavernoso (Rajfer et al., 1992; Burnett, 1995).

Na ausência de estímulo sexual, a constrição da vasculatura e do tecido cavernoso mantém o pênis no estado flácido (não ereto). A contração do tecido cavernoso é principalmente determinada em resposta à noradrenalina, liberada de terminais nervosos simpáticos. Essa contração estreita o lúmen arteriolar e as cavidades sinusóides restringindo o

fluxo sanguíneo para manter uma baixa pressão intracavernosa e, consequentemente, o pênis no estado flácido (Burnett, 1995; Andersson; Stief, 1997; Andersson, 2001).

Além da noradrenalina, a endotelina-1 (ET-1), um peptídeo composto por 21 resíduos de aminoácidos, também tem participação importante no processo de contração do tecido cavernoso (Mills et al, 2001c). As células do músculo liso do tecido cavernoso não somente respondem, mas também sintetizam a ET-1 (Granchi et al., 2002). A síntese da ET-1 ocorre a partir da pré-pró-ET-1 que é clivada por endopeptidases em big ET-1, um peptídeo formado por 38 resíduos de aminoácidos que é posteriormente clivado pela enzima conversora de endotelina (ECE) em ET-1 (D'Orleans-Juste et al., 2002). A expressão de ambos os receptores do sistema endotelinérgico, ET_A e ET_B, tem sido demonstrada em tecido cavernoso de humanos (Granchi et al., 2002) e de diversas espécies animais como coelho (Holmquist et al., 1992), rato (Bell et al., 1995; Daí et al., 2000) e bovinos (Parkkisenniemi; Klinge, 1996).

A ET-1 induz a vasoconstrição do tecido cavernoso *in vivo* predominantemente por meio da ativação de receptores ET_A (Daí et al., 2000). No pênis, os efeitos biológicos da ET-1 envolvem a formação de trifosfato de inositol (IP₃), aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ e ativação da via de sinalização da RhoA/Rho-cinase (Mills et al., 2001b). A RhoA é uma pequena proteína G que é ativada pela ligação ao GTP e que pertence a uma família de genes homólogos da Ras (Rho), membro A (RhoA). A ativação da RhoA estimula efetores tais como a Rho-cinase ou ROCK. A Rho-cinase ativada induz a fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) e inibe a atividade desta, tendo como efeito final a inibição da defosforilação da cadeia leve da miosina (MLC₂₀) favorecendo a contração do músculo liso e consequente flacidez do corpo cavernoso (Leite et al., 2007). Além disso, a ativação da via RhoA/Rho-cinase pela ET-1, via receptores ET_A, induz redução da expressão da eNOS em corpo cavernoso (Carneiro et al., 2008b).

Ao contrário dos receptores ET_A, a ativação dos receptores ET_B no músculo cavernoso induz vasodilatação via liberação de NO (Ari et al., 1996). O NO pode influenciar a resposta erétil por ativação direta da via de relaxamento do músculo liso ou pela atenuação da ação vasoconstritora da ET-1 (Mills et al., 2001a). Em ratos, a injeção intrapeniana de ET-1 induz um efeito bifásico dose-dependente. Doses mais baixas induzem um efeito vasodilatador, enquanto doses mais altas, um efeito vasoconstritor, sendo que os efeitos deste peptídeo são dependentes da quantidade e do local onde são liberados (Ari et al., 1996).

Além dos efeitos fisiológicos descritos, tem sido demonstrado que a ET-1 está envolvida na fisiopatologia da DE. As respostas contráteis para a ET-1 estão aumentadas no corpo cavernoso em modelo de diabetes mellitus tipo I (Chang et al., 2003). Esse aumento

está associado à maior expressão de receptores ET_A e ativação da via de sinalização da Rhocinase que leva não somente ao aumento da atividade contrátil da ET-1, mas também diminui a atividade da maquinaria molecular responsável pelo relaxamento do tecido cavernoso no diabetes. A ET-1 também contribui para a DE em modelos de hipertensão (Carneiro et al., 2008b). Os mecanismos desencadeados pela ET-1, neste caso, são o aumento da atividade de vias de sinalização das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2 – extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), Rho-cinase e redução da expressão da eNOS.

Componentes da via metabólica do ácido araquidônico estão presentes no pênis. As células musculares lisas do corpo cavernoso de humanos sintetizam e metabolizam vários prostanóides localmente (Andersson; Wagner, 1995). Tomboxana (TX) A_2 e prostaglandina (PG) $F_{2\alpha}$ foram evidenciadas como possíveis moduladores da contração do corpo cavernoso, enquanto PGE_1 e PGE_2 modulam o relaxamento desse tecido (Andersson, 2001).

Como mencionado anteriormente, o alcoolismo é considerado um importante fator de risco no desenvolvimento da DE (Feldman et al., 1994). O alcoolismo é uma doença crônica, caracterizada pela dependência de etanol. Seu uso indevido é um dos principais fatores que contribui para a diminuição da saúde mundial sendo responsável por 3,8% das mortes. Segundo dados de 2004 da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo consomem etanol, sendo o Brasil o quarto maior consumidor de álcool das Américas (OMS, 2011). Levantamento realizado em 2007 pelo SENAD (Secretaria Nacional Antidrogas) investigou os padrões de consumo de álcool na população brasileira. O estudo foi realizado em 143 municípios do país e detectou que 52% dos brasileiros acima de 18 anos faz uso de bebida alcoólica pelo menos uma vez ao ano. Do conjunto dos homens adultos, 11% bebem diariamente e 28% de 1 a 4 vezes por semana (SENAD, 2007).

Foi demonstrado que indivíduos que consomem etanol cronicamente apresentam altos índices de DE cuja prevalência pode chegar a 75% (Fahrner, 1987). Além disso, homens que consomem etanol cronicamente também apresentam alta prevalência de disfunções sexuais, sendo as mais frequentes a dificuldade de ereção, ejaculação retardada e redução da frequência sexual (O'Farrell et al., 1997). Dentre essas, destaca-se a dificuldade de ereção como o problema mais comum associado ao consumo crônico de etanol (O'Farrell, 1990). Wetterling et al. (1999) demonstraram, em estudo com 322 sujeitos, que a prevalência de DE é de 6,5% em indivíduos que consomem grande quantidade de etanol frequentemente. Essa proporção é reduzida para 1,9% em indivíduos que consomem etanol ocasionalmente, mostrando que o padrão de consumo de etanol influencia na prevalência da DE.

O consumo crônico de etanol acarreta alterações significativas da função circulatória, figurando como um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Sun; Mayhan, 2001; Husain et al., 2005, 2007; Tirapelli et al., 2008a). O etanol tem sido descrito como um importante indutor de disfunção endotelial que leva a alteração da reatividade vascular em aorta (Tirapelli et al., 2006a), carótida (Tirapelli et al., 2006b), leito mesentérico (Tirapelli et al., 2008a) e circulação peniana (Lizarte et al., 2009). Uma vez que a DE é um processo majoritariamente vasculogênico e intimamente relacionado a doenças cardiovasculares (Watts et al., 2007), o consumo crônico de etanol é atualmente considerado um fator de risco no desenvolvimento da DE.

Alguns estudos experimentais foram realizados com o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos nas alterações da função erétil associadas ao consumo crônico de etanol. Nesse sentido, Saito et al. (1994) mostraram que o tratamento de coelhos com solução de etanol 5% (v/v) por seis semanas resultou em aumento da contração induzida pela fenilefrina e KCl, mostrando que o consumo crônico de etanol altera a reatividade do corpo cavernoso a diferentes agentes vasoconstritores. Kim et al. (2000) sugeriram que os efeitos do etanol sobre a reatividade do corpo cavernoso estariam relacionados ao acetaldeído, um metabólito do etanol. Os autores mostraram que a incubação de músculo cavernoso de coelhos com diferentes concentrações de acetaldeído leva a redução do relaxamento induzido pela acetilcolina e estímulo elétrico, sugerindo que o acetaldeído contribui na DE associada ao etanol uma vez que reduz a biodisponibilidade do NO.

Mais recentemente, Aydinoglu et al. (2008) observaram que após tratamento de camundongos com etanol por 7 e 14 dias houve redução da resposta de relaxamento do corpo cavernoso à acetilcolina. No entanto, não houve alteração no relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio ou estímulo elétrico. Análise histológica do tecido mostrou que o tratamento com etanol induziu lesão endotelial. Esses resultados sugerem que as alterações de reatividade do corpo cavernoso associadas ao consumo de etanol envolvem a redução do NO endotelial, que é decorrente da lesão endotelial.

Em estudo recente de nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que o tratamento com solução de etanol 20% (v/v) por quatro semanas induziu aumento da resposta de contração ao estímulo elétrico e redução do relaxamento induzido pela acetilcolina em corpo cavernoso de ratos (Lizarte et al., 2009). Observamos ainda que o tratamento com etanol induz redução dos níveis plasmáticos de testosterona, que tem sido sugerido como um importante mecanismo envolvido na DE associada ao etanol (Gluud et al., 1988). Esses resultados sugerem que o etanol induz disfunção endotelial com consequente alteração da reatividade do músculo

cavernoso, fato que pode contribuir na fisiopatologia da DE. Além do efeito direto que exerce sobre a função erétil, o consumo de etanol acentua os efeitos causados por outros fatores indutores da DE. Nesse sentido, mostramos recentemente que o consumo de etanol acentua a redução do relaxamento do corpo cavernoso à acetilcolina observada em animais diabéticos (Lizarte et al., 2010). Apesar do conhecimento de que o consumo de etanol altera a reatividade do corpo cavernoso, não há relatos descrevendo o efeito do consumo de etanol sobre a resposta do corpo cavernoso à ET-1.

O consumo crônico de etanol modifica as funções vasculares em decorrência de alteração do funcionamento do endotélio vascular que é reconhecido como uma importante unidade funcional envolvida na regulação do tônus vascular. Entre os diferentes fatores de contração produzidos pelo endotélio está a ET-1, cuja liberação é afetada pela ingestão crônica de etanol. O primeiro estudo que relacionou consumo de etanol e o sistema endotelinérgico vascular mostrou que o etanol aumenta a liberação de ET-1 e ET-2 em cultura de células endoteliais da veia umbilical de humanos de maneira dependente da concentração (Tsuji et al., 1992). Posteriormente, Nanji et al. (1994) mostraram que o consumo de etanol por 1, 2 e 4 semanas aumenta os níveis plasmáticos de ET em ratos. Slomiany et al. (1999), mostraram que o consumo de etanol aumenta os níveis de ET-1 na mucosa bucal de ratos. Além de aumentar os níveis plasmáticos e teciduais de ET-1, o tratamento com etanol (20% v/v por 2, 6 ou 10 semanas) induz aumento da reatividade vascular à ET-1 em anéis de carótida (Tirapelli et al., 2006b). O aumento da resposta contrátil à ET-1 em carótida é consequência da redução da expressão de receptores ET_B endoteliais responsáveis pela vasodilatação. O tratamento crônico com etanol aumenta a resposta pressora da ET-1 e a expressão de receptores ET_A no coração e leito mesentérico de ratos (Tirapelli et al., 2008b). Por outro lado, houve redução da expressão de receptores ET_B na aorta e no rim de animais tratados cronicamente com etanol. Esse conjunto de resultados sugere que o aumento da reatividade vascular à ET-1 e a alteração dos níveis de receptores ET_A e ET_B pode ser importante para a patogênese das complicações cardiovasculares associadas ao etanol. Além de afetar a resposta mediada pela ET-1, o tratamento com etanol é capaz de alterar a produção desse peptídeo em diferentes tecidos. Slomiany et al. (2000) mostraram que o consumo crônico de etanol leva ao aumento da atividade da ECE-1 na mucosa bucal de ratos com consequente aumento da produção de ET-1.

Apesar dos estudos mostrarem que o consumo de etanol afeta a reatividade do corpo cavernoso, pouco se sabe sobre os mediadores associados aos efeitos induzidos pelo consumo crônico de etanol na função erétil. Como mencionado anteriormente, a ET-1 está associada à

fisiopatologia da DE em modelos de diabetes e hipertensão. Uma vez que o consumo de etanol aumenta a produção de ET-1, assim como sua resposta em diferentes vasos, esse peptídeo poderia ter papel importante na DE associada ao consumo de etanol.

O dano vascular causado pelo etanol inclui alteração do estado de oxidação e consequente formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Haorah et al., 2005). A ativação do receptor ET_A leva à formação de ERO sendo que esse processo está associado a doenças cardiovasculares como a aterosclerose (Romero et al., 2009). As ERO oxidam biomoléculas como proteínas e DNA e iniciam o processo de lipoperoxidação que leva a disfunção endotelial (Mutlu-Teurkoglu et al., 2000). Além da disfunção vascular, as ERO têm sido descritas como importantes mediadores moleculares no processo de contração vascular induzido pelo etanol (Zheng et al., 1998; Li et al., 2001; Yogi et al., 2010). Além disso, as ERO desempenham importante função na alteração da reatividade do músculo cavernoso na DE em modelos experimentais de hiperhomocisteinemia e diabetes (Jones et al., 2005; Morano et al., 2007).

Apesar do pouco conhecimento sobre a formação de ERO na circulação peniana após ingestão crônica do etanol, estudos empregando vasos mostram que o aumento do estresse oxidativo induzido pelo etanol aparece como um importante mecanismo da disfunção vascular. Nesse sentido, Sun e Mayhan (2001) observaram que o etanol induz estresse oxidativo e reduz o relaxamento de artérias cerebrais mediado pelo NO, sendo esse efeito revertido por antioxidantes. Husain et al., (2005) sugeriram que o consumo crônico de etanol induz hipertensão por um mecanismo de disfunção endotelial causada pelas ERO com consequente redução da produção de NO. Mais recentemente, esse mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o consumo de etanol induz aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase, aumento da resposta contrátil à fenilefrina e redução da resposta de relaxamento à acetilcolina em aorta de ratos (Husain et al., 2007). Esse conjunto de dados sugere que o passo inicial para a disfunção endotelial associada ao etanol envolve a formação de ERO, sendo esse processo mediado pela enzima NAD(P)H oxidase. Essa enzima é uma importante fonte de ânions superóxido (\bullet O₂) nas células endoteliais e do músculo liso vascular (Mohazzab et al., 1994; Griendling et al., 2000).

A enzima NAD(P)H oxidase é constituída por 5 subunidades: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox. As subunidades p47phox, p67phox e p40phox estão localizadas no citoplasma enquanto as subunidades gp91phox e p22phox estão localizadas na membrana, onde elas ocorrem sob a forma de uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo *b558*. A NAD(P)H oxidase encontra-se normalmente em seu

estado não ativado, mas após estimulação celular, a subunidade p47phox é fosforilada e as unidades citoplasmáticas formam um complexo que se transloca até a membrana. Tal complexo se associa ao citocromo b558 para formar a enzima ativa que tem por função transferir elétrons do substrato (NADPH ou NADH) para o O_2 , formando assim o O_2 (Paravicini; Touyz, 2008). É interessante notar que a ET-1 é um importante ativador da NAD(P)H via receptores ET_A com consequente aumento dos níveis de O_2 nas células endoteliais (Romero et al., 2009).

Apesar de alguns estudos descreverem que o consumo crônico de etanol acarreta aumento da pressão arterial, alterações das respostas vasculares a agentes vasoativos e liberação de substâncias que controlam as funções vasculares, não há relatos sobre o efeito da ingestão crônica de etanol sobre o sistema endotelinérgico no músculo cavernoso. Portanto, torna-se pertinente o estudo das consequências funcionais e celulares do consumo crônico de etanol sobre o sistema endotelinérgico no corpo cavernoso bem como dos mediadores envolvidos nessa resposta, uma vez que esse peptídeo desempenha importante função no processo de ereção. Com base nos dados da literatura, a hipótese do presente estudo é a de que o consumo crônico de etanol estimule o sistema endotelinérgico peniano que por sua vez induzirá a produção de ERO (via NAD(P)H oxidase) e ativação das vias de sinalização da RhoA/Rho-cinase. Esse processo levaria a alterações da reatividade do músculo cavernoso e da biodisponibilidade do NO.

2 OBJETIVOS

Estudar as consequências do consumo crônico de etanol sobre o sistema endotelinérgico pela avaliação da reatividade do corpo cavernoso à ET-1, bem como os mecanismos envolvidos na modulação da resposta induzida por esse peptídeo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com idade média entre 40 e 50 dias (200-250 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Todos os protocolos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP (Protocolo 10.1.1084.53.6).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos:

- 1) Grupo controle: recebeu água "ad libitum";
- 2) Grupo experimental tratado com etanol (etanol): recebeu diariamente uma solução de etanol a 20% em água (vol./vol.).

Os animais do Grupo Etanol foram condicionados a um breve período de adaptação gradativa do consumo de etanol, para adaptação dos mesmos ao modelo experimental. Tal adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%, tendo início a fase experimental após a terceira semana de tratamento (Tirapelli et al., 2006a,b). Ao término da 6ª semana do início do experimento, animais dos dois grupos foram mortos para realização dos experimentos funcionais e bioquímicos. Foram realizadas mensurações do peso inicial e final dos animais dos dois grupos experimentais.

3.3 Medida dos níveis de etanol no sangue

O sangue foi coletado da aorta abdominal de animais anestesiados com cetamina/xilasina (80/10mg/Kg), utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram acondicionadas em tubos contendo o conservador fluoreto de sódio (1 mg/mL de sangue). Em seguida as amostras foram transferidas para frascos contendo cloreto de sódio (1 mg/ mL de sangue) e água (1 mL/mL de sangue). Os frascos foram então devidamente lacrados e

colocados no Head Space HSS4A (Shimadzu, Japão). Em seguida, as amostras foram injetadas no cromatógrafo GC17A (Shimadzu, Japão). Uma curva padrão de calibração foi realizada previamente onde diferentes concentrações conhecidas de etanol (0,02 – 20 mg/mL) foram adicionadas ao sangue de animais controle. Os resultados foram expressos em g de etanol / L de sangue.

Objetivo: Verificar os níveis sanguíneos de etanol após 6 semanas de tratamento.

3.4 Medida dos níveis de ET-1 no plasma

O sangue dos animais anestesiados com isoflurano foi coletado da aorta abdominal utilizando-se seringas heparinizadas. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 4.000g por 15 minutos e o plasma coletado e armazenado a -80°C. O ensaio para determinação da ET-1 plasmática foi realizado pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) seguindo-se as instruções do fabricante do kit utilizado (*EDN1*, USCN-LIFETM, China).

Objetivo: Avaliar se ocorre alteração da produção de ET-1 após tratamento com etanol.

3.5 Estudo funcional da reatividade do corpo cavernoso in vitro

Os animais foram anestesiados com isoflurano e posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. O pênis foi isolado do animal, no nível da sua fixação ao osso ísquio, removeu-se a veia dorsal peniana, uretra e tecido esponjoso. Duas preparações de tira de corpo cavernoso de 1 cm foram obtidas de cada pênis. Em seguida, as tiras do tecido cavernoso foram montadas em sistema de banho de órgão isolado contendo solução de Krebs cuja composição é (mmol/L): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; NaHCO₃ 15; Glicose 5,5; CaCl₂.2H₂O 1,6; pH 7,4. Uma das extremidades do tecido foi conectada a um suporte fixo e ajustável e a outra a um transdutor isométrico de força. As modificações de tônus vascular foram registradas através do sistema de aquisição de sinais TRI201 (Panlab, Espanha) e processadas pelo software ChartPro 5 (ADInstruments, Austrália). Os tecidos foram mantidos a uma temperatura constante de 37°C

e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). As preparações permaneceram em repouso durante 60 minutos sob tensão de 3 mN para estabilização (Carneiro et al., 2008a,b). Em seguida, os tecidos foram estimulados com KCl (120 mmol/L) até a reprodução da amplitude da resposta máxima contrátil (Carneiro et al., 2008b).

3.5.1 Protocolos experimentais para avaliação do efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade do corpo cavernoso

A reatividade do corpo cavernoso foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta para ET-1 (0,1 nmol/L a 1 μmol/L) (Carneiro et al., 2008a,b) e fenilefrina (0,1 μmol/L a 100 μmol/L). As curvas para acetilcolina (ACh, 0,001 μmol/L a 1000 μmol/L), nitroprussiato de sódio (NPS, 10 nmol/L a 1000 μmol/L) e adrenomedulina (AM, 10 fmol/L a 0,1 μmol/L) foram obtidas em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10 μmol/L). A concentração de fenilefrina utilizada (10 μmol/L) nos protocolos de relaxamento induziu o mesmo nível de pré-contração nas preparações dos dois grupos experimentais. As respostas contráteis induzidas pela fenilefrina e ET-1 foram expressas como a porcentagem de contração relativa à amplitude da resposta máxima contrátil obtida com KCl 120 mmol/L. As respostas de relaxamento induzidas pela ACh, AM e NPS foram expressas como a porcentagem de relaxamento relativa à pré-contração com fenilefrina. A partir das curvas concentração-resposta, foram determinados os valores de pD₂ que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agonista que promove 50% do efeito máximo (EC₅₀), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}). As EC₅₀ foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa Prism® (GraphPad Software Corporation, EUA).

Após o término dos protocolos experimentais, os corpos cavernosos foram desidratados sobre papel filtro durante 24 horas e posteriormente pesados em balança analítica (Shimadzu- AUW220D).

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol altera a resposta induzida pela ET-1, fenilefrina, NPS, AM e ACh em corpo cavernoso de rato.

3.5.2 Protocolos experimentais para o estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do tratamento com etanol sobre a reatividade do corpo cavernoso à ET-1

3.5.2.1 Efeito dos antagonistas BQ788 e BQ123 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1

Curvas concentração resposta para ET-1(0,1 nmol/L a 1 μmol/L) foram obtidas após incubação por 30 minutos com BQ123 (1 μmol/L), um antagonista seletivo dos receptores ET_A. Em outra etapa do estudo, corpos cavernosos de ratos controle e etanol foram préincubados por 30 minutos com antagonista seletivo dos receptores ET_B, BQ788 (3 μmol/L).

Objetivo: Verificar a participação dos receptores ET_A e/ou ET_B no aumento da contração à ET-1 induzido pelo tratamento com etanol.

3.5.2.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620

Curvas concentração-resposta para o IRL1620 (0,001 a 10 nmol/L), agonista seletivo dos receptores ET_B, foram obtidas em corpos cavernosos de animais controle e etanol, précontraídos com fenilefrina (10 µmol/L).

Objetivo: Verificar se o tratamento com etanol altera o relaxamento mediado pelos receptores ET_B em corpo cavernoso de rato.

3.5.2.3 Efeitos do tiron, peg-catalase e DMTU sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1

A participação de ERO na contração induzida por ET-1 foi estudada por realização de curva concentração-resposta para esse agonista (0,1 nmol/L a 1 μ mol/L) em corpos cavernosos de animais controle e etanol, em presença do sequestrador de \bullet O₂-, tiron (100

µmol/L), ou sequestrador de •OH, DMTU (100 μmol/L), ou da enzima que decompõe o H₂O₂, peg-catalase (250 U/mL), pré-incubados durante 30 minutos.

Objetivo: Verificar se há participação das ERO na contração induzida pela ET-1 e avaliar a participação na resposta de contração após tratamento com etanol.

3.5.2.4 Efeitos do L-NAME, 1400W e 7-nitroindazol sobre a resposta de contração induzida pela ET-1

A participação dos metabólitos derivados das isoformas da NOS na contração induzida pela ET-1 foi estudada por realização de curva concentração-resposta para ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol na presença do inibidor não seletivo da NOS, L-NAME (100 μ mol/L), ou de inibidores seletivos para nNOS, 7-nitroindazol (7-Ni) (100 μ mol/L), e iNOS, 1400W (0,1 μ mol/L). Os tecidos foram pré-incubados com os inibidores por 30 minutos.

Objetivo: Verificar se o NO modula a contração induzida pela ET-1 e avaliar se o tratamento com etanol altera o efeito modulador do NO sobre a resposta de contração induzida pela ET-1.

3.5.2.5 Efeitos do SC-560 e SC-236 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1

A participação dos metabólitos derivados das isoformas específicas da enzima ciclooxigenase (COX) na contração induzida pela ET-1 foi estudada por realização de curva concentração-resposta para ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol na presença dos inibidores seletivos da COX-1, SC-560 (1 μmol/L) ou COX-2, SC-236 (10 μmol/L), pré-incubados por 30 minutos.

Objetivo: Verificar se há participação de metabólitos da COX na contração induzida pela ET-1 e avaliar a participação desses prostanóides na resposta de contração após tratamento com etanol.

3.5.2.6 Efeitos do Y27632 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1

A participação da Rho-cinase na contração induzida pela ET-1 foi estudada por realização de curva concentração-resposta para ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol na presença do inibidor Y27632 (1 μmol/L), pré-incubado por 30 minutos.

Objetivo: Verificar se há participação da Rho-cinase na contração induzida pela ET-1 e avaliar a participação dessa enzima na resposta de contração após tratamento com etanol.

3.6 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma

As amostras para esse ensaio foram preparadas adicionando: 25 μL de plasma, 25 μL de solução SDS e 1 mL de reativo de cor. As amostras foram aquecidas (100°C, 1 hora) e em seguida colocadas em gelo. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas (1600 g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado e a absorbância lida a 540 nm em placa de 96 poços em espectrofotômetro. O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malonaldeído (MDA) e representada como nmol/mL de plasma. O ensaio foi realizado por método colorimétrico pelo kit comercial *TBARS Assay* (Cayman Chemical Company, EUA)

Objetivo: Avaliar se o tratamento com etanol aumenta o estresse oxidativo sistêmico.

3.7 Detecção de •O₂ tecidual pelo método de quimioluminescência da lucigenina

O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/L de KH₂PO₄, 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação iniciou-se pela adição de NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μL) contendo amostra (50 μL), lucigenina (5 μmol/L) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura para cada amostra. O conteúdo protéico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os

resultados foram normalizados pela concentração protéica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativa de luz) / mg de proteína (Yogi et al., 2010).

Objetivo: Avaliar se o tratamento com etanol aumenta os níveis de ${}^{\bullet}O_2^{-}$ no corpo cavernoso de rato.

3.8 Determinação dos níveis de nitrato plasmático e tecidual

As amostras de sangue de ratos controle e etanol foram coletadas em tubos contendo 500 μL de heparina (10 U/mL) e centrifugadas (4000 g, 4°C, 20 minutos) para a obtenção do plasma. O plasma foi estocado à -80°C até o momento das dosagens de nitrato. O tecido foi homogeneizado em 500 μL de salina. Para as dosagens de nitrato plasmático e tecidual, procedeu-se a desproteinização de alíquotas de 50 μL das amostras por precipitação, utilizando 100 μL de etanol absoluto à 4°C, seguido de agitação e mantidas por 30 minutos em freezer (-20°C). Em seguida foram submetidas à centrifugação (10000 g, 25°C, 5 minutos).

A medida do nitrato foi realizada pela técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA). Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5,0 μL, que foi injetado na câmara de reação do analisador, contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1 N de HCl à 95°C) o qual converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio (O₃), formando dióxido de nitrogênio (NO₂). O NO₂ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra.

A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 μmol/L. Os valores de nitrato plasmático foram expressos em μmol/L. Analisou-se o conteúdo protéico das amostras teciduais pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração protéica de cada amostra e expressos como μmol/L/mg de proteína.

Objetivo: Avaliar se ocorre alteração na biodisponibilidade de NO após tratamento com etanol.

3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time-PCR)

3.9.1 Extração e homogeneização do tecido

Os corpos cavernosos de animais do grupo controle e etanol foram rapidamente isolados e congelados em nitrogênio líquido. Acrescentou-se 1mL de TRIZOL® (isotiocianato de guanidina em solução de fenol) aos tecidos congelados. A homogeneização foi realizada em gelo.

3.9.2 Extração do RNA

Após a incubação do homogenato durante 5 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 200 μL de clorofórmio para 1 mL de trizol. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (11800g, 15 minutos, 4°C), e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo.

3.9.3 Precipitação do RNA

A fase aquosa anteriormente transferida para novo tubo foi acrescida de $10\mu L$ de glicogênio (20 mg/mL) e $500 \mu L$ de isopropanol, ambos gelados. Os tubos foram misturados por inversão e incubados em - 80° C por, no mínimo, 3 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (11800g, 15 minutos, 4° C). O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (em água DEPC [dietil pirocarbonato] inativa 0,01%) ao pellet. As

amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas (7500g, por 5 minutos a 4°C). Verteu-se o sobrenadante, incubou-se o pellet a temperatura ambiente por 5-10 minutos. O pellet foi ressuspendido em $16~\mu L$ de água DEPC.

3.9.4 Quantificação do RNA

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 nm) no aparelho NANODROP (Thermo Scientific, USA). O critério de pureza utilizado foi a razão $260^{\text{Ácido}}$ $^{\text{nucléico}}/280^{\text{Proteína}}$ aproximadamente 1,8. Uma razão menor que 1,8 é indicativo de contaminação por proteínas, enquanto uma razão maior é indicativo de contaminação por fenol. A concentração foi fornecida em $ng/\mu L$, e utilizou-se para leitura $2~\mu L$ de amostra.

3.9.5 Gel de integridade do RNA

A agarose (1,2 g) foi dissolvida em 100 mL de Tris-borato-EDTA (TBE) 1x por aquecimento. Resfriou-se o gel sob água corrente e foram adicionados 2 μ L de brometo de etídio (0,5 μ g/mL), em capela de exaustão. Após esse procedimento foi realizada eletroforese para verificar a integridade do RNA pela visualização das bandas 18S e 28S.

Foi aplicado no gel, por poço, 5 μL de cada amostra de RNA a 200 ng/μL (1 μg de RNA) ressuspendido em água DEPC. A eletroforese foi feita nas condições de 80 volts por 60 minutos. O gel foi observado em ultravioleta e fotografado com câmera digital Kodak Digital Science DC120 Zoom (Eastman Kodak Company, Rochester, USA).

3.9.6 Reação de Transcriptase Reversa

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o RNA é usado como um molde para sintetizar cDNA. Para esta reação foi utilizado o Kit Multiscrib reverse transcription (Life Technologies). A reação foi preparada com 2 μL de tampão (10x), 2 μL de solução de

primers randômicos (10x), 0,8 μ L de solução de dNTPs (25x), 1 μ L de solução de enzima Multiscrib RT (50 U/ μ L), 1 μ L de inibidor de RNase (20 U/ μ L), 0,25 μ L de solução de primers oligo-dT (0,5 μ g/ μ L), 5 μ L de cada amostra de RNA (200 η g/ μ L), totalizando um volume de 20 μ L.

As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até as reações de *Real Time*-PCR.

3.9.7 Real Time-PCR

A expressão dos genes foram quantificadas pelo sistema TaqMan (Life Technologies). Este sistema utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de produto específico conforme este se acumula durante os ciclos de PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5′ e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3′. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada pela atividade da nuclease 5′ da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*, além de remover a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde.

A reação foi constituída de 5 μL de tampão TaqMan gene expression Master Mix (2x) (Life Technologies), 0,5 μL de cada ensaio TaqMan (20x) e 4 μL de cDNA (diluído 1:15), totalizando um volume de 10 μL com água Mili-Q. As amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos, em seguida a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no aparelho Step One Plus (Life Technologies). Para o controle negativo utilizou-se um tubo contendo somente a mistura de compostos para reação, sem amostra.

Foram analisados os seguintes genes (Life Technologies): pré-pró-ET-1 (Rn00561129_m1), ECE-1 (Rn00585943_m1), receptor ET_A (Rn00561137_m1), receptor ET_B (Rn00569139_m1), nNOS (Rn00583793_m1). Também foram avaliados os genes (Integrated DNA Technologies): iNOS (Rn.PT.47.13446725) e eNOS (Rn.PT.47.6917365). Utilizou-se o GAPDH (Rn.PT.47.12624405) como controle interno para a co-amplificação.

Fixou-se um valor de *treshold* para cada gene. O *treshold* é um nível de sinal *reporter* normalizado que é usado para determinação do Ct (ciclo *treshold*) em ensaios de *Real Time*. Este deve ser ajustado acima do sinal fluorescente de fundo emitido durante os primeiros ciclos de PCR, antes do instrumento de PCR em tempo real detectar a amplificação do produto de PCR (*baseline*). No entanto, deve ser suficientemente baixo para se encontrar dentro da região de crescimento exponencial de uma curva de amplificação.

O Ct é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas.

A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Calculou-se a média de Ct e desvio padrão das triplicatas. Quando o desvio padrão foi maior que 0,2 ciclos, o valor da triplicata mais discrepante foi excluído e recalculou-se a média. Os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra foram normalizados (\log_{10}) e os grupos foram comparados por teste "t" de Student.

Objetivo: Avaliar se ocorre alteração da expressão do RNAm da pré-pró-ET-1, ECE-1, dos receptores ET_A e ET_B , nNOs, eNOS e iNOS em corpo cavernoso após tratamento com etanol.

3.10 Western immunoblotting

Tecidos cavernosos dos animais dos grupos controle e etanol foram homogeneizados em um coquetel de inibidores usando um homogeneizador mecânico de tecidos. O ensaio de Lowry foi utilizado para medir a concentração de proteína. Após a quantificação proteica de cada amostra, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão Laemmli (6x). As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95°C e em seguida colocadas no gelo por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados rapidamente. Um total de 60 μg de proteínas foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%, 10% ou 7,5%) por 1hora e 30 minutos a 100V em aparelho para mini-gel (mini Protean III, Bio-Rad, CA, EUA). A porcentagem de acrilamida de 12% foi adequado para a separação das proteínas eNOS total e fosforilada (Ser¹¹⁷⁷), nNOS e iNOS; de 10% para ECE-1 e receptores ET_A e ET_B; e de 7,5% para ET-1. A seguir as proteínas foram eletricamente transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, EUA) a 100 V por 2 horas e 30 minutos. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração vermelho de Ponceau. As membranas foram incubadas em tampão de salina Tris (TBS-T) contendo Tris base (10 mmol/L), NaCl (150

mmol/L), Tween 20 (0,02%) e leite desnatado (7%) por 1 hora para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário por 12 horas a 4°C. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-ET_A (diluição 1:250, Santa Cruz Biotechnology), anti- ET_B (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-ET-1 (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-ECE-1 (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) (diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-eNOS total (diluição 1:1000, Sigma Aldrich), anti-nNOS (diluição 1:500, Cell Signaling Technology), anti-iNOS (diluição 1:500, Sigma Aldrich). A βactina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology) foi usada como um controle interno. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:1000) ligado a peroxidase por 1 hora e 30 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente. Os sinais foram revelados por quimioluminescência, pela membranas exposição das solução reveladora quimioluminescente (1:1) (Kit SuperSignal West Pico Chemilumiscent Substrate, Pierce, IL, EUA). A intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica utilizando-se o software Image J (versão 1.45s) para determinar o nível de expressão protéica. A intensidade das bandas foi medida e os sinais expressos em relação à intensidade da banda da β-actina em cada amostra.

Objetivo: Avaliar se ocorre alteração da expressão protéica dos receptores ET_A e ET_B , eNOS total e fosforilada (Ser^{1177}), nNOS, iNOS, ECE-1 e ET-1 em corpo cavernoso após tratamento com etanol.

3.11 Análise estatística

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni ou teste "t" de Student não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism[®] (versão 5.0 Prism, GraphPad, USA). Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Medida dos níveis de etanol no sangue

A concentração de etanol no sangue de animais tratados por 6 semanas foi de 1,91± 0,21 g/L, n=11 (aproximadamente 41mmol/L). Não foi detectado etanol no sangue de animais do grupo controle.

4.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso dos animais

O peso corporal dos ratos antes do início do tratamento não foi diferente entre os grupos etanol e controle. Houve menor ganho de peso nos animais do grupo etanol após 6 semanas de tratamento quando comparado ao grupo controle (Figura 2).

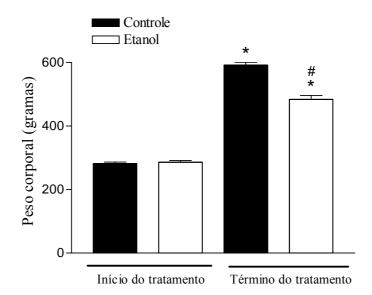


Figura 2: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso dos animais. As barras representam o peso corporal de ratos controle e etanol antes e após o tratamento por 6 semanas. Os dados representam a média ± EPM (n= 50 para cada grupo). * diferença significativa em relação aos grupos controle e etanol no início do tratamento; # diferença significativa em relação ao grupo controle ao término do tratamento (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.3 Medida dos níveis plasmáticos de ET-1

Observou-se aumento significativo dos níveis plasmáticos de ET-1 após tratamento com etanol (Figura 3).

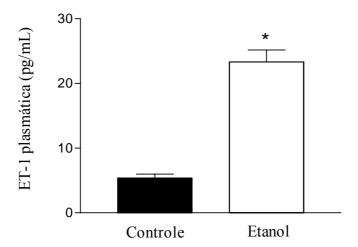


Figura 3: Efeito do consumo crônico de etanol sobre os níveis plasmáticos de ET-1. As barras representam os níveis plasmáticos de ET-1 em animais do grupo controle e etanol. Os dados representam a média \pm EPM de n=10 para o grupo controle e n=11 para o grupo etanol. * diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05, Teste t de Student).

4.4 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso seco (g) das tiras de tecido cavernoso

Os valores do peso seco (g) dos corpos cavernosos estão representados na Figura 4. O tratamento com etanol não alterou o peso seco das tiras de corpo cavernoso.

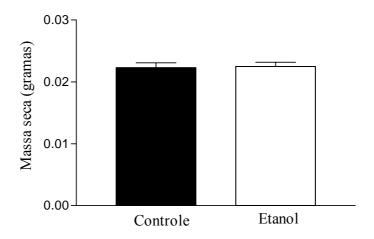


Figura 4: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o peso seco dos corpos cavernosos. As barras representam a massa seca de tiras de corpos cavernosos de ratos controle e etanol. Os dados representam a média \pm EPM (n= 50 para cada grupo).

4.5 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a reatividade de corpos cavernosos

4.5.1 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a contração máxima induzida pelo KCl 120 mmol/L em tiras do tecido cavernoso

O tratamento com etanol não promoveu alteração dos valores de contração máxima induzida pelo KCl 120 mmol/L quando comparado ao grupo controle (Figura 5).

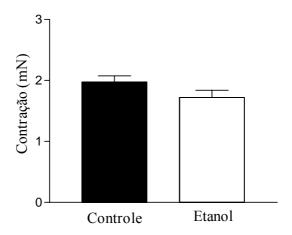


Figura 5: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a contração máxima induzida pelo KCl 120 mmol/L em corpos cavernosos. As barras representam a contração máxima (mN) induzida pelo KCl (120 mmol/L) em tiras de corpos cavernosos de ratos controle e etanol. Os dados representam a média ± EPM (n= 50 para cada grupo).

* A amplitude da resposta máxima contrátil obtida com KCl 120mmol/L nas tiras de tecido cavernoso não foi diferente entre os grupos experimentais. Portanto, a resposta de contração induzida pelos agentes contráteis usados no estudo foi expressa como a porcentagem de contração relativa à amplitude da resposta máxima contrátil obtida com KCl 120 mmol/L.

4.5.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a contração induzida pela fenilefrina e ET-1 em tiras do tecido cavernoso

Encontram-se representadas na Figura 6 curvas concentração-resposta para a fenilefrina e ET-1, obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso. O tratamento com etanol não promoveu alteração dos valores de E_{max} ou pD₂ para a fenilefrina, mas promoveu aumento dos valores de E_{max} para a ET-1. Os valores de E_{max} e de pD₂ correspondentes às curvas concentração-resposta para os agentes contráteis estão representados na Tabela 1.

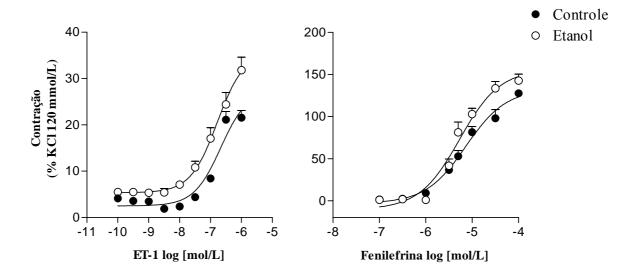


Figura 6: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1 e fenilefrina em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 e fenilefrina foram obtidas em corpo cavernoso de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média ± EPM da contração em resposta a uma dada concentração do agente contrátil.

Tabela 1: Valores de E_{max} (% KCl 120 mmol/L) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para ET-1 e fenilefrina, determinadas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol.

	E_{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
Fenilefrina	$127,6 \pm 4,2 \ (6)$	$142,7 \pm 7,7 \ (7)$	$5,14 \pm 0,06$	$5,30 \pm 0,08$
ET-1	$21,5 \pm 1,5$ (6)	$31.8 \pm 2.7 (7)^{a}$	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

a diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (p<0,05, Teste t de Student).

4.5.3 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre o relaxamento induzido pela ACh, NPS e AM em corpo cavernoso

Encontram-se representadas na Figura 7 curvas concentração-resposta para o NPS, ACh e AM, obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso. O tratamento com etanol não promoveu alteração dos valores de E_{max} ou pD₂ para o NPS e AM, mas promoveu redução dos valores de E_{max} para a ACh (Tabela 2).

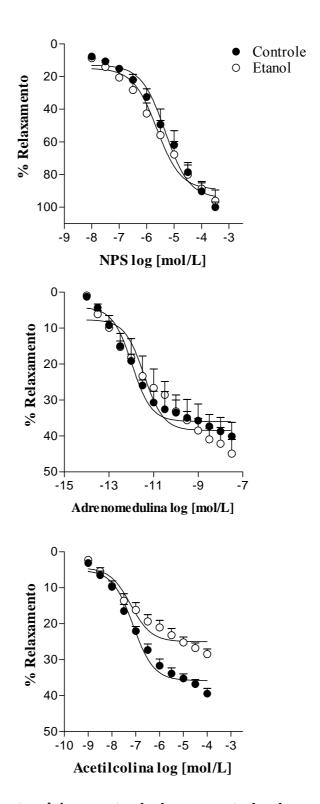


Figura 7: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo NPS, AM e ACh em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para o NPS, AM e ACh foram obtidas em corpo cavernoso de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média ± EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do agente vasorelaxante.

Tabela 2: Valores de E_{max} (% de relaxamento) e pD_2 calculados a partir de curvas concentração-resposta para NPS, AM e ACh em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol.

	E_{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
NPS	$100,0 \pm 3,1 \ (6)$	$96,0 \pm 6,5 (5)$	$5,44 \pm 0,17$	$5,76 \pm 0,21$
AM	$40,2 \pm 3,5 \ (7)$	$44.9 \pm 3.8 \ (7)$	$11,92 \pm 0,18$	$11,0 \pm 0,33$
ACh	$39,5 \pm 1,5 \ (10)$	$28,5 \pm 1,4 (7)^{a}$	$7,00 \pm 0,12$	$7,13 \pm 0,14$

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

a diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (p<0,05, Teste t de student).

4.5.4 Mecanismos envolvidos no aumento da resposta de contração à ET-1 em corpo cavernoso de ratos induzido pelo tratamento com etanol

4.5.4.1 Efeito dos antagonistas seletivos para receptores ET_A e ET_B sobre a resposta de contração induzida pela ET-1

Em tecidos de animais do grupo controle o BQ123 deslocou a curva concentraçãoefeito para ET-1 para direita com consequente redução do valor de pD_2 . O mesmo não ocorreu no grupo etanol na presença de BQ123. É importante notar que o aumento do valor de E_{max} para ET-1 nos animais tratados com etanol não desapareceu após a adição de BQ123 (Figura 8; Tabela 3). O BQ788 não alterou a resposta de contração induzida pela ET-1 em músculo cavernoso de animais do grupo controle e etanol (Figura 8; Tabela 3).

- Controle ▲ Controle + antagonista

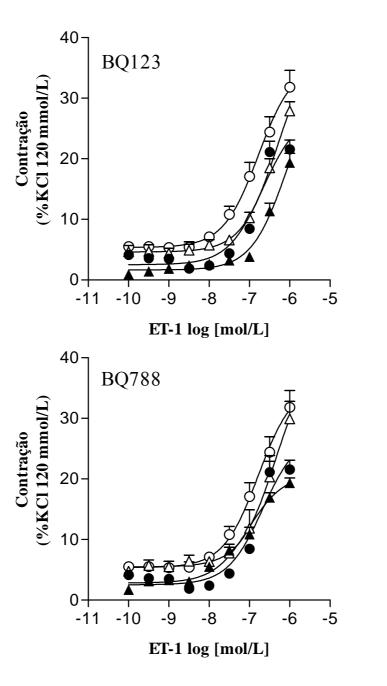


Figura 8: Avaliação do efeito do antagonista ET_A (BQ123) e ET_B (BQ788) na resposta induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 foram obtidas em corpo cavernoso de ratos controle e etanol na ausência ou presença de BQ123 (1 μ mol/L) ou BQ788 (3 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM da contração em resposta a uma dada concentração de ET-1.

Tabela 3: Valores de E_{max} (% KCl 120 mmol/L) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para ET-1 obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol, na ausência ou presença de BQ123 (1 μ mol/L) ou BQ788 (3 μ mol/L).

Antagonista	Е	E _{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol	
Ausente	21,5 ±1,5 (6)	$31,8 \pm 2,7 (7)^{a,b}$	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$	
BQ123	$19,3 \pm 1,5 (6)$	$27.8 \pm 1.5 (6)^{a,b}$	$6,67 \pm 0,06^{a}$	$6,92 \pm 0,07$	
BQ788	$19,3 \pm 0,8 \ (6)$	$31,6 \pm 2,7 \ (6)^{a,c}$	$7,35 \pm 0,08$	$6,90 \pm 0,11$	

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a diferença significativa em relação ao grupo controle na ausência do antagonista; ^b diferença significativa em relação ao grupo controle + BQ123; ^c diferença significativa em relação ao grupo controle + BQ788 (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.5.4.2 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620 em corpo cavernoso de ratos

Com o objetivo de estudar as consequências do consumo crônico de etanol sobre o relaxamento mediado pelos receptores ET_B , realizou-se curva concentração-resposta para IRL1620 (agonista seletivo ET_B) em tiras do tecido cavernoso de animais do grupo controle e etanol (Figura 9). Não houve diferença nos valores de E_{max} e pD₂ para o IRL1620 em animais do grupo etanol (E_{max} : 51,7 \pm 5,5%; pD₂: 9,38 \pm 0,14, n=5) quando comparados ao grupo controle (E_{max} : 51,4 \pm 3,0%; pD₂: 9,23 \pm 0,11, n=5).

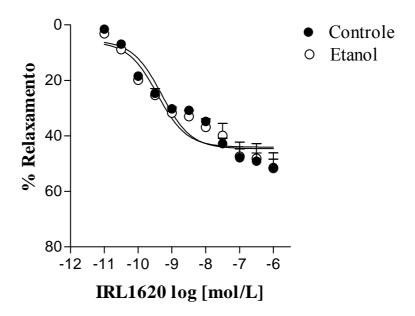


Figura 9: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para IRL1620 foram obtidas em corpo cavernoso de animais tratados com água (controle) ou solução de etanol 20% (etanol). Os pontos representam a média ± EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração de IRL1620.

4.5.4.3 Avaliação da participação de ERO no aumento da resposta de contração à ET-1 induzido pelo tratamento com etanol em corpos cavernosos

Os resultados obtidos na presença de tiron, peg-catalase ou DMTU estão representados na Figura 10 e Tabela 4. Em corpos cavernosos de ratos controle e etanol, a adição de tiron promoveu um aumento significativo do valor de E_{max} sem alteração dos valores de pD₂ para ET-1 em relação ao respectivo grupo na ausência do sequestrador.

A peg-catalase provocou aumento no E_{max} da ET-1 em corpos cavernosos de ratos controle, em relação ao respectivo grupo na ausência da enzima. Não se observou modificação no valor de pD_2 pela adição de peg-catalase. Em corpo cavernoso de animais etanol, o E_{max} da ET-1 não sofreu alteração em presença da peg-catalase, mas provocou aumento no valor de pD_2 , comparado com o respectivo grupo em ausência de peg-catalase.

A adição de DMTU não resultou em alteração no E_{max} da ET-1 em corpos cavernosos de ratos controle, assim como o valor de pD_2 , em relação ao respectivo grupo na ausência do sequestrador. O E_{max} da ET-1 foi aumentado pela adição de DMTU em corpos cavernosos de animais etanol, em relação ao respectivo grupo na ausência do sequestrador. Não foi observada alteração no valor de pD_2 nesse grupo após a adição de DMTU.

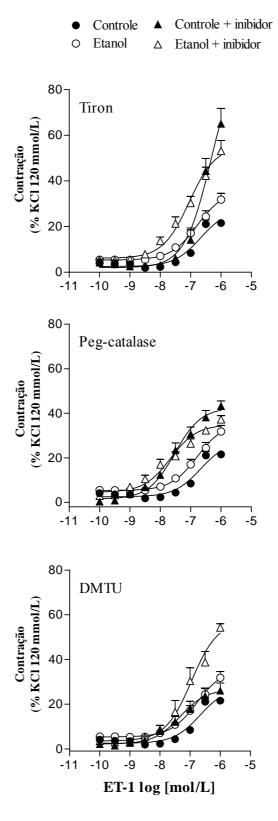


Figura 10: Efeito do tiron, peg-catalase e DMTU sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 foram obtidas em corpo cavernoso de animais controle e etanol na ausência ou presença de tiron (100 μmol/L), peg-catalase (250U/mL) ou DMTU (100 μmol/L). Os pontos representam a média ± EPM da contração em resposta a uma dada concentração de ET-1.

Tabela 4: Valores de E_{max} (% KCl 120mmol/L) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para ET-1 obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol, na ausência ou presença de tiron (100 μ mol/L), peg-catalase (250 U/mL) ou DMTU (100 μ mol/L).

	E _{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
Ausência	21,5 ± 1,5 (6)	$31.8 \pm 2.7 (7)^{b}$	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$
Tiron	$65,1\pm 6,7(5)^a$	$53.2 \pm 4.5 (5)^{a,b}$	$6,73 \pm 0,07$	$7,32 \pm 0,12$
Peg-catalase	$43,2 \pm 2,2 (5)^{a}$	$37.2 \pm 1.6 (6)^{b}$	$7,53 \pm 0,09$	$7,79 \pm 0,17^{a, b}$
DMTU	26,0 ± 3,4 (6)	$54.2 \pm 1.8 (5)^{a,b}$	$7,45 \pm 0,14$	$7,10 \pm 0,15$

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a diferença significativa em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor; ^b diferença significativa em relação ao grupo controle na ausência dos inibidores (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.5.4.4 Avaliação dos efeitos das NOS no aumento da resposta de contração à ET-1 induzido pelo tratamento com etanol em corpos cavernosos

Os resultados obtidos na presença de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS), 1400W (inibidor seletivo da iNOS) e 7-Ni (inibidor seletivo da nNOS) estão representados na Figura 11 e Tabela 5. Em corpos cavernosos de ratos controle e etanol, a adição de L-NAME promoveu um aumento significativo do valor de E_{max} para ET-1 sem alteração dos valores de pD₂ em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor.

O 1400W provocou aumento no E_{max} da ET-1 em corpos cavernosos de ratos controle, em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor. Observou-se aumento no valor de pD_2 pela adição de 1400W. Em corpo cavernoso de animais etanol, o E_{max} da ET-1 aumentou na presença do 1400W, mas não provocou alteração no valor de pD_2 quando comparado com o respectivo grupo na ausência do inibidor.

A adição de 7-Ni não resultou em alteração no E_{max} da ET-1 em corpos cavernosos de ratos controle. Observou-se aumento no valor de pD_2 , em relação ao respectivo grupo na ausência inibidor. O E_{max} da ET-1 não foi modificado pela adição de 7-Ni em corpos cavernosos de animais etanol, em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor. Não foi observada alteração no valor de pD_2 .

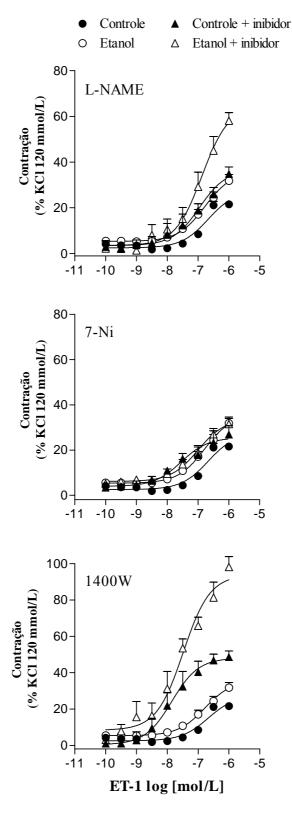


Figura 11: Efeito do L-NAME, 1400W e 7-Ni sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 foram obtidas em corpo cavernoso de animais controle e etanol na ausência ou presença de L-NAME (100 μmol/L), 1400W (0,1 μmol/L) ou 7-Ni (100 μmol/L). Os pontos representam a média ± EPM da contração em resposta a uma dada concentração de ET-1.

Tabela 5: Valores de E_{max} (% KCl 120 mmol/L) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para ET-1 obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol, na ausência ou presença de L-NAME (100 μ mol/L), 7-Ni (100 μ mol/L) e 1400W (0,1 μ mol/L).

	E _{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
Ausência	21,5 ± 1,5 (6)	$31,8 \pm 2,7$ (7)	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$
L-NAME	$34.8 \pm 3.0 (6)^{a}$	$58,1 \pm 3,4 \ (6)^{a,b}$	$7,35 \pm 0,25$	$7,15 \pm 0,21$
7-Ni	26,8 ± 3,9 (4)	$31,5 \pm 2,5$ (4)	$7,83 \pm 0,10^{a}$	$7,41 \pm 0,11$
1400W	$48,6 \pm 3,4 \ (4)^a$	$98,2 \pm 5,6 \ (4)^{a,b}$	$7,82 \pm 0,23^{a}$	$7,56 \pm 0,13$

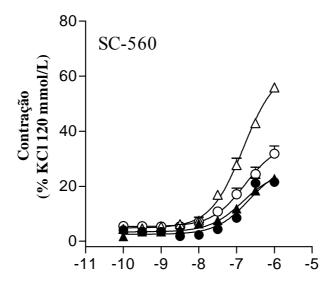
Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a diferença significativa em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor. (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.5.4.5 Avaliação dos efeitos do SC-560 e SC-236 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpos cavernosos

Os resultados obtidos na presença de SC-560 (inibidor seletivo da COX-1) ou SC-236 (inibidor seletivo da COX-2) estão representados na Figura 12 e Tabela 6. Em corpos cavernosos de ratos controle, a adição de SC-560 não alterou o valor de E_{max} e pD₂ da ET-1 em relação ao respectivo grupo controle na ausência do inibidor. Em corpo cavernoso de animais do grupo etanol, o SC-560 induziu aumento no E_{max} da ET-1. O valor de pD₂ da ET-1 não foi modificado na presença de SC-560, quando comparado ao respectivo grupo na ausência do inibidor.

O SC-236 não provocou modificação no valor do E_{max} e pD_2 da ET-1 em corpos cavernosos de ratos controle, em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor. Em corpo cavernoso de animais etanol, o E_{max} da ET-1 aumentou na presença do SC-236 sem alteração do valor de pD_2 , quando comparado com o respectivo grupo na ausência do inibidor.

Controle
 Controle + inibidor
 Etanol
 Etanol + inibidor



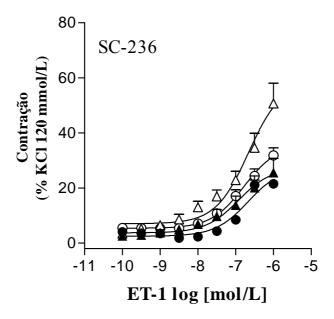


Figura 12: Efeito do SC-560 e SC-326 sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 foram obtidas em corpo cavernoso de animais controle e etanol na ausência ou presença de SC-560 (1 μmol/L) ou SC-236 (10μmol/L). Os pontos representam a média ± EPM da contração em resposta a uma dada concentração de ET-1.

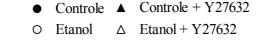
Tabela 6: Valores de E_{max} (% KCl 120mM) e pD₂ calculados a partir de curvas concentraçãoresposta para ET-1 obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol, na ausência ou presença de SC-560 (1 μmol/L) e SC-236 (10μmol/L).

	E _{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
Ausência	$21,5 \pm 1,5$ (6)	31.8 ± 2.7 (7)	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$
SC-560	$22,7 \pm 0,7$ (6)	$55.8 \pm 1.6 (5)^{a}$	$7,35 \pm 0,19$	$7,08 \pm 0,03$
SC-236	$25,6 \pm 5,2 \ (6)$	$50.7 \pm 7.3 \ (6)^{a}$	$7,28 \pm 0,16$	$7,17 \pm 0,12$

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a diferença significativa em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.5.4.6 Avaliação dos efeitos do Y27632 sobre a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpos cavernosos

Os resultados obtidos na presença do Y27632 estão representados na Figura 13 e Tabela 7. Houve redução dos valores de E_{max} para a ET-1 na presença do Y27632 em corpos cavernosos de animais do grupo controle e etanol. O Y27632 não alterou os valores de pD₂ para a ET-1.



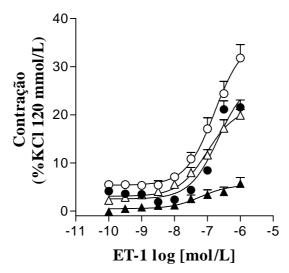


Figura 13: Efeito do Y27632 sobre a resposta contrátil induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol. Curvas concentração-resposta para ET-1 foram obtidas em corpo cavernoso de animais controle e etanol na ausência ou presença de Y27632 (1 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM da contração em resposta a uma dada concentração de ET-1.

Tabela 8: Valores de E_{max} (%KCl 120 mmol/L) e pD₂ calculados a partir de curvas concentração-resposta para ET-1 obtidas em preparações isoladas de corpo cavernoso de animais controle e etanol na ausência ou presença de Y27632 (1 μ mol/L).

	E _{max}		pD_2	
	Controle	Etanol	Controle	Etanol
Ausência	21,5 ± 1,5 (6)	31.8 ± 2.7 (7)	$7,04 \pm 0,03$	$7,23 \pm 0,11$
Y27632	$5.7 \pm 1.3 (6)^{a}$	$19.9 \pm 1.2 (5)^{a}$	$7,25 \pm 0,21$	$7,40 \pm 0,16$

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a diferença significativa em relação ao respectivo grupo na ausência do inibidor (p<0,05, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

4.6 Efeito do consumo de etanol sobre o estresse oxidativo sistêmico e tecidual

O tratamento com etanol aumentou os níveis de TBARS plasmático. Observou-se, utilizando o método de quimiluminescência da lucigenina, que corpos cavernosos de ratos tratados com etanol mostraram aumento no nível de $\bullet O_2^-$ basal, em relação àqueles encontrados em ratos controle (Figura 14).

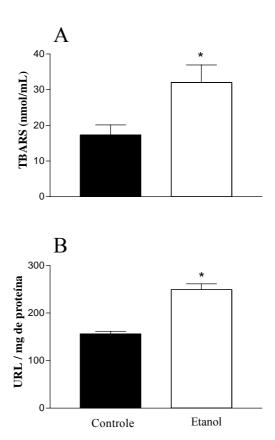


Figura 14: Efeito do tratamento com etanol sobre o estresse oxidativo sistêmico e tecidual. O estresse oxidativo sistêmico foi avaliado pelos níveis plasmático de TBARS (A) e os níveis de •O₂- tecidual pelo método de quimiluminescência da lucigenina (B). Os dados representam a média ± EPM (n=6 para cada grupo). * diferença significativa em relação ao grupo controle (p< 0,05, teste "t" de Student).

4.7 Consequência do consumo crônico de etanol sobre a concentração plasmática e tecidual de nitrato

O tratamento com etanol induziu redução significativa nos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato em relação àqueles encontrados em ratos do grupo controle (Figura 15).

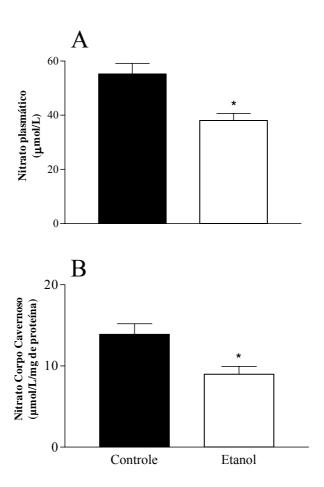


Figura 15: Efeito do tratamento com etanol sobre a concentração plasmática e tecidual de nitrato. As barras representam os níveis plasmáticos (A) e em corpos cavernosos (B) de nitrato em animais do grupo controle e etanol. Os dados representam a média ± EPM (n= 7 para cada grupo na determinação de nitrato plasmático; n=9 para o grupo controle e n=12 para o grupo etanol na determinação de nitrato tecidual). * diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05, Teste "t" de Student).

4.8 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm

Não houve diferença nos níveis de RNAm para os receptores ET_A e ET_B, pré-pró-ET-1, ECE-1 (Figura 16), eNOS, iNOS e nNOS entre os grupos controle e etanol (Figura 17).

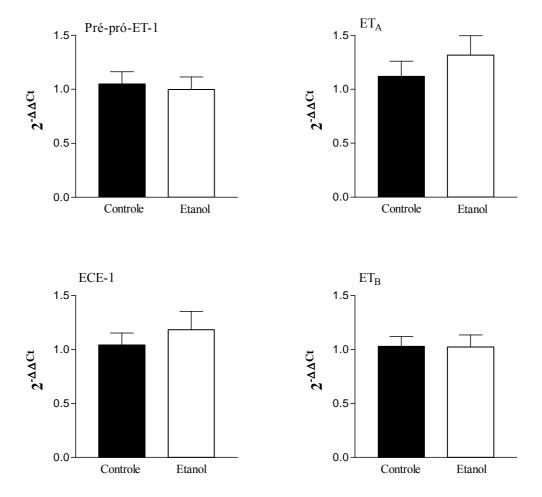
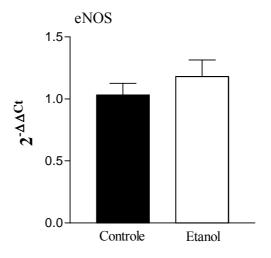
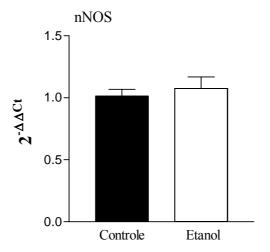


Figura 16: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da pré-pró-ET-1, receptores ET_A e ET_B , e ECE-1 em corpo cavernoso de rato. A figura mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (expressão relativa) para pré-pró-ET-1, receptores ET_A e ET_B , e ECE-1 em corpos cavernosos de ratos controle e etanol. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para GAPDH. As barras representam a média \pm EPM de n=10 para o grupo controle e n=9 para o grupo etanol.





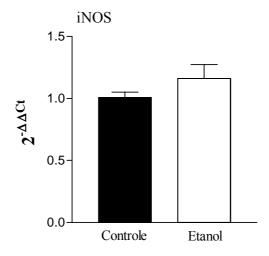


Figura 17: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre os níveis de RNAm da eNOS, nNOS e iNOS em corpo cavernoso de rato. A figura mostra os valores de 2^{-ΔΔCt} (expressão relativa) para eNOS, nNOS e iNOS em corpos cavernosos de ratos controle e etanol. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para GAPDH. As barras representam a média ± EPM de n=10 para o grupo controle e n=9 para o grupo etanol.

4.9 Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão dos receptores ET_A e ET_B, ECE-1, ET-1, eNOS total e fosforilada (Ser¹¹⁷⁷), iNOS e nNOS

O tratamento com etanol não alterou a expressão do receptor ET_B, ECE-1, nNOS, eNOS total e fosforilada (Ser¹¹⁷⁷), mas aumentou a expressão do receptor ET_A, ET-1 e iNOS no músculo cavernoso de rato (Figura 18;19).

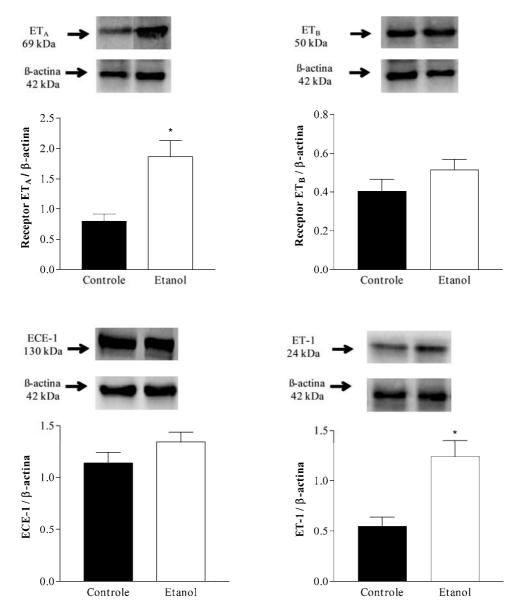


Figura 18: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão dos receptores ET_A e ET_B , ECE-1 e ET-1 em músculo cavernoso de rato. *Painel superior*: fotomicrografias representativas dos produtos obtidos por western immunoblotting. *Painel inferior*: barras mostrando os valores da densidade óptica relativa para os receptores ET_A e ET_B , ECE-1 e ET-1 em músculo cavernoso de rato. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente para β -actina. As barras representam a média \pm EPM de n=4-6.

^{*} diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05, Teste "t" de Student).

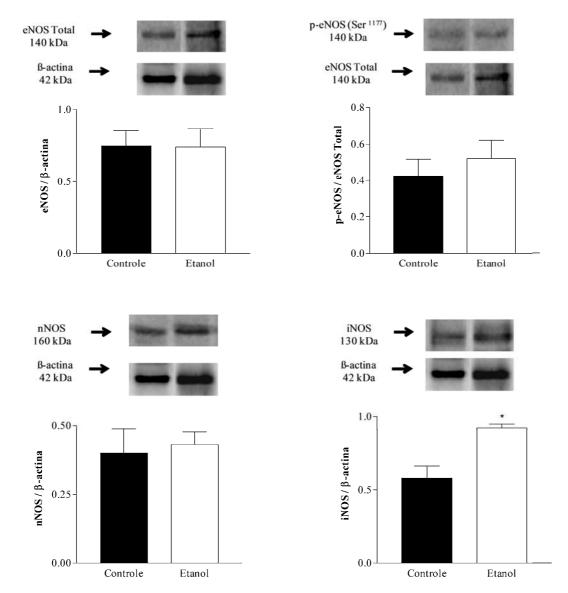


Figura 19: Efeito do tratamento crônico com etanol sobre a expressão eNOS total e fosforilada (Ser¹¹⁷⁷), nNOS e iNOS em músculo cavernoso de rato. *Painel superior*: fotomicrografías representativas dos produtos obtidos por western immunoblotting. *Painel inferior*: barras mostrando os valores da densidade óptica relativa para eNOS total e fosforilada (Ser¹¹⁷⁷), nNOS e iNOS em músculo cavernoso de rato. Os valores de eNOS total, nNOS e iNOS foram normalizados pelo produto correspondente para β-actina e os valores de eNOS fosforilada (Ser¹¹⁷⁷) pela eNOS total. As barras representam a média \pm EPM de n= 4-6. * diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05, Teste "t" de Student).

5 DISCUSSÃO

O consumo moderado de etanol é definido como o consumo de 1 a 3 doses* de bebida alcoólica por dia ou até 7 doses por semana, o que resulta em níveis sanguíneos de etanol na faixa de 5-25 mmol/L (National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism, 1999). O consumo de etanol acima do nível supracitado é considerado de alto risco em adultos. Em indivíduos etilistas crônicos, os níveis sanguíneos de etanol podem chegar até 100 mmol/L (Kalant, 1971). Em modelos animais a concentração sanguínea de etanol varia de 24 a 50 mmol/L (Chabielska et al., 1988; Schlorff et al., 1999; Izbeki et al., 2001; Hipólito et al., 2011). Em nosso estudo, a concentração de etanol no sangue foi de aproximadamente 41mmol/L. Essa concentração de etanol está dentro da faixa observada em estudos prévios em animais e humanos.

O consumo crônico de etanol está associado ao aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina (Chan et al., 1985) bem como da atividade do sistema renina-angiotensina, com consequente aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II (Ibsen et al., 1985). Em relação ao sistema endotelinérgico, foi demonstrado que o etanol (0-400 mmol/L) aumentou a liberação de ET-1 e ET-2 em cultura de células endoteliais da veia umbilical de humanos (Tsuji et al., 1992). Posteriormente, Nanji et al. (1994) mostraram que o tratamento de ratos com etanol por 1, 2 e 4 semanas levou ao aumento dos níveis plasmáticos de ET-1. Os autores observaram que na quarta semana de tratamento, o nível plasmático de ET-1 foi seis vezes maior do que aquele observado na segunda semana de tratamento. Nossos resultados corroboram esses estudos prévios uma vez que o tratamento com etanol aumentou os níveis plasmáticos de ET-1. É importante ressaltar que a ET-1 desempenha papel importante na DE associada ao diabetes mellitus e à hipercolesterolemia sendo que altos níveis plasmáticos de ET-1 foram descritos nessas condições (Francavilla et al., 1997; Sullivan et al., 1998). Portanto, o aumento dos níveis plasmáticos induzido pelo consumo crônico de etanol pode ser um dos mecanismos envolvidos na DE associada ao consumo de etanol. Outro aspecto importante é o de que o aumento dos níveis plasmáticos de ET-1 induzidos pelo consumo de etanol pode ser um fator que predispõe o indivíduo à DE.

No presente estudo, notamos que não houve diferença nos níveis de RNAm para ECE e pré-pró-ET-1, um peptídeo formado por 212 aminoácidos que dá origem á ET-1, entre os grupos experimentais. Também não foi observada alteração na expressão protéica da ECE-1. Entretanto, ocorreu aumento da expressão protéica para ET-1 em corpo cavernoso de ratos do grupo etanol. O aumento da expressão de ET-1 em corpos cavernosos de ratos tratados com etanol poderia ser decorrente de aumento da atividade da ECE-1. Foi mostrado que o consumo crônico de etanol

^{*} uma dose equivale a 8-10 gramas de etanol (MacMahon, 1987), que no contexto Brasileiro corresponde a 350 mL de cerveja ou 90 mL de vinho (SENAD, 2007).

leva ao aumento da atividade da ECE-1 tecidual o que pode acarretar aumento da produção de ET-1 (Slomiany et al., 2000). Portanto, evidenciamos em nosso estudo que o consumo de etanol induz aumento dos níveis sistêmicos e teciduais de ET-1.

Os resultados de reatividade do presente estudo foram analisados utilizando-se dois parâmetros: o E_{max} (efeito máximo induzido pelo agonista) e o pD₂ (-logEC₅₀). Alterações nos valores de E_{max} e pD₂ podem ser decorrentes de diferentes fatores, tais como alterações: na densidade dos receptores, na afinidade do agonista pelo receptor, no acesso da droga ao receptor (solubilidade do agonista, condições iônicas do líquido nutriente e pH), e de mecanismos de transdução intracelulares (Kenakin, 1997). Outro fator que influencia a análise dos efeitos promovidos pelos agonistas farmacológicos é a geração de substâncias por parte dos tecidos estudados. Muitas vezes essas substâncias geradas nos tecidos estabelecem interações sinérgicas ou antagônicas com os agonistas estudados, constituindo, assim, mecanismos locais moduladores da ação constritora e/ou dilatadora dos agonistas farmacológicos. Assim, alterações dos valores dos parâmetros de E_{max} e pD₂ nos fornecem indícios dos possíveis mecanismos, anteriormente citados, que poderiam estar envolvidos na alteração da reatividade do corpo cavernoso.

A resposta máxima contrátil da musculatura lisa do tecido cavernoso foi obtida com KCl 120 mmol/L. O aumento da concentração de K⁺ no meio extracelular promove despolarização da membrana plasmática e abertura de canais de cálcio operados por voltagem (VOC), levando ao aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e consequentemente à contração muscular (Berridge et al., 2005). Nossos resultados mostram que o tratamento com etanol por 6 semanas não alterou a resposta de contração induzida pelo KCl (120 mmol/L) assim como o peso seco das tiras de corpo cavernoso. Portanto, os resultados dos estudos de reatividade a agentes contráteis foram expressos em porcentagem de contração em relação ao KCl 120 mmol/L não sendo necessária a correção pelo peso das tiras de corpo cavernoso.

Em nosso estudo, o tratamento crônico com etanol reduz o relaxamento do corpo cavernoso induzido pela acetilcolina, resultado que corrobora achados prévios de Lizarte et al. (2009). A acetilcolina induz relaxamento via ativação de receptores muscarínicos do tipo 3 (M₃) presentes nas células endoteliais (Traish et al., 1995). O relaxamento mediado pelos receptores M₃ envolve a produção de NO que é considerado o principal mediador da vasodilatação e do relaxamento do músculo liso cavernoso (Andersson; Wagner, 1995; Burnett, 1997). No entanto, a resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo NPS, um doador de NO, não foi afetada pelo tratamento com etanol, sugerindo que não houve alteração na via de sinalização do NO nas células do músculo liso dos vasos e do corpo

cavernoso. Estes resultados corroboram com os descritos por Aydinoglu et al. (2008) e Lizarte et al. (2009), que observaram que o relaxamento de corpos cavernosos em resposta ao NPS não foi afetado pelo tratamento com etanol. Além disso, observou-se que houve redução dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato no grupo etanol, fato que sugere redução da biodisponibilidade do NO. Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento crônico com etanol reduz a síntese/liberação do NO tecidual sem prejuízo em sua via de sinalização. O potente peptídeo vasodilatador adrenomedulina é constituído por uma cadeia de 52 aminoácidos sendo produzido por vários tecidos incluindo as células endoteliais (Sugo et al., 1994) e do músculo liso vascular (Sugo et al., 1995). O NO de origem endotelial tem sido descrito como um dos principais mediadores intracelulares envolvidos na resposta de relaxamento induzida pela adrenomedulina (Miura et al., 1995; Boussery et al., 2005; Hipólito et al., 2011). Uma vez que não houve alteração do relaxamento induzido pela adrenomedulina após tratamento com etanol, podemos sugerir que a redução do relaxamento do corpo cavernoso induzida pelo consumo de etanol não é uma resposta generalizada e parece ser dependente do agonista utilizado.

Houve diferença significativa na amplitude da contração máxima induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais tratados com etanol quando comparado ao de animais controle. É importante notar que o tratamento com etanol não afetou a resposta de contração induzida pela fenilefrina ou KCl (120 mmol/L). Esse resultado corrobora estudo prévio de Lizarte et al. (2009) onde ratos tratados com solução de etanol 20% por quatro semanas não apresentaram alteração de reatividade do corpo cavernoso à fenilefrina ou KCl. Essa observação sugere que os efeitos do tratamento com etanol sobre a reatividade do corpo cavernoso não são inespecíficos. No corpo cavernoso de ratos a resposta de contração induzida pela ET-1 é mediada pelos receptores ET_A enquanto a ativação dos receptores ET_B leva ao relaxamento desse tecido (Carneiro et al., 2008a; Ritchie; Sullivan, 2011). O aumento da resposta de contração à ET-1, observado em nosso estudo, pode ser decorrente do aumento da resposta de contração mediada pelos receptores ET_A ou ainda redução da resposta de relaxamento induzida pelos receptores ET_B. Portanto, foi necessário estudar a ação de cada um desses receptores separadamente na reatividade.

O antagonista dos receptores ET_B, o BQ788, não alterou a resposta de contração induzida pela ET-1 em corpo cavernoso de animais do grupo controle ou etanol. Esse resultado confirma o fato de que os receptores ET_B não participam da resposta contrátil induzida pela ET-1 nesse tecido como descrito anteriormente por Carneiro et al. (2008b). Além disso, podemos concluir que não houve alteração da resposta de relaxamento mediada

pelos receptores ET_B no tecido dos animais tratados com etanol uma vez que não houve alteração da resposta de relaxamento induzida pelo IRL1620, um agonista seletivo dos receptores ET_B (Takai et al., 1992). O tratamento com etanol não alterou os níveis de RNAm assim como a expressão proteica dos receptores ET_B. Em conjunto, esses resultados mostram que o aumento da contração induzida pela ET-1 após tratamento com etanol não está relacionado à redução do relaxamento mediado pelos receptores ET_B.

Com o objetivo de verificar se o tratamento altera a contração mediada pelos receptores ET_A, curvas concentração resposta para ET-1 foram obtidas na presença de BQ123, um potente antagonista seletivo dos receptores ET_A. Ihara et al. (1992) foram os primeiros a descrever os efeitos do BQ123, mostrando em seu estudo que o antagonismo exercido é do tipo competitivo. Em nosso estudo o BQ123 deslocou a curva cumulativa para ET-1 para direita em músculo cavernoso de ratos do grupo controle com consequente redução do valor de pD₂. O mesmo não foi observado no tecido de animais do grupo etanol, indicando que a resposta mediada pelos receptores ET_A está favorecida após o tratamento com etanol. Essa resposta poderia ocorrer devido ao aumento da expressão desses receptores ou aumento da capacidade dos mecanismos intracelulares que participam da resposta mediada por esse receptor (Kenakin, 1992). Não houve diferença no nível de RNAm para receptor ET_A em corpos cavernosos de animais do grupo etanol quando comparado aos animais do grupo controle. Entretanto, ocorreu aumento da expressão proteica para esses receptores em corpo cavernoso de ratos do grupo etanol, sugerindo que o tratamento com etanol induz alterações pós-transcricionais como descrito anteriormente por Tirapelli et al. (2006b) e Hipólito et al. (2011). Estudos prévios de nosso laboratório mostram que o consumo crônico de etanol aumenta a expressão de receptores ETA no coração e leito mesentérico de ratos além de induzir redução da expressão de receptores ET_B na aorta, rim (Tirapelli et al., 2008b) e carótida (Tirapelli et al., 2006b). A alteração na expressão dos receptores endotelinégicos foi associada ao aumento da reatividade vascular à ET-1 e ao aumento da resposta pressórica induzida por esse peptídeo (Tirapelli et al., 2006b, 2008b).

A formação de ERO em diferentes tecidos, induzida pelo etanol, é relevante na fisiopatologia desse composto uma vez que o etanol é extensivamente metabolizado no figado à acetaldeído principalmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (Scott et al., 1999). O acetaldeído é posteriormente oxidado a acetato pela enzima aldeído desidrogenase, levando a geração de ERO (Mira et al., 1995). Husain et al. (2007), mostraram em seu estudo que o consumo de etanol induz aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase em aorta de ratos. Estudos também mostram que a ativação do receptor ET_A está envolvida no aumento da

atividade da enzima NAD(P)H oxidase em células endoteliais e aumento da produção de ERO em células do músculo liso (Duerrschmidt et al., 2000; Wedgwood et al., 2001). O termo estresse oxidativo originalmente conceituado como o dano molecular causado por uma desigualdade entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, principalmente pelo aumento de ERO (Cadenas et al., 1985), atualmente possui uma definição mais elaborada e relacionada mais especificamente ao comprometimento da sinalização e equilíbrio das reações de oxidação e redução, uma vez que se sabe que as ERO modulam vias de sinalização celulares específicas ("sinalização redox") (Montezano; Touyz, 2011; Sirker et al., 2011). As ERO são quimicamente reativas e incluem radicais livres como o •O₂, radical hidroxila (•OH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). São formadas por fontes não enzimáticas e enzimáticas como a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, NOS desacoplada, citocromo P450 e cadeia respiratória mitocondrial. Em condições fisiológicas as células endoteliais do tecido cavernoso são capazes de se proteger contra a formação de baixos níveis de ERO via enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutationa peroxidase (Dobrina et al., 1996) (Figura 20). O •O₂ e o H₂O₂ são particularmente importantes, pois ativam diferentes vias intracelulares de sinalização (Montezano; Touyz, 2011).

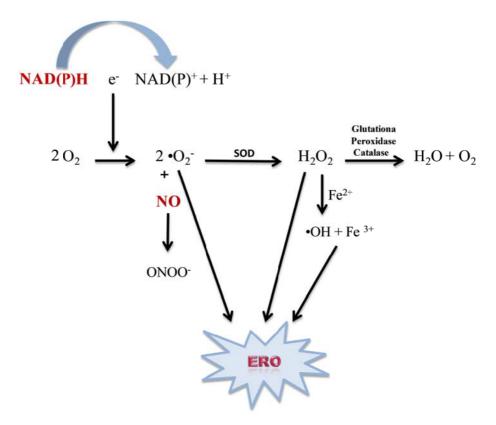


Figura 20: Via de formação de ERO. SOD: superóxido dismutase; •O₂: ânion superóxido; **H**₂O₂: peróxido de hidrogênio; •OH: radical hidroxila; **ERO**: espécies reativas de oxigênio; **NO**: óxido nítrico; **ONOO**: peroxinitrito. Esquema adaptado de Paravicini e Touyz, 2008.

Em nosso estudo, o tratamento com etanol induziu aumento do estresse oxidativo sistêmico assim como dos níveis de •O₂ no corpo cavernoso de ratos, corroborando com os resultados de aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase induzido pelo etanol já descrito na literatura. O estudo funcional mostrou que o tiron induziu aumento da resposta de contração à ET-1 em corpo cavernoso de animais de ambos os grupos, sugerindo que o •O₂⁻ modula negativamente a resposta contrátil induzida pela ET-1 nesse tecido. Em células endoteliais o •O₂ induz um rápido aumento na concentração citosólica de Ca²⁺ (Franceschi et al., 1990), que ativa a enzima eNOS, com consequente vasorelaxamento (Duarte et al., 2004). Portanto, o efeito modulatório negativo do •O₂ sobre a contração da ET-1 em corpo cavernoso de rato poderia estar relacionado à ação de relaxamento do •O₂-. Como mencionado anteriormente, o tratamento com etanol aumentou os níveis de •O2 no corpo cavernoso. No entanto, na presença de tiron, o aumento da contração à ET-1 não foi mais observado no corpo cavernoso de animais do grupo etanol quando comparado ao grupo controle. Esse resultado sugere a participação do •O₂ na resposta de aumento da contração à ET-1 observada em corpos cavernosos de ratos tratados com etanol. Jernigan et al. (2008), forneceram evidências que as ERO contribuem para o aumento da contração induzida pela ET-1 em artérias pulmonares após hipóxia, via Rho-cinase. De Andrade et al. (2009) observaram que a resposta contrátil à ET-1 em carótida de ratos hiperhomocisteinêmicos é modulada via receptores ETA por ativação da Rho-cinase, sugerindo a participação de •O2-. Portanto, a participação do •O2 na resposta de aumento da contração à ET-1 observada em corpo cavernoso de ratos tratados com etanol poderia estar relacionado a ativação da Rho-cinase por $\bullet O_2^-$.

É importante ressaltar que o •O₂- é reduzido pela SOD a H₂O₂ (Touyz; Schiffrin, 2004), o qual está envolvido na regulação de vias de sinalização que levam ao relaxamento muscular (Barlow; White, 1998). Nossos resultados mostram que na presença de peg-catalase, que transforma H₂O₂ em água e oxigênio, houve aumento no E_{max} da ET-1, sugerindo que H₂O₂ tem efeito modulador negativo sobre este parâmetro em corpos cavernosos de ratos do grupo controle. Já em corpos cavernosos de ratos do grupo etanol, a peg-catalase não acarretou alteração no E_{max} da ET-1. Esse resultado sugere que ocorreu perda do efeito modulatório negativo do H₂O₂ sobre a resposta de contração induzida pela ET-1. O prejuízo deste efeito do H₂O₂ poderia ser decorrente de um comprometimento na atividade da enzima SOD. Foi mostrado que em ratos hiperhomocisteinêmicos, diabéticos e hipertensos há redução da atividade da SOD no pênis (Hucks et al., 2004; Ushiyama et al., 2004; Bivalacqua et al., 2005), fato este que poderia explicar os resultados encontrados no presente estudo.

Em presença de DMTU não houve alteração no E_{max} da ET-1, sugerindo que •OH não atua como fator modulador em corpos cavernosos de ratos controle. Já em corpos cavernosos de ratos etanol, houve aumento no E_{max} da ET-1, sugerindo que •OH tem importante efeito modulador negativo nessa condição. Em condições fisiológicas, baixas concentrações de ERO favorecem a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . No entanto, se a concentração intracelular de • O_2^- é elevada, a reação favorece a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} perpetuando a reação de Fenton e formando maior quantidade de •OH (Castellani, 2007). Estes dados poderiam explicar os resultados encontrados em corpos cavernosos de ratos tratados com etanol. O aumento do estresse oxidativo nos corpos cavernosos induzido pelo etanol aumentou os níveis de • O_2^- o que poderia estar favorecendo a reação de Fenton nestes animais. Assim, haveria formação de quantidades elevadas de •OH em relação aos níveis do controle promovendo o efeito modulatório negativo observado.

A possibilidade da redução da capacidade endotelial em contrapor os efeitos contráteis da ET-1, foi avaliada através da inibição das diferentes isoformas de NOS. As três isoformas da NOS estão presentes no pênis, contudo, nNOS e eNOS são as principais isoformas expressas constitutivamente no tecido cavernoso (Rajfer et al., 1992; Burnett, 1995).

Em corpos cavernosos de ratos controle e etanol, houve aumento no E_{max} da ET-1, em presença de L-NAME e 1400W, mas não na presença de 7-Ni. Esses dados sugerem que o NO contrapõe a resposta de contração da ET-1 em corpos cavernosos de rato sendo essa resposta mediada principalmente via iNOS. No entanto, na presença de L-NAME ou 1400W, a resposta de contração à ET-1 em corpos cavernosos de animais etanol ainda permaneceu maior do que a observada em animais do grupo controle. Esse resultado sugere que não há alteração da produção de NO após tratamento com etanol. Nossos resultados mostram que o tratamento com etanol não causou alteração nos fatores pré-transcricionais da expressão de RNAm para as isoformas da NOS, e da expressão protéica da nNOS, eNOS total e fosforilada no resíduo de serina 1177 (eNOS ativada). Entretanto, ocorreu aumento da expressão protéica para a isoforma iNOS em corpo cavernoso de ratos do grupo etanol, sugerindo que o tratamento com etanol induz alterações em nível pós transcricional, podendo aumentar a síntese de NO. É importante destacar que o resultado com o 1400W em corpos cavernosos de animais do grupo controle sugere a presença constitutiva da iNOS nesse tecido. De fato, estudo prévio utilizando imunohistoquímica e PCR em tempo real mostrou a presença de RNAm e da proteína para a iNOS em corpo cavernoso de ratos (Lizarte et al., 2009).

A síntese de prostaglandinas (PG) tem sido demonstrada em tecido erétil *in vitro* (Daley et al., 1996) e a liberação basal de prostanóides incluindo PGF_{2α}, TXA₂, PGI₂, PGE₂ e

PGD₂ também foi observada em corpos cavernosos de coelhos (Azadzoi et al.,1992). Christ et al. (1990) demonstraram que a atividade contrátil espontânea observada em tecido erétil humano pode ser mediada por geração e liberação de produtos da COX. Por outro lado, também foi relatada a participação de metabólitos da COX com ação relaxante no corpo cavernoso. Hedlund e Andersson (1985) mostraram que PGE2 e PGE1 foram capazes de promover resposta de relaxamento no tecido trabecular e na artéria cavernosa. Miller et al. (1994) sugeriram que estes prostanóides ligam-se ao receptor acoplado a proteína G, EP2/EP4, estimulando a adenilato ciclase (AC), com consequente aumento do AMPc. Estes autores ainda mostraram que a produção de AMPc devido a PGE₁ é aumentada em ratos diabéticos. Em nosso estudo, a participação dos metabólitos derivados da enzima COX e de suas isoformas na contração induzida pela ET-1 foi estudada por realização de curva concentração-resposta para ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol na presença do inibidor seletivo da COX-1, SC-560, ou de inibidor seletivo para COX-2, SC-236. Houve aumento no E_{max} da ET-1, em presença de SC-560 e SC-236 em corpos cavernosos de ratos tratados com etanol, sugerindo que os metabólitos derivados das isoformas específicas da COX participam modulando negativamente a contração induzida pelo peptídeo após o tratamento com etanol. Esse resultado poderia ser consequência de um aumento na expressão das enzimas COX-1 e COX-2.

No pênis, os efeitos biológicos da ET-1 envolvem a formação do trifosfato de inositol (IP₃), aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ e a ativação da via de sinalização da RhoA/Rho-cinase (Mills et al., 2001b). O papel da enzima Rho-cinase na contração induzida pela ET-1 foi estudado por realização de curva concentração-resposta para ET-1 em corpo cavernoso de animais controle e etanol na presença Y27632. Em nosso estudo, o Y27632 reduziu a resposta contrátil da ET-1 em corpo cavernoso de animais do grupo controle e etanol evidenciando a importância da via da Rho-cinase na resposta contrátil da ET-1. Além disso, esse resultado sugere a participação dessa via no aumento da contração à ET-1 observada em corpo cavernoso após tratamento com etanol.

Em síntese, nosso estudo mostrou que o consumo crônico de etanol aumenta os níveis plasmáticos de ET-1e a resposta contrátil induzida por esse peptídeo em músculo cavernoso de rato. Estão envolvidos neste aumento os receptores ET_A , as ERO e a via da Rho-cinase. O consumo de etanol não afeta os níveis de RNAm dos componentes do sistema endotelinérgico e das isoformas da NOS, porém aumenta a expressão dos receptores ET_A , ET-1 e iNOS no músculo cavernoso. O tratamento com etanol induziu aumento do estresse oxidativo sistêmico assim como dos níveis de ${}^{\bullet}O_2^{-}$ no corpo cavernoso de ratos. Além disso, observamos que há

redução do relaxamento à acetilcolina e dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrato, fato que sugere redução da biodisponibilidade do NO. No entanto, a resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo NPS, um doador de NO, não foi afetada pelo tratamento com etanol, sugerindo que não houve alteração na via de sinalização do NO nas células do músculo liso dos vasos e do corpo cavernoso.

REFERÊNCIAS

Abdo CH, Oliveira WM, Scanavino MT, Martins FG. Disfunção Erétil: Resultados da vida sexual do Brasileiro. Rev Assoc Med Bras. 2006; 52(6): 424-9.

Andersson KE. Pharmacology of penile erection. Pharmacol Rev. 2001 Sep; 53(3):417-50.

Andersson KE, Stief CG. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. World J Urol. 1997; 15(1): 14-20.

Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. Physiol Rev. 1995 Jan; 75(1):191-236.

Ari G, Vardi Y, Hoffman A, Finberg JP. Possible role for endothelins in penile erection. Eur J Pharmacol. 1996 Jun 20; 307(1):69-74.

Aydinoglu F, Yilmaz SN, Coskun B, Daglioglu N, Ogulener N. Effects of ethanol treatment on the neurogenic and endothelium-dependent relaxation of corpus cavernosum smooth muscle in the mouse. Pharmacol Rep. 2008 Sep-Oct; 60(5):725-34.

Azadzoi KM, Kim N, Brown ML, Goldstein I, Cohen RA, Saenz de Tejada I. Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. J Urol. 1992 Jan; 147(1):220-5.

Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. Am J Physiol. 1998 Oct; 275(4 Pt 2):H1283-9.

Bell CR, Sullivan ME, Dashwood MR, Muddle JR, Morgan RJ. The density and distribution of endothelin 1 and endothelin receptor subtypes in normal and diabetic rat corpus cavernosum. Br J Urol. 1995 Aug; 76(2):203-7.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jul; 4(7):517-29.

Bivalacqua TJ, Usta MF, Kendirci M, Pradhan L, Alvarez X, Champion HC, et al. Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy. J Sex Med. 2005 Mar; 2(2):187-97.

Boussery K, Delaey C, Van de Voorde J. The vasorelaxing influence of adrenomedullin in isolated bovine retinal arteries. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2005 Jun; 19(3): 401.

Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. Biol Reprod. 1995 Mar; 52(3):485-9.

Cadenas E, Sies H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. Adv Enzyme Regul. 1985; 23:217-37.

Carneiro FS, Carneiro ZN, Giachini FR, Lima VV, Nogueira E, Rainey WE, et al. Murine and rat cavernosal responses to endothelin-1 and urotensin-II Vasoactive Peptide Symposium. J Am Soc Hypertens. 2008a Nov; 2(6):439-47.

Carneiro FS, Nunes KP, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nogueira EF, et al. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. J Sex Med. 2008b Dec; 5(12):2793-807.

Castellani RJ, Moreira PI, Liu G, Dobson J, Perry G, Smith MA, et al. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. Neurochem Res. 2007 Oct; 32(10):1640-5.

Chabielska E, Pietraszek M, Malinowska B, Buczko W. The effect of ethanol on some serotonergic mechanisms in rat blood platelets. Pol J Pharmacol Pharm. 1988 May-Jun; 40(3):241-9.

Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. Hypertension. 1985 Jul-Aug; 7(4):519-24.

Chang S, Hypolite JA, Changolkar A, Wein AJ, Chacko S, DiSanto ME. Increased contractility of diabetic rabbit corpora smooth muscle in response to endothelin is mediated via Rho-kinase beta. Int J Impot Res. 2003 Feb; 15(1):53-62.

Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A. Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. Br J Pharmacol. 1990 Oct; 101(2):375-81.

D'Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honore JC. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. Pharmacol Ther. 2002 Sep; 95(3):221-38.

Daí Y, Pollock DM, Lewis RL, Wingard CJ, Stopper VS, Mills TM. Receptor-specific influence of endothelin-1 in the erectile response of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 Jul; 279(1):R25-30.

Daley JT, Watkins MT, Brown ML, Martinez V, Cuevas P, Saenz de Tejada I. Prostanoid production in rabbit corpus cavernosum. II. Inhibition by oxidative stress. J Urol. 1996 Sep; 156(3):1169-73.

de Andrade CR, Leite PF, Montezano AC, Casolari DA, Yogi A, Tostes RC, et al. Increased endothelin-1 reactivity and endothelial dysfunction in carotid arteries from rats with hyperhomocysteinemia. British Journal of Pharmacology. 2009 Apr; 157: 568-580.

Dobrina A, Patriarca P. Neutrophil-endothelial cell interaction. Evidence for and mechanisms of the self-protection of bovine microvascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. J Clin Invest. 1986 Aug; 78(2):462-71.

Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. Physiol Res. 2004; 53(6):595-602.

Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Mar; 269(3):713-7.

Eardley I, Sethia K. Erectile dysfunction: Current investigation and Management. 2nd ed. London: Mosby; 2003.

Fahrner EM. Sexual dysfunction in male alcohol addicts: prevalence and treatment. Arch Sex Behav. 1987 Jun; 16(3):247-57.

Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urol. 1994 Jan; 151(1):54-61.

Francavilla S, Properzi G, Bellini C, Marino G, Ferri C, Santucci A. Endothelin-1 in diabetic and nondiabetic men with erectile dysfunction. J Urol. 1997 Nov; 158(5):1770-4.

Franceschi D, Graham D, Sarasua M, Zollinger RM, Jr. Mechanisms of oxygen free radical-induced calcium overload in endothelial cells. Surgery. 1990 Aug; 108(2):292-7.

Fregonesi A, Cará AM, Scótolo FSC. Disfunção sexual Masculina. In: Netto Júnior NR.Urologia Prática. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 327-330.

Gluud C, Wantzin P, Eriksen J. No effect of oral testosterone treatment on sexual dysfunction in alcoholic cirrhotic men. Gastroenterology. 1988 Dec; 95(6):1582-7.

Granchi S, Vannelli GB, Vignozzi L, Crescioli C, Ferruzzi P, Mancina R, et al. Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. Mol Hum Reprod. 2002 Dec; 8(12):1053-64.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res. 2000 Mar; 86(5):494-501.

Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. J Leukoc Biol. 2005 Dec; 78(6):1223-32.

Hedlund H, Andersson KE. Contraction and relaxation induced by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. J Urol. 1985 Dec; 134(6):1245-50.

Hipólito UV, Rocha JT, Martins-Oliveira A, Tirapelli DP, Jacob-Ferreira A, Batalhão ME, et al. Chronic ethanol consumption reduces adrenomedullin-induced relaxation in the isolated rat aorta. Alcohol. 2011 Dec; 45(8):805-14.

Holmquist F, Kirkeby HJ, Larsson B, Forman A, Alm P, Andersson KE. Functional effects, binding sites and immunolocalization of endothelin-1 in isolated penile tissues from man and rabbit. J Pharmacol Exp Ther. 1992 May; 261(2):795-802.

Hucks D, Thuraisingham RC, Raftery MJ, Yaqoob MM. Homocysteine induced impairment of nitric oxide-dependent vasorelaxation is reversible by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. Nephrol Dial Transplant. 2004 Aug; 19(8):1999-2005.

Husain K, Mejia J, Lalla J, Kazim S. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. Pharmacol Res. 2005 Apr; 51(4):337-43.

Husain K, Vazquez-Ortiz M, Lalla J. Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol-induced hypertension in rats. Hum Exp Toxicol. 2007 May; 26(5):427-34.

Ibsen H, Christensen NJ, Rasmussen S, Hollnagel H, Nielsen MD, Giese J. Effects of high alcohol intake on blood pressure, adrenergic activity, and the renin-angiotensin system. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1985; 176:87-91.

Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. Life Sci. 1992; 50(4):247-55.

Izbéki F, Wittmann T, Csáti S, Jeszenszky E, Lonovics J. Opposite effects of acute and chronic administration of alcohol on gastric emptying and small bowel transit in rat. Alcohol Alcohol. 2001 Jul-Aug; 36(4):304-8.

Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Sep;295(3): L515-29.

Jones RW, Jeremy JY, Koupparis A, Persad R, Shukla N. Cavernosal dysfunction in a rabbit model of hyperhomocysteinaemia. BJU Int. 2005 Jan; 95(1):125-30.

Kalant, H. Effects of ethanol on the nervous system. In: Tremolleres J, editor. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics: Alcohols and Derivatives. New York: Pergamon;1971. p. 189–236.

Kenakin TP. Molecular Pharmacology: a short course. Cambridge: Blackwell Science; 1997. Chapter 5, Concentration of drugs in tissue; p. 92-113.

Kenakin TP. Tissue response as a functional discriminator of receptor heterogeneity: Effects of mixed receptor populations on Schild regressions. Mol Pharmacol. 1992 Apr; 41(4):699-707.

Kim HJ, Sohng I, Lee G, Kim JJ, Koh SK. Effects of acetaldehyde on responses of rabbit corpus cavernosal smooth muscle. J Korean Med Sci. 2000 Jun; 15(3):295-8.

Leite R, Giachini FR, Carneiro FS, Nunes KP, Tostes RC, Webb RC. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 2007 Jun; 2(2):119-32.

Li W, Zheng T, Altura BT, Altura BM. Antioxidants prevent ethanol-induced contractions of canine cerebral vascular smooth muscle: relation to alcohol-induced brain injury. Neurosci Lett. 2001 Mar; 301(2):91-4.

Lizarte FS, Claudino MA, Tirapelli CR, Morgueti M, Tirapelli DP, Batalhão ME, et al. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. Urology. 2009 Dec; 74(6):1250-6.

Lizarte FS, Morgueti M, Tirapelli CR, Claudino MA, Evora PR, Novais PC, et al. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. BJU Int. 2010 Jun; 105(11):1592-7.

Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erection dysfunction and priapism. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr ED, Wein AJ, editors. Campbell's Urology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2003. p. 1561-618.

MacMahon S. Alcohol consumption and hypertension. Hypertension. 1987 Feb; 9(2):111-21.

Miller MA, Morgan RJ, Thompson CS, Mikhailidis DP, Jeremy JY. Adenylate and guanylate cyclase activity in the penis and aorta of the diabetic rat: an in vitro study. Br J Urol. 1994 Jul; 74(1):106-11.

Mills TM, Chitaley K, Lewis RW. Vasoconstrictors in erectile physiology. Int J Impot Res. 2001c Dec; 13 Suppl 5:S29-34.

Mills TM, Chitaley K, Wingard CJ, Lewis RW, Webb RC. Effect of Rho-kinase inhibition on vasoconstriction in the penile circulation. J Appl Physiol. 2001b Sep; 91(3):1269-73.

Mills TM, Pollock DM, Lewis RW, Branam HS, Wingard CJ. Endothelin-1-induced vasoconstriction is inhibited during erection in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001a Aug; 281(2):R476-83.

Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF. Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. Arch Biochem Biophys. 1995 Apr; 318(1):53-8.

Miura K, Ebara T, Okumura M, Matsuura T, Kim S, Yukimura T, et al. Attenuation of adrenomedullin-induced renal vasodilatation by NG-nitro L-arginine but not glibenclamide. Br J Pharmacol. 1995 Jul; 115(6):917-24.

Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. Am J Physiol. 1994 Jun; 266(6 Pt 2):H2568-72.

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function-role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011 Jan; 110(1):87-94.

Morano S, Gatti A, Mandosi E, Tiberti C, Fallarino M, Cipriani R, et al. Circulating monocyte oxidative activity is increased in patients with type 2 diabetes and erectile dysfunction. J Urol. 2007 Feb; 177(2):655-9.

Moreira ED, Jr., Abdo CH, Torres EB, Lobo CF, Fittipaldi JA. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. Urology. 2001 Oct; 58(4):583-8.

Mutlu-Turkoglu U, Dogru-Abbasoglu S, Aykac-Toker G, Mirsal H, Beyazyurek M, Uysal M. Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. J Lab Clin Med. 2000 Oct; 136(4):287-91.

Nanji AA, Khwaja S, Khettry U, Sadrzadeh SM. Plasma endothelin levels in chronic ethanol fed rats: relationship to pathologic liver injury. Life Sci. 1994; 54(6):423-8.

National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. What Is Moderate Drinking?: Defining "Drinks" and Drinking Levels. Bethesda: Alcohol Research & Health; 1999. 14p.

NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. JAMA. 1993 Jul; 270(1):83-90.

O'Farrell TJ. Sexual functioning of male alcoholics. In: Collins RL, Leonard KE and Searles JS, editors. Alcohol and the family: Research and clinical perspectives. New York: Guilford Press; 1990. p.244–71.

O'Farrell TJ, Choquette KA, Cutter HS, Birchler GR. Sexual satisfaction and dysfunction in marriages of male alcoholics: comparison with nonalcoholic maritally conflicted and nonconflicted couples. J Stud Alcohol. 1997 Jan; 58(1):91-9.

Organização Mundial da Saúde. Global status report on alcohol and health. Geneva: World Health Organization; 2011. 286 p.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care. 2008 Feb; 31 Suppl 2:S170-80.

Parkkisenniemi UM, Klinge E. Functional characterization of endothelin receptors in the bovine retractor penis muscle and penile artery. Pharmacol Toxicol. 1996 Aug;79(2):73-9.

Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. N Engl J Med. 1992 Jan; 326(2):90-4.

Reis MM, Abdo CH. Prevalence of erectile dysfunction as defined by the International Index of Erectile Function (IIEF) and self-reported erectile dysfunction in a sample of Brazilian men who consider themselves healthy. J Sex Marital Ther. 2010; 36(1):87-100.

Ritchie R, Sullivan M. Endothelins & erectile dysfunction. Pharmacol Res. 2011 Jun; 63(6): 496-501.

Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, et al. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. Atherosclerosis. 2009 Jan; 202(1):58-67.

Saito M, Broderick GA, Wein AJ, Levin RM. Effect of chronic ethanol consumption on the pharmacological response of the rabbit corpus cavernosum. Pharmacology. 1994 Dec; 49(6):386-91.

Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. Alcohol. 1999 Feb; 17(2):97-105.

Scott RB, Reddy KS, Husain K, Somani SM. Time course response to ethanol of hepatic antioxidant system and cytochrome P_{450} II E_1 in rat. Environ. Nutr Interac. 1999; 3: 217-31.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007. 76p.

Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. Basic Res Cardiol. 2011 Sep; 106(5):735-47.

Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Role of endothelin-1 and interleukin-4 in buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Apr 13; 257(2):373-7.

Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A. Suppression of endothelin-converting enzyme-1 during buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. Biochem Biophys Res Commun. 2000 May; 271(2):318-22.

Sugo S, Minamino N, Kangawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, et al. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. Biochem Biophys Res Commun. 1994 Jun; 201(3):1160-6.

Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Feb; 207(1):25-32.

Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Down-regulation of endothelin-B receptor sites in cavernosal tissue of hypercholesterolaemic rabbits. Br J Urol. 1998 Jan; 81(1):128-34.

Sun H, Mayhan WG. Temporal effect of alcohol consumption on reactivity of pial arterioles: role of oxygen radicals. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001 Mar; 280(3):H992-H1001.

Takai M, Umemura I, Yamasaki K, Watakabe T, Fujitani Y, Oda K, et al. A potent and specific agonist, Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1992 Apr; 184(2):953-9.

Tirapelli CR, Al-Khoury J, Bkaily G, D'Orleans-Juste P, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. J Pharmacol Exp Ther. 2006a Jan; 316(1):233-41.

Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, Legros E, et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. J Pharmacol Exp Ther. 2006b Aug; 318(2):819-27.

Tirapelli CR, Legros E, Brochu I, Honoré JC, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Chronic ethanol intake modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. Br J Pharmacol. 2008b Jul; 154(5):971-81.

Tirapelli CR, Leone AF, Yogi A, Tostes RC, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. J Pharm Pharmacol. 2008a Mar;60(3):331-41.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol. 2004 Oct; 122(4):339-52.

Traish AM, Palmer MS, Goldstein I, Moreland RB. Expression of functional muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. Receptor. 1995 Fall; 5(3):159-76.

Tsuji S, Kawano S, Michida T, Masuda E, Nagano K, Takei Y, et al. Ethanol stimulates immunoreactive endothelin-1 and -2 release from cultured human umbilical vein endothelial cells. Alcohol Clin Exp Res. 1992 Apr; 16(2):347-9.

Ushiyama M, Morita T, Kuramochi T, Yagi S, Katayama S. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. Hypertens Res. 2004 Apr; 27(4):253-61.

Watts GF, Chew KK, Stuckey BG. The erectile-endothelial dysfunction nexus: New opportunities for cardiovascular risk prevention. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007 May; 4(5):263-73.

Wedgwood S, McMullan DM, Bekker JM, Fineman JR, Black SM. Role for endothelin-1-induced superoxide and peroxynitrite production in rebound pulmonary hypertension associated with inhaled nitric oxide therapy. Circ Res. 2001 Aug; 89(4):357-64.

Wetterling T, Veltrup C, Driessen M, John U. Drinking pattern and alcohol-related medical disorders. Alcohol Alcohol. 1999 May; 34(3):330-6.

Yogi A, Callera GE, Hipólito UV, Silva CR, Touyz RM, Tirapelli CR. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. Clin Sci (Lond). 2010 Jun; 118(11):657-68.

Zheng T, Li W, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Alpha-tocopherol prevents ethanol-induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in cultured canine cerebral vascular smooth muscle cells. Neurosci Lett. 1998 Mar; 245(1):17-20.

ANEXO

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1084.53.6), intitulado "Consequência do Consumo Crônico de Etanol sobre a Reatividade e Expressão dos Componentes do Sistema Endotelinérgico em Corpo Cavernoso de Rato", de autoria de Carlos Renato Tirapelli, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1084.53.6), entitled: "Consequência do Consumo Crônico de Etanol sobre a Reatividade e Expressão dos Componentes do Sistema Endotelinérgico em Corpo Cavernoso de Rato", by Carlos Renato Tirapelli, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 07, 2010.

Ribeirão Preto, 8 de outubro de 2010.

Grutte Leit binni Presidente da CEUA

Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretaria da CEUA Maria Angélica Depiro