**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
APOPTOSE NOS CORPOS CAVERNOSOS DE RATOS
SUBMETIDOS A MODELO DE ALCOOLISMO CRÔNICO.**

ROGÉRIO JOSÉ DE AZEVEDO MEIRELLES

Ribeirão Preto

2014

ROGÉRIO JOSÉ DE AZEVEDO MEIRELLES

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
APOPTOSE NOS CORPOS CAVERNOSOS DE RATOS
SUBMETIDOS A MODELO DE ALCOOLISMO CRÔNICO.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas,
programa Clínica Cirúrgica – opção
Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Meirelles, Rogério José de Azevedo

Análise morfológica e molecular da apoptose nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de alcoolismo crônico.

83p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli.

1. Alcoolismo; 2. Apoptose; 3. Corpos cavernosos;
4. MiRNA-21; 5. Morphometry

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rogério José de Azevedo Meirelles

"Análise morfológica e molecular da apoptose nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de alcoolismo crônico."

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Doutor em Ciências Médicas.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico,

Ao minha querida esposa, Alessandra de Cássia Vecchi Meirelles,

Minha adoração ... e adorar é mais que amar.

Por esses 21 anos que estamos juntos,

De companheirismo, carinho, amor, dedicação, lealdade, respeito...

Pela cumplicidade,

Por sempre querer estar junto ...

Por ser o melhor presente que a vida me designou...

Por ser uma mãe dedicada e sempre presente aos nossos filhos.

Mas acima de tudo por me completar em todos os sentidos!

Sempre te adorarei!

Dedico,

Aos meus adorados filhos,

Leonardo Vecchi Meirelles e Guilherme Vecchi Meirelles.

Por me propiciarem ser pai,

Por poder sentir correr nas veias a felicidade incondicional por tê-los
perto de mim,

Por serem o meu orgulho e pelos quais faria quaisquer coisas,

Dedico a vocês não só este trabalho,

Mas a minha vida.

Dedico,

Aos meus amados pais e madrasta,

Maria de Lourdes de Azevedo, José Meirelles e Léa Gori,

A quem devo a oportunidade da vida e tudo que conquistei.

Agradeço pelo amor, pelo carinho e pela dedicação incondicionais.

Por acreditarem em mim.

Minha eterna gratidão.

Esta vitória é de vocês.

Dedico,

A minha sogra e meu sogro,

Elza Costa Vecchi e Guido Vecchi Sobrinho,

As pessoas mais bondosas que conheço e que mais me ajudam
nesta caminhada.

Profundo respeito e gratidão para sempre.

Aos meus irmãos,

Pelo carinho, pela amizade, pela bondade e pelo apoio.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli,

Pela dedicada orientação,

Pela oportunidade, pela confiança, pela enorme paciência, pelo exemplo profissional de dedicação e respeito ao Departamento, mas acima de tudo, por compartilhar seus saberes e experiências não só profissionais, mas também pessoais.

A Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

Pelo carinho, dedicação e pela atenção e apoio durante todo este tempo de convivência. Jamais esquecerei ...

Ao Dr. Fermino Sanches Lizarte Neto e ao Prof. Dr. Paulo Cezar Novais

Amigos; agradeço pela bondade de vocês, pela dedicação e total disponibilidade e presteza em todos os momentos. Sejam muito felizes e meu muito obrigado.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Departamento de Anatomia e Cirurgia pela acolhida e por colocar à disposição a área experimental e o laboratório, em especial a Divisão de Urologia deste Departamento e ao Prof. Dr. Silvio Tucci Junior por todo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Epígrafe

“Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser e devo ter paciência!

Mas, aprendi também, que posso ir além dos limites que eu próprio coloquei”.

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: A ereção peniana é um processo neurovascular complexo dependente do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos. O etanol exerce diversos efeitos na atividade sexual masculina e a disfunção sexual induzida pelo etanol é causada pelo seu efeito no sistema nervoso central, principalmente pela sua ingestão aguda e crônica. Foi demonstrado que o etanol afeta significativamente tanto a contração quanto o relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos. Os relatos da ocorrência do mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos estão associados à denervação, à castração e a doenças crônicas como o diabetes. Poucos são os estudos morfológicos sobre o efeito do etanol no tecido cavernoso; porém, não são descritos trabalhos relacionando as alterações morfológicas causadas pelo etanol no tecido cavernoso, a eventos moleculares e sua relação com o mecanismo de apoptose celular.

Objetivos: avaliar e comparar o efeito do alcoolismo na morfometria e no mecanismo de apoptose dos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de alcoolismo crônico.

Material e métodos: Foram utilizados 24 ratos *Wistar* divididos em dois grupos: controle (C) e tratado com etanol (A) a 20% durante sete semanas. As amostras dos corpos cavernosos foram preparadas para o estudo morfométrico pela coloração de tricrômico de *Masson*, para o estudo da expressão protéica de CASPASE 3 (pró-apoptótica) por imunohistoquímica e para o estudo da expressão gênica sérica e no tecido cavernoso do miRNA-21 (anti-apoptótico).

Resultados: O estudo morfométrico mostrou principalmente diminuição de fibras musculares lisas dos corpos cavernosos nos animais do grupo A. Também foi observado aumento significativo na expressão de CASPASE 3 nos animais do grupo A e baixa expressão gênica sérica e no tecido cavernoso do miRNA-21 nos grupos C e A.

Conclusões: A análise morfométrica correspondente à área ocupada pelas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos nos animais do grupo A mostrou correlação com os locais de maior expressão protéica de CASPASE 3 e, portanto, de apoptose. Neste estudo, a morte celular por apoptose não foi suprimida pela expressão do miRNA-21.

Palavras-chave: alcoolismo; apoptose; corpo cavernoso; miRNA-21; morfometria.

ABSTRACT

Introduction: Penile erection is a complex neurovascular process dependent smooth muscle relaxation in the corpus cavernosum. Ethanol exerts different effects on male sexual activity and sexual dysfunction induced by ethanol is caused by its effect on the central nervous system, primarily for its acute and chronic ingestion. Ethanol has been shown to significantly affect both the contraction and the relaxation of smooth muscle of the corpus cavernosum. The reports of the occurrence of the apoptosis mechanism in the corpus cavernosum are associated with denervation, castration and chronic diseases like diabetes. There are few morphological studies on the effect of ethanol in the cavernous tissue, but are not described studies correlating morphological changes caused by ethanol in the cavernous tissue, the molecular events and their relation to the mechanism of apoptosis.

Objectives: To evaluate and compare the effect of alcoholism in the morphometry and mechanism of apoptosis in the corpus cavernosum of rats subjected to chronic alcoholism model.

Material and methods: 24 Wistar rats were divided into two groups: Control (C) and treated with ethanol (A) diluted 20% for seven weeks. Samples of the corpus cavernosum were prepared for morphometric study by Masson's trichrome stain, study for protein expression of CASPASE 3 (pro-apoptotic) by immunohistochemistry and study for gene expression of miRNA-21 (anti-apoptotic) in serum and the cavernous tissue.

Results: The morphometric study primarily showed a decrease in smooth muscle cells of the corpus cavernosum in group A. Significant increase for expression of CASPASE 3 in group A and low gene expression of miRNA-21 was also observed in serum and the cavernous tissue in groups C and A.

Conclusions: The morphometric analysis corresponding to the area occupied by smooth muscle cells of the corpus cavernosum in group A showed correlation with the sites of increased protein expression of CASPASE 3 and thus apoptosis. In this study, cell death by apoptosis was not suppressed by the expression of miRNA-21.

Keywords: alcoholism; apoptosis; corpus cavernosum; miRNA-21; morphometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrando as vias da apoptose: extrínseca e intrínseca.....	28
Figura 2	Fotomicrografia mostrando um dos campos fotografados para a mensuração da área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa. Tricrômico de <i>Masson</i> , 400x.....	37
Figura 3	Fotomicrografia de rato controle mostrando a área total do campo ($94.019,38 \mu\text{m}^2$) fotografado para as mensurações: da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas (FC) e da área ocupada (em μm^2) pelos espaços cavernosos. Tricrômico de <i>Masson</i> , 400x.....	38
Figura 4	Etapas da preparação das amostras para a realização da técnica de PCR em tempo real.	42
Figura 5	Representação do cálculo do ΔCT e $\Delta\Delta\text{CT}$ para a obtenção da quantificação da expressão do gene em estudo (fold).....	44
Figura 6	Fotomicrografia de secção transversal do pênis de rato onde podem ser identificados os dois corpos cavernosos revestidos pela túnica albugínea e o corpo esponjoso contendo a uretra. Tricrômico de <i>Masson</i> , 50x.....	46
Figura 7	Fotomicrografia mostrando detalhe de algumas trabéculas conjuntivas constituídas principalmente por fibras colágenas e por musculatura lisa subendotelial. Ao centro um amplo espaço cavernoso. Tricrômico de <i>Masson</i> , 400x	47

LISTA DE TABELAS - ANEXO

Tabela 1	Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa dos corpos cavernosos.	80
Tabela 2	Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas do tecido conjuntivo dos corpos cavernosos	81
Tabela 3	Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pelas lacunas ou espaços cavernosos nos grupos experimentais	82
Tabela 4	Valores por animal e média, da expressão de CASPASE 3 nos corpos cavernosos dos animais C e A	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa dos corpos cavernosos nos dois grupos experimentais.....	48
Gráfico 2	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas dos corpos cavernosos nos dois grupos experimentais	49
Gráfico 3	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da área ocupada (em μm^2) pelos espaços cavernosos nos corpos cavernosos dos dois grupos experimentais	50
Gráfico 4	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão protéica de CASPASE-3 nos corpos cavernosos nos dois grupos experimentais.....	51
Gráfico 5	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão gênica sérica do miRNA-21 nos corpos cavernosos dos dois grupos experimentais.....	52
Gráfico 6	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão gênica no tecido cavernoso do miRNA-21 nos dois grupos experimentais.....	53

ÍNDICE

1	Introdução	16
2	Revisão da Literatura	18
	2.1. Anatomia do corpo cavernoso.....	18
	2.2. Fisiologia da ereção peniana.....	19
	2.3. Disfunção erétil vasculogênica e fatores de risco: alcoolismo.....	24
	2.4. A apoptose e os miRNAs.....	27
	2.5. Alterações morfológicas e moleculares no sistema reprodutor masculino: ação do etanol no tecido peniano	30
3.	Justificativa	33
4.	Objetivos	34
5.	Material e Métodos	35
	5.1. Animais.....	35
	5.2. Grupos experimentais.....	35
	5.3. Análise morfométrica.....	36
	5.4. Análise imuno-histoquímica.....	39
	5.5. Análise da expressão gênica do miRNA-21.....	41
	5.6. Análise Estatística.....	45
6.	Resultados	46
7.	Discussão	54
8.	Conclusões	67
9.	Referências Bibliográficas	68

1. INTRODUÇÃO

A ereção peniana é um evento fisiológico complexo que compreende mecanismos psíquicos, neurais e vasculares, e envolve aumento do fluxo arterial, relaxamento da musculatura lisa adjacente aos sinusóides pela intercessão da estimulação neural do músculo liso do corpo cavernoso, a diminuição do retorno venoso, bem como liberação neuro-humoral de fatores contráteis e relaxantes do endotélio (KRANE; GOLDSTEIN; SAENZ DE TEJADA, 1989; LUE et al., 1983; LUE; TANAGHO, 1987; SAENZ de TEJADA et al., 1988). A deficiência de um destes mecanismos pode levar à disfunção erétil. Estudos prévios demonstraram que as fibras musculares lisas dos corpos cavernosos formam a base estrutural para o relaxamento sinusoidal, que está sob controle neural local pelas células endoteliais (SATTAR; SCHULMAN; WESPES, 1995); sendo as fibras elásticas e colágenas elementos que também possuem grande importância no mecanismo de ereção (GOLDSTEIN et al., 1985; PADMA-NATHAN et al., 1990; SATTAR; WESPES; SCHULMAN, 1994).

O etanol exerce diversos efeitos na atividade sexual masculina, e a disfunção sexual induzida pelo etanol é causada pelo seu efeito no sistema nervoso central, principalmente por meio da sua ingestão aguda e pelo alcoolismo crônico; na diminuição nos níveis de testosterona e aumento nos níveis de estrógeno; assim como pelas polineuropatias causadas (MILLER; GOLD, 1988). O alcoolismo crônico representa um fator de risco importante para a impotência e altos níveis de álcool diminuem a tumescência peniana e reduz a performance sexual (BENSON; DOILEAU, 1991).

Yesilli et al. (2006) quantificaram as estruturas histológicas fundamentais dos corpos cavernosos pela análise imuno-histoquímica, em

ratos expostos ao alcoolismo. Estes autores observaram diferença estatisticamente significativa na quantidade de fibras musculares lisas, menor nos animais alcoolizados quando comparado aos animais controles ($P=0.002$). Em adição, também foi observada menor quantidade de fibras colágenas e elásticas nos animais alcoolizados. Estes resultados sugerem que o alcoolismo crônico afeta o número total destas células e pode ser um dos mecanismos responsáveis pela disfunção erétil. Contudo, poucos são os estudos que descrevem tais alterações morfológicas no corpos cavernosos em animais alcoolizados, assim como sua relação com o mecanismo de apoptose neste tecido.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Anatomia do corpo cavernoso

O pênis humano consiste de três segmentos cilíndricos: os corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, o qual circunda a uretra e forma a glândula peniana na porção distal. Cada um dos corpos cavernosos é circundado por um tecido fibroso e compacto, a túnica albugínea, a qual é constituída em grande parte, de fibras colágenas bem como por algumas fibras elásticas (SATTAR; WESPES; SCHULMAN, 1994). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes das lacunas e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (GOLDSTEIN et al., 1982; KRANE; GOLDSTEIN; SAENZ DE TEJADA, 1989). Um septo incompleto une os dois corpos cavernosos abaixo do arco púbico permitindo o fluxo livre de sangue entre estes como uma unidade (RUSSEL; NEHRA, 2003).

A parte proximal ou raiz do pênis encontra-se ancorada no osso pélvico, sendo esta região constituída por três massas de tecido erétil, isto é, os dois ramos que constituem as extremidades posteriores dos corpos cavernosos, e a parte proximal do corpo esponjoso que forma o bulbo peniano. O bulbo peniano está circundado pelo músculo bulboesponjoso, ao passo que os ramos estão circundados pelos músculos isquiocavernosos. A glândula peniana apresenta uma aparência de esponja devido à presença de um vasto

plexo venoso com um grande número de anastomoses (RUSSEL; NEHRA, 2003; STANDRING, 2010).

2.2. Fisiologia da Ereção Peniana

2.2.1 Bases vasculares da ereção

A artéria pudenda interna representa a fonte preliminar de sangue do pênis. Esta artéria é um ramo da artéria ilíaca interna, com trajeto através do canal pudendo ou de *Alcock*, na parede lateral da fossa isquiorretal. A artéria pudenda interna dá origem à artéria retal inferior ainda no interior do canal pudendo, que se divide em vários ramos que irrigam os músculos, fáscia e pele em torno do canal anal. Próximo à extremidade anterior do canal pudendo, a artéria pudenda interna dá origem à artéria perineal, que se aproxima do escroto na região superficial do períneo, entre os músculos bulboesponjoso e isquiocavernoso, irriga os tecidos entre o ânus e o bulbo do pênis. As artérias escrotais posteriores que se distribuem para a pele do escroto, a túnica dartos e os músculos do períneo, geralmente são ramos terminais da artéria perineal, mas podem também se originar do seu ramo transversal. Outros ramos da artéria pudenda interna são a artéria do bulbo do pênis e a artéria uretral que irrigam, respectivamente, o tecido erétil do bulbo do pênis e a glândula bulbouretral; e a glândula do pênis (GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1978; RUSSEL; NEHRA, 2003; STANDRING, 2010).

As artérias profundas do pênis ou cavernosas, um dos dois ramos terminais da artéria pudenda interna, caminham no centro de cada corpo cavernoso, o qual irriga e, ao longo de seu trajeto, emitem múltiplas artérias helicinas que esvaziam-se nos espaços sinusóides adjacentes. As artérias

dorsais do pênis, um dos dois ramos terminais da artéria pudenda interna, passam entre o ramo do pênis e a sínfise púbica e, abaixo da fáscia profunda do dorso do pênis, sendo acompanhadas lateralmente pelos nervos dorsais do pênis e medialmente pela veia dorsal profunda do pênis. Os seus ramos terminais irrigam a glândula e o prepúcio (GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1978; STANDRING, 2011).

O pênis tem três sistemas associados de drenagem venosa. O sistema de drenagem superficial consiste nas veias localizadas entre as camadas dorsolaterais da fáscia profunda do pênis (de *Buck*) e a fáscia de *Colles*, que convergem em uma veia dorsal superficial que drena o prepúcio, a pele e o revestimento fascial do pênis e, no tecido subcutâneo caminha posteriormente para se abrir em uma das veias pudendas externas.

O sistema de drenagem intermediário inclui as veias circunflexas dorsais e profundas que desembocam medialmente na veia dorsal profunda que, recebe sangue proveniente da glândula e dos corpos cavernosos do pênis e segue entre as artérias dorsais pares para se unir às veias pudendas internas abaixo da sínfise púbica e desembocar no plexo venoso prostático. Três a dez veias circunflexas tem trajeto apenas superficialmente à túnica albugínea lateral e, em seguida, surgem abaixo da superfície dos corpos esponjosos. No sistema de drenagem profundo, os sinusóides dos corpos cavernosos são drenados pelas veias subtunicais, que desembocam nas veias circunflexas (RUSSEL; NEHRA, 2003; STANDRING, 2011).

2.2.2. Mecanismos fisiológicos da ereção peniana

Durante a ereção, o pênis atua como um capacitor, acumulando sangue sob pressão devido ao relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos (ANDERSSON; WAGNER, 1995; LUE; TANAGHO, 1987; SAENZ DE TEJADA et al., 1991). Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, principalmente através de mecanismos α -adrenérgicos, e exercem resistência máxima ao influxo arterial (TRAISH et al., 1999). Neste estado, apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais. Ao mesmo tempo em que sinusóides estão contraídos, as veias drenam livremente para veias extra-penianas. Assim, durante este estado, a musculatura lisa trabecular dos corpos cavernosos e das artérias cavernosas e helicinas se mantém em contração permanente. As trabéculas são drenadas pelas vênulas emissárias que se comunicam com as veias cavernosas, e apresentam PO_2 de 20 a 40 mmHg quando o pênis encontra-se no estado flácido. Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, essa musculatura relaxa (tumescência) permitindo o influxo arterial e, conseqüentemente, o aumento progressivo da pressão sanguínea intracavernosa. Apenas o bloqueio da atividade adrenérgica não é suficiente para que seja alcançado o estado de ereção peniana total. Os principais eventos responsáveis pelo estado de ereção total são os relaxamentos da musculatura lisa cavernosa e das artérias helicinas, quando ocorre então expansão máxima dos espaços lacunares que terminam por comprimir os plexos venosos sub-albugíneos (KIM et al., 1993).

Durante a ereção, os músculos lisos de arteríolas e sinusóides relaxam, conseqüentemente reduzindo a resistência periférica. Assim, a

dilatação das artérias cavernosas e helicinas levam ao aumento do fluxo sanguíneo nos espaços lacunares, causando expansão do pênis. O influxo de sangue arterial está associado com aumento na PO_2 (90-100 mmHg) durante o desenvolvimento do estado de tumescência (KIM et al., 1991; 1993). A pressão sanguínea sistêmica transmitida através das arteríolas helicinas dilatadas expande o músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas abaixo da túnica e reduz o efluxo venoso no espaço lacunar, dessa forma, mantendo o pênis rígido (KRANE; GOLDSTEIN; SAENZ DE TEJADA, 1989; LUE; TANAGHO, 1987; SAENZ DE TEJADA et al., 1985). Em resumo, a pressão de perfusão nas artérias profundas do pênis e a resistência ao efluxo sanguíneo pelas vênulas localizadas abaixo da túnica albugínea é conhecida como mecanismo de oclusão venosa, que leva o aumento na pressão intracavernosa a um valor próximo da pressão sistêmica arterial média (ABOSEIF; LUE, 1988; SHIRAI et al., 1978).

A ativação de nervos constritores simpáticos causa um aumento do tônus muscular das artérias helicinas e das trabéculas. Isto resulta na redução do influxo arterial e diminuição dos espaços lacunares, com descompressão das vênulas sub-túnica e aumento do efluxo sanguíneo dos espaços lacunares, promovendo o retorno do pênis ao estado flácido (KRANE; GOLDSTEIN; SAENZ DE TEJADA, 1989; LUE; TANAGHO, 1987; SAENZ DE TEJADA et al., 1985). Os eventos hemodinâmicos que ocorrem durante a ereção e detumescência requerem alterações coordenadas do fluxo sanguíneo, pressão intracavernosa e volume peniano (ANDERSSON; WAGNER, 1995; AZADZOI et al., 1995).

2.2.3. Papel do Óxido Nítrico na Ereção Peniana

Diversos estudos têm mostrado que a liberação de óxido nítrico (NO) dos nervos cavernosos e do endotélio representa o fator chave necessário para a ereção peniana. O NO é formado da conversão de L-arginina pelas enzimas NO sintases (NOS), que existem em três isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS) (BURNETT et al., 1992; RAND; LI, 1995). Estas enzimas catalizam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidina da L-Arginina, formando NO e L-citrulina em duas etapas, com formação do intermediário N-hidroxi-L-arginina. As NOS são divididas em duas famílias: (1) NOS constitutivas (isoformas neuronal e endotelial), reguladas pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (CaM), responsáveis pela produção de pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), e que desempenham funções regulatórias na neurotransmissão e no sistema cardiovascular; e (2) NOS induzível, enzima essencialmente Ca^{2+} -independente, responsável pela produção de NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão (IGNARRO; MURAD, 1995).

A enzima nNOS é expressa na inervação dos corpos cavernosos do pênis e sua expressão protéica têm sido identificada primariamente na musculatura lisa do corpo cavernoso e no endotélio (BURNETT et al., 1992).

O NO neurogênico é considerado ainda o mais importante fator responsável pelo relaxamento imediato dos vasos penianos e do corpo cavernoso. Contudo, NO gerado pelo endotélio parece essencial na manutenção da ereção (ANDERSSON, 2003). A estimulação direta do

endotélio pela acetilcolina representa um mecanismo alternativo para a liberação de NO no pênis (BLANCO et al., 1988; KNISPEL; GOESSL; BECKMAN, 1991). Substância P e bradicina também podem relaxar o tecido cavernoso por estimular a formação e liberação de NO endotelial (TEXEIRA et al., 1988; WANG et al., 1994).

Inibidores de guanilato ciclase solúvel (GCs) inibem os relaxamentos de corpos cavernoso induzidos por estimulação elétrica bem como aqueles evocados por agentes que atuam de maneira dependente (acetilcolina) ou independente do endotélio (NO autêntico e doadores de NO), confirmando o envolvimento da via guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) nos relaxamentos de corpo cavernoso mediados pelo NO em várias espécies (HAYASHIDA et al., 1996; HEDLUND; ALM; ANDERSSON, 1999; HOLMQUIST; HEDLUND; ANDERSSON, 1992; PICKARD; POWELL; ZAR, 1991; RECIO et al., 1988). A ativação da GCs pelo NO causa uma elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir da guanosina trifosfato (GTP) (LUCAS et al., 2000; RAPOPORT; MURAD, 1983).

2.3. Disfunção Erétil Vasculogênica e Fatores de Risco: alcoolismo

A disfunção erétil é definida como a consistente incapacidade em alcançar ou manter a ereção suficiente para uma performance sexual satisfatória. Estudos demonstraram que esta disfunção erétil é causada por relaxamento inadequado dos corpos cavernosos com deficiência na produção de NO (AZADZOI et al., 1998; BURNETT, 1997).

Pacientes que apresentam doença vascular estão predispostos a desenvolver disfunção erétil vasculogênica (DEV) (BORTOLOTTI et al., 1997; SULLIVAN et al., 1999). Fatores de risco como diabetes mellitus, hipercolesterolemia, idade avançada, tabagismo e alcoolismo atuam de maneira sinérgica no desenvolvimento de DEV e aterosclerose. Em ambas as patologias, observa-se a ocorrência de disfunção endotelial, em particular na liberação e nas ações do NO (AZADZOI et al., 1995; BLANCO et al., 1988).

O aumento significativo da produção de bebidas alcoólicas nos últimos anos, acompanhado pelo seu grande consumo, tem provocado um aumento dos problemas médicos e psicossociais relacionados com o uso abusivo e dependência alcoólica. As consequências do alcoolismo na saúde do indivíduo e da comunidade vêm sendo a causa direta do aumento da morbidade e da mortalidade (DE LIMA, 1997).

Os vários tipos de álcoois apresentam características predominantemente hidrofílicas, concentrando-se por esse motivo, em órgãos com maior conteúdo hídrico (KALANT, 1983). Apesar disso, o álcool difunde-se através de todas as membranas biológicas, exceto a pele, sendo absorvido principalmente através da mucosa do trato gastrointestinal (CLAIR, 1991; KALANT, 1983), e em pequena proporção, por inalação através do epitélio pulmonar e mucosa da bexiga (KALANT, 1983).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o consumo crônico de etanol interfere na produção de NO ou na liberação do NO das células endoteliais (PUDDEY et al., 2001). Sullivan et al. (1997) e Tirapelli (2005) sugerem que o consumo crônico de etanol modificam as funções vasculares em decorrência de alterações no funcionamento do endotélio que é

reconhecido como uma importante unidade funcional envolvida na regulação do tônus muscular. Dentre os diferentes fatores de relaxamento e contração produzidos pelo endotélio temos a endotelina, que é um potente peptídeo vasoconstritor, isolado inicialmente de um meio de cultura de células endoteliais humanas.

Contudo, há relatos contraditórios sobre a influência do etanol crônico na resposta vascular. O consumo crônico de etanol têm mostrado aumento (HATAKE et al., 1994) ou diminuição (PINARDI et al., 1992) na liberação de NO pelas células endoteliais. Por outro lado, Williams; Adams e Mustafa (1990) observaram que o tratamento crônico com etanol não afeta o relaxamento produzido pela acetilcolina, pelo ATP ou pelo nitroprussiato de sódio na aorta com ou sem endotélio. Embora o efeito crônico do etanol tenha sido amplamente estudado nas preparações vasculares – aorta torácica, aorta abdominal e artérias mesentéricas, há pouca evidência a respeito da influência do etanol na produção de NO e/ou na sua liberação pelos tecidos dos corpos cavernosos (AYDINOGLU et al., 2008).

Estudos in vitro demonstraram que o etanol tem efeito significativo tanto na contratilidade quanto no relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos de coelhos (HYUNG et al., 2000; SAITO et al., 1994). É descrito que o aumento de acetaldeído, principal produto do metabolismo do etanol, pode afetar a função da musculatura lisa dos corpos cavernosos por meio de mecanismos de inibição do influxo do cálcio extracelular e da inibição da formação de NO (HYUNG et al., 2000). Contudo, o mecanismo dos efeitos do etanol ainda não foi claramente compreendido (YESILLI et al., 2006).

2.4. A apoptose e os miRNAs

Kerr; Wyllie e Currie (1972) e Wyllie; Kerr e Currie (1980) definiram o termo “apoptose” para descrever uma forma de morte celular distinta morfológicamente, associada à fisiologia normal, e especificaram certas modificações morfológicas que caracterizam este processo.

Nas células dos mamíferos, a apoptose é considerada um fenômeno regulado por genes e que envolve a ação coordenada de vários grupos de proteínas que provocam a morte celular e faz a célula ser degradada em uma seqüência ordenada de etapas. Ela está envolvida no desenvolvimento, na diferenciação, na proliferação e homeostase, na regulação e função do sistema imunológico e na remoção de células defeituosas e nocivas (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007). A maioria das mudanças que ocorrem durante a apoptose são causadas por cisteínas proteases que pertencem a uma grande família de proteínas com atividade enzimática conhecida como caspases (cisteino-proteinase-aspártico-ase) (WALTEREIT; WELLER, 2002).

As caspases são divididas em duas classes, as iniciadoras e as efetoras. Entre as caspases efetoras, a CASPASE 3 tem sido identificada como mediador chave da apoptose. A resposta apoptótica é mediada através de duas vias: extrínseca e intrínseca, dependendo da origem do estímulo de morte (Figura 1). A via intrínseca ou mitocondrial, é desencadeada em resposta a amplas mudanças nos estímulos de morte que são geradas no interior da célula, a partir da perda da função mitocondrial, resultando em déficit de energia e ativação de um processo que envolve diferentes proteínas mitocondriais (LOO et al., 2002). A via extrínseca é iniciada pela junção de

Tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca de morte celular convergem na ativação de CASPASE 3, para a execução final da morte programada (RAY et al., 2002).

Na última década, pequenas proteínas não-codificadoras de RNAs (ncRNAs) têm sido apreciadas como reguladoras-chave da expressão gênica. Entre estas, microRNAs (miRNAs) têm recebido, talvez, a maior atenção, pois são conservados entre os animais filogeneticamente distantes e são derivados de genes previamente não reconhecidos como endógenos, bem como de regiões de íntrons e éxons de conhecidas proteínas codificadoras de genes (MIRANDA et al., 2010).

Os miRNAs são moléculas de RNA contendo de 18-24 nucleotídeos que regulam a estabilidade e a eficiência da tradução de um RNA mensageiro (mRNA) específico, podendo inibir a tradução, assim como promover a degradação do RNA. Constituem uma grande família de RNAs não codificadores cuja função é atuar como sinalizador nas diversas vias de silenciamento gênico (MENDELL, 2005).

Estudos recentes sugeriram que miRNAs específicos podem se ligar a regiões-alvo dos promotores de certos genes para induzir a sua expressão, bem como são capazes de modular a expressão gênica pela ligação a uma região codificadora de proteína (DHARAP et al., 2009).

Assim, um grande número desses miRNAs parece ter um importante papel na regulação do crescimento e diferenciação celular, na apoptose das células de mamíferos, e possivelmente em várias desordens neuronais (CROCE; CALIN, 2005).

Os miRNAs tomam um papel cada vez mais importante e crucial na formação da função e da diferenciação dos tecidos e órgãos, tanto na saúde quanto na doença (MIRANDA et al., 2010).

Dada a amplitude de processos que os miRNAs regularm, é razoável esperar que eles possam ter um papel significativo na mediação dos efeitos do etanol. Embora este assunto ainda permaneça pouco estudado, alguns autores apresentam dados recentes mostrando que as alterações nos níveis de miRNAs, são de fato, associados com mecanismos de tolerância induzida pelo etanol (MIRANDA et al., 2010).

Dolganiuc et al. (2009) e Wang et al. (2009), utilizando a técnica de microarray, relataram que o etanol alterou a expressão de 2 a 3% dos miRNAs amostrados em modelos murinos de esteatohepatite e lesão cerebral fetal induzida pelo etanol. As mudanças observadas nos miRNAs foram aproximada e igualmente divididas entre aqueles com alta e com baixa expressão. Embora o número absoluto de miRNAs sensíveis ao etanol seja aparentemente pequeno, a capacidade dos miRNAs individualmente em controlar um grande número de genes, sugere que a alteração na expressão dos miRNAs será ampliado em nível celular e sistêmico.

Os relatos da ocorrência do mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos estão associados à denervação, à castração e a doenças crônicas como o diabetes. Não encontramos trabalhos descrevendo este mecanismo nos corpos cavernosos associados ao alcoolismo e a eventos moleculares como a expressão de miRNAs.

2.5. Alterações morfológicas e moleculares no sistema reprodutor masculino: ação do etanol no tecido peniano

Vários estudos descrevem diversas alterações morfológicas em diferentes órgãos do sistema reprodutor masculino (CAGNON et al., 1996;

CÂNDIDO et al., 2007; FÁVARO; CAGNON, 2008; FONTANELLI et al., 2012; MARTINEZ et al., 1995; 2008; 2009; MENDES et al, 2011; PINHEIRO et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2012).

É sabido que a intoxicação aguda pelo etanol pode causar retenção urinária nos indivíduos com hiperplasia prostática benigna (GRAYHACK; KOZLOWSKI, 1996). Em estudos experimentais, o mecanismo de retenção urinária induzida pelo etanol, em parte mostrou que o etanol prejudica significativamente a contratilidade detrusora in vivo e in vitro (OHMURA; KONDO; SAITO, 1997; YOKOI et al., 1996).

O etanol promove vários efeitos na atividade sexual masculina. Estas disfunções sexuais induzidas pelo etanol são causadas pelo seu efeito no sistema nervoso central, principalmente por meio da sua ingestão aguda e pelo alcoolismo crônico, assim como pela diminuição nos níveis de testosterona, pelo aumento nos níveis de estrógeno e pelas polineuropatias alcoólicas (MILLER; GOLD, 1988). Altos níveis de álcool causam diminuição da tumescência peniana e reduzem a performance sexual (RUBIN; HENSON, 1976).

Em estudo morfológico, Yeşilli et al. (2006) analisaram o efeito crônico do etanol a partir do consumo de doses crescentes (5% a 30% e pelo período de até 12 semanas) no tecido cavernoso de ratos machos adultos, comparados a animais controle. A concentração de etanol no sangue dos animais alcoolizados foi maior neste grupo com diferença significativa estatisticamente. Estes animais também mostraram diminuição na expressão protéica de actina nas suas fibras musculares lisas e diminuição na expressão protéica de colágeno tipo IV. A avaliação por histoquímica pelo método de

Weigert também demonstrou diminuição no conteúdo de fibras elásticas no tecido cavernoso dos animais alcoolizados.

O relaxamento neurogênico e do endotélio dependentes da musculatura lisa dos corpos cavernosos de camundongos e o efeito degenerativo das células endoteliais dos corpos cavernosos após tratamento subagudo com etanol, foi estudado por AYDINOGLU et al. (2008). A análise pela microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que, principalmente após 14 dias de tratamento com etanol, foram observadas endentações profundas na membrana nuclear das células endoteliais, assim como diminuição das vesículas de pinocitose e vacuolização no citoplasma de algumas células endoteliais.

Após castração, Traish et al. (1999) descreveram diminuição na quantidade de musculatura lisa trabecular no pênis de coelhos. Também foi observado que o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD), um dos poluentes tóxicos mais potentes no meio ambiente, causa uma série de efeitos adversos no sistema reprodutor masculino (ROMAN; PETERSON, 1998). Pode afetar o tecido erétil e agir como uma substância que promove ruptura endócrina promovendo diversas alterações hormonais, indução de alterações morfológicas e funcionais nos corpos cavernosos de coelhos, tais como fibrose, hiperplasia da musculatura lisa e depósito de tecido adiposo trabecular (MOON et al., 2004); além da indução de apoptose nos testículos; porém, esta última, não foi observada no pênis destes animais (TRAISH et al., 1999).

Não foram encontrados estudos morfológicos e moleculares descrevendo os efeitos do etanol no tecido cavernoso e sua relação com o mecanismo de apoptose celular neste tecido.

3. JUSTIFICATIVA

Visto que o alcoolismo é um problema de saúde, social e econômico em muitas sociedades e seu consumo crônico é um importante fator de risco que pode conduzir à disfunção erétil, tornam-se necessários maiores estudos experimentais descrevendo e correlacionando seus efeitos na morfologia e no mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos de ratos alcoolizados.

4. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos avaliar e correlacionar o efeito do alcoolismo crônico na morfometria (área ocupada pelas fibras musculares lisas, pelos espaços cavernosos e pelas fibras elásticas) e no mecanismo de apoptose (estudo da expressão gênica e protéica) nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de “alcoolismo semivoluntário” durante o período de seis semanas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (38x23x15cm – três ratos por gaiola), com tampa metálica tipo grade, forradas com maravalha. A temperatura ambiente foi mantida próximo à 25⁰ C com exaustão do ar ambiente contínuo e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) e água, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP/USP.

No presente estudo, os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, sob protocolo número 112/2007.

5.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

Grupo Controle (C): constituído por 12 animais, mantidos no biotério pelo mesmo período dos animais do grupo alcoolizado (grupo pareado). Estes animais foram sacrificados sem tratamento prévio.

Grupo Alcoolizado (A): constituído por 12 animais, dos quais seis foram utilizados para o estudo morfométrico e imuno-histoquímico; e seis para

o estudo da expressão gênica no tecido por RT-PCR. Todos os animais receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água pelo período de quatro semanas.

Para os animais do grupo A, foi utilizado o modelo de “alcoolismo semivoluntário”, no qual o fornecimento da solução de etanol a 20% foi o único líquido disponível a estes animais. Assim, a preparação desse grupo experimental ficou condicionada a um breve período de adaptação gradativa ao consumo de etanol. Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5%, 10% e 20%, tendo início a fase experimental, no início da quarta semana de tratamento (TIRAPELLI et al., 2001).

5.3. Análise morfométrica

Após a coleta de secções transversais da porção média do pênis dos animais C e A, as amostras foram imersas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 em temperatura ambiente para o estudo morfométrico e imuno-histoquímico.

Após fixação, as amostras foram submetidas à desidratação em bateria de progressiva de álcool, seguida pela diafanização por imersão em álcool-xilol e xilol. Posteriormente as amostras foram imersas em cubas de parafina a 60°C e por fim, a inclusão foi realizada em parafina fundida, mantida à temperatura ambiente por 24 horas. O material foi cortado a 3µm de espessura em micrótomo Reichert Jung 2040 e corado pela técnica de Tricrômico de *Masson*.

As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio Zeiss®, modelo *Axioskop 2 plus*, em aumento de 400 vezes. As imagens dos campos utilizados no estudo morfométrico foram registradas pela câmara (*Axio Cam Hrc* ®) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente arquivadas pelo programa *Axio Vision 4.6*®.

As seguintes análises morfométricas foram realizadas nos corpos cavernosos de seis animais de cada grupo experimental (C e A):

A) Área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa dos corpos cavernosos. Esta análise foi realizada em toda a extensão dos corpos cavernosos (Figura 2).

Figura 2. Fotomicrografia mostrando um dos campos fotografados para a mensuração da área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa (seta) demonstrada pela linha preta que a circunda, dos corpos cavernosos de rato controle. Espaço cavernoso (EC). Tricrômico de Masson, 400x.

B) Área ocupada (em μm^2) pelas lacunas ou espaços cavernosos. Esta análise foi realizada a partir de cinco campos escolhidos nas regiões

anterior e posterior de cada corpo cavernoso e na porção central entre estes (Figura 2).

C) Área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas do tecido conjuntivo dos corpos cavernosos (Figura 3). Esta análise foi realizada a partir dos cinco campos escolhidos para a avaliação anterior (área dos espaços cavernosos).

Figura 3. Fotomicrografia de rato controle mostrando a área total do campo ($94.019,38 \mu\text{m}^2$) fotografado para as mensurações: da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas (FC) e da área ocupada (em μm^2) pelos espaços cavernosos, demonstrada pela linha preta que o circunda (setas) internamente. Espaço cavernoso (EC). Tricrômico de Masson, 400x.

Assim, a partir dos mesmos campos escolhidos para as avaliações B e C, inicialmente foi obtido o valor da área total ocupada por cada campo em aumento de 400x (valor padrão de $94.019,38 \mu\text{m}^2$) e, em seguida, foi captado o valor total ocupado pelos espaços cavernosos. Assim, do valor padrão ocupado pelo campo era subtraído o valor ocupado pelos espaços

cavernosos, sendo este o valor equivalente ao valor da área ocupada principalmente pelas fibras colágenas, mas também pelas fibras elásticas e fibras musculares lisas (área total destes três constituintes histológicos). Isto se deve ao fato de que a coloração histológica utilizada nesta análise morfométrica (*Tricrômico de Masson*), ser específica para visualização de fibras colágenas (coradas em azul). Contudo, consideramos estes valores, de uma forma geral, correspondentes à área ocupada somente pelas fibras colágenas.

5.4. Análise imuno-histoquímica

A análise da expressão protéica foi realizada em seis animais por grupo, e em cada lâmina de reação imuno-histoquímica, foram selecionados dois campos (um em cada corpo cavernosos) em aumento de 400x, onde havia maior concentração de células positivas ou marcadas (áreas de “*hot spots*”) para a proteína relacionada ao mecanismo de apoptose (CASPASE 3 – pró-apoptótica). A partir da contagem do número total de células positivas (marcação nuclear) e negativas em cada campo, foi calculada a porcentagem de células positivas.

O método utilizado para a análise imuno-histoquímica foi o da avidina-biotina-peroxidase (*Novostain Super ABC Kit – universal, NCL-ABCu, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, Reino Unido*) – (*Kit mach 4 universal BIOCARE*). Assim, cortes de 3µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Reichert Jung 2040 (Reichert Microscope Services, Depew, Nova Iorque, EUA) e montados em lâminas histológicas pré-tratadas com silano (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) diluído em acetona.

Em seguida, foi realizada a desparafinização com xilol e hidratação (passagem sucessiva por soluções de etanol com concentrações decrescentes, terminando em água destilada). Após, foi realizada a inativação de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v), seguida pela recuperação antigênica por calor úmido com uma panela a vapor *Optistream Plus (Krups North America Inc., Millville, Nova Jérsei, EUA)* com tampão citrato a 10 mM com pH 6,0 por 35 minutos.

Para bloquear as ligações inespecíficas, as amostras foram imersas em soro normal de cavalo diluído em uma solução de leite em pó Molico (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) a 1,5% em tampão fosfato a 0,001 M com pH 7,2 (*phosphate buffer solution – PBS*) por quatro horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas no anticorpo primário: CASPASE 3 (*CP 229-B, Biocare Medical*) diluído a 1/300 em solução de PBS em albumina bovina sérica (*bovine serum albumine – BSA*) a 1,5. Na sequência, foi realizado o bloqueio da biotina endógena (*Biotin Blocking System, Dako North America Inc., Carpinteria, EUA*) e, somente então, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário do kit *MACH 4 Universal HRP-Polymer (M4BD534, Biocare Medical)* e em seguida com avidina-biotina-peroxidase do mesmo *kit* (1/200 em PBS).

Por fim, as reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (3, 3' - *Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA*) e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de *Harris*. Entre os passos descritos de incubação do anticorpo primário, bloqueio de biotina endógena, incubação do anticorpo secundário e complexo avidina-biotina-peroxidase, foram realizados quatro banhos com solução de

Tween 20 (Acros Organics, Geel, Bélgica) a 0,3% em tampão Tris a 0,05 M com pH 7,6; seguidos de um banho de PBS por cinco minutos cada.

As secções foram desidratadas em etanol, diafanizadas com xilol e montadas sob lamínula com líquido *Permunt* (Fischer Scientific Company LLC, Fair Lawn, Nova Jérsei, EUA).

Após o término das reações imuno-histoquímicas, as lâminas também foram analisadas utilizando o microscópio Zeiss®, modelo *Axioskop 2 plus*, em aumento de 400 vezes. As imagens dos campos utilizados para quantificação da CASPASE 3 foram registradas pela câmara (*Axio Cam Hrc* ®) acoplada ao microscópio, sendo posteriormente arquivadas pelo programa *Axio Vision 4.6*®.

5.5. Análise da expressão gênica do MiRNA-21

Para a análise da expressão gênica sérica, 1ml de sangue foi coletado da aorta abdominal, após anestesia e antes do sacrifício, para os dois grupos em estudo. Também foi realizada a análise da expressão gênica do MiRNA21, a partir da coleta de amostras do tecido cavernoso, que após serem colocadas individualmente em ependorf, foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido (-196⁰C) até o momento da sua utilização.

5.5.1. Extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas 10' por 2500 rpm e o "*buffy coat*" foi transferido para um tubo de 15ml. A seguir, foi lavado com tampão para lise de glóbulos vermelhos e mantido por 15' em gelo. Na sequência, seguiu-se mais uma centrifugação e

mais uma lavagem com tampão lise de glóbulos vermelhos. Para a obtenção do pellet (Figura 4), a amostra foi centrifugada por 10' a 2500 rpm. Adicionou-se 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol (Invitrogen, EUA) para congelamento a -80 °C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

Figura 4. Etapas da preparação das amostras para a realização da técnica de PCR em tempo real. A. Pelet de RNA (seta) extraído da amostra. B. Preparação dos poços contendo os reagentes para a reação de PCR a partir do cDNA da amostra. C. Placa de 96 poços utilizada para as reações de PCR em tempo real. D. Reagentes colocados em cada um dos poços (TIRAPELLI, 2007 - COM PERMISSÃO).

5.5.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) do miRNA-21

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do miRNA, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima *MultiScribeTM*, 0,094µl de *RNase out* (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

5.5.3. PCR em tempo real

O método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial do miRNA-21. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems).

Foi utilizado o sistema disponível comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão do miRNA-21 (002493).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um

gene *house-keeping* (neste caso o U6 (000391) para o miRNA na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador (neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle) resulta no $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Figura 5).

Figura 5. Representação do cálculo do ΔCT e $\Delta\Delta CT$ para a obtenção da quantificação da expressão do gene em estudo (fold) (TIRAPELLI, 2007 - COM PERMISSÃO).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. A amplificação foi realizada em um volume final de 10μl, utilizando 5μl do

reagente específico Taqman Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de ΔCT . O software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (*Applied Biosystems*). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “*software package*”.

5.6. Análise estatística

Para a avaliação de todos os estudos desta pesquisa (morfométrico, da expressão protéica e da expressão gênica), a análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunns. Foi utilizado o programa GraphPad Prism version 6.00 for Windows, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), sendo considerado estatisticamente significante valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Quando descrevemos o segmento médio do corpo cavernoso do pênis do rato albino *Wistar*, a partir do corte transversal, podemos identificar dois cilindros cavernosos com extensa comunicação entre si. Nota-se que o corpo cavernoso está constituído por uma forte membrana conjuntiva, a túnica albugínea, da qual partem traves que delimitam lacunas de tamanho e forma muito variáveis (Figura 6).

Figura 6. Fotomicrografia de secção transversal do pênis de rato onde podem ser identificados os dois corpos cavernosos (CC) revestidos pela túnica albugínea (seta) e contendo grande número de espaços cavernosos (em branco) no seu interior; ventralmente a uretra (U) no interior do corpo esponjoso e a veia dorsal profunda do pênis (VDP). Tricômico de Masson, 50x.

A raiz do corpo cavernoso apresenta trabéculas constituídas predominantemente por tecido muscular liso, revestidas por endotélio, com lacunas grandes, de formas e tamanhos variáveis. Algumas fibras colágenas também são observadas; porém, em maior quantidade nas trabéculas da região do corpo. Nesta porção, fibras musculares lisas são encontradas de

forma esparsa. As lacunas são menores quando comparadas às da região da raiz e também delimitadas por endotélio (Figura 7).

Figura 7. Fotomicrografia mostrando detalhe de algumas trabéculas conjuntivas constituídas principalmente por fibras colágenas (FC) em azul e por musculatura lisa subendotelial (setas mais delgadas). Ao centro um amplo espaço cavernoso (EC) contendo hemácias no seu interior (em vermelho) e revestido por endotélio (seta espessa). Tricrômico de Masson, 400x.

Já o conteúdo de fibras elásticas do tecido conjuntivo no corpo do corpo cavernoso é muito reduzido no interior das trabéculas. À medida que se afasta da região proximal dos corpos cavernosos, nota-se diminuição no volume de fibras musculares lisas que, nas suas regiões distais, estão presentes apenas em algumas trabéculas. É sugerido que as trabéculas, basicamente musculares na região das raízes, vão sendo invadidas por tecido conjuntivo, que predominam no corpo do corpo cavernoso (THOMAZINI, 1988).

O estudo ultraestrutural das lacunas na região do corpo dos corpos cavernosos, mostrou que em alguns pontos, as fibras musculares lisas projetam-se em forma de ponte para o interior destas, constituindo verdadeiros septos, que unem duas trabéculas opostas. Também foi observado por meio

da microscopia eletrônica de transmissão que as células endoteliais possuem aspecto achatado, com núcleo alongado e regular (THOMAZINI, 1988).

6.1. Avaliação morfométrica

6.1.1. Área ocupada pela musculatura lisa dos corpos cavernosos

A avaliação da área da musculatura lisa dos corpos cavernosos (em μm^2) nos animais C e A, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p= 0.0002$, Two-way ANOVA) entre os dois grupos (gráfico 1 e anexo).

Gráfico 1. Representação da média da área ocupada pelas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos em cada animal dos grupos C e A (Two-way ANOVA, $P = 0.0002$).

6.1.2. Área ocupada pelas fibras colágenas nos corpos cavernosos

Quando analisamos as médias da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas nos animais C e A (gráfico 2 e anexo), não observamos diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney, $p = 0.1988$) entre os grupos, com valores pouco menores para o grupo A.

Gráfico 2. Representação da média da área ocupada pelas fibras colágenas dos corpos cavernosos nos grupos C e A (Teste Mann-Whitney, $p = 0.1988$).

6.1.3. Área ocupada pelas lacunas ou espaços cavernosos

O gráfico 3 e anexo mostram as médias da área ocupada (em μm^2) pelos espaços ou lacunas cavernosos nos animais C e A. Não foi observada diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-

Whitney, $p = 0.1583$) entre os grupos, com valores pouco maiores para os animais do grupo A.

Gráfico 3. Representação da média da área ocupada pelas lacunas ou espaços cavernosos dos corpos cavernosos nos grupos C e A (Teste Mann-Whitney, $p = 0.1583$).

6.2. Análise por imuno-histoquímica de CASPASE 3

Para os animais do grupo A, foi observado marcação positiva nuclear para a proteína CASPASE 3 dispersa em todo o tecido cavernoso (marcação difusa), principalmente no tecido conjuntivo e com pouca marcação positiva nas células endoteliais (Figura 8). Pouca marcação positiva para CASPASE 3 foi observada nos animais do grupo C.

Figura 8. Fotomicrografia do corpo cavernoso de um animal do grupo A com marcação positiva para CASPASE 3 (setas), na região da trabécula de tecido conjuntivo (à direita). Espaço cavernoso (EC); 400x.

Foi observado maior expressão protéica de CASPASE-3 nos animais A quando comparado ao grupo C (Gráfico 4 e anexo) com diferença estatisticamente significativa (Two-way ANOVA, $p < 0,0001$).

Gráfico 4. Representação da média da expressão protéica de CASPASE 3 nos grupos C e A (Two-way ANOVA, $p < 0,0001$).

6.3. Análise da expressão gênica sérica do miRNA-21

A expressão sérica e no tecido cavernoso do miR-21 está representada nos gráficos 5 (Teste Mann-Whitney, $p=0.2135$) e 6 (Teste Mann-Whitney, $p=0.864$), respectivamente. Foi observado baixa expressão deste miRNA nos dois grupos, sendo pouco maior para os animais do grupo A, sem diferença estatisticamente significativa. Quando comparamos a expressão sérica e no tecido cavernoso, observamos expressão pouco maior no tecido cavernoso.

Gráfico 5. Representação da média da expressão gênica sérica do miRNA-21 nos grupos C e A (Teste Mann-Whitney, $p=0.2135$).

Gráfico 6. Representação da média da expressão gênica no tecido cavernoso do miRNA-21 nos grupos C e A (Teste Mann-Whitney, $p=0.864$).

7. DISCUSSÃO

A ereção peniana é um processo neurovascular complexo dependente do relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos e tem sido demonstrado que o NO, liberado dos nervos, é o maior agente relaxante em diversos mamíferos (ANDERSSON; WAGNER, 1995; AYDINOGLU et al., 2008). Estudos prévios demonstraram que as fibras musculares lisas do tecido cavernoso formam a base para o relaxamento dos sinusóides (SATTAR; SCHULMAN; WESPES, 1995; WESPES et al., 1991). Além disso, as fibras elásticas e colágenas são elementos importantes para uma ereção eficiente (GOLDSTEIN et al., 1985; PADMA-NATHAN et al., 1990; SATTAR; WESPES; SCHULMAN, 1994). A importância da musculatura lisa corporal e seu significado funcional, tem sido abordado em estudos experimentais e clínicos. Foi sugerido que as fibras musculares lisas contribuem para a rigidez e a estabilidade do pênis ereto por aumentar a pressão intracavernosa, que não poderia ser alcançado apenas por um mecanismo vascular (JEVTICH; KHAWAND; VIDIC, 1990). Diversos estudos mostraram que o tecido cavernoso em homens impotentes apresentou importante diminuição no conteúdo de fibras musculares lisas e de fibras elásticas quando comparado à homens sem impotência (SATTAR; WESPES; SCHULMAN, 1994; YAMAN et al., 2003).

Como consequência do seu consumo, a ação do etanol no sistema nervoso central causa vários efeitos na atividade sexual masculina, assim como as polineuropatias alcoólicas (MILLER; GOLD, 1988).

Como descrito por Benson e Doileau (1991), o alcoolismo crônico é um fator de risco bem conhecido para a impotência. Tem sido demonstrado que o etanol afeta significativamente tanto a contração quanto o relaxamento

da musculatura lisa dos corpos cavernosos de coelhos (HYUNG et al., 2000; SAITO et al., 1994). Yesilli et al. (2006) avaliaram o conteúdo de estruturas fundamentais dos corpos cavernosos por análise imuno-histoquímica em ratos tratados com etanol a 30% por até 12 semanas. Eles observaram diferença estatisticamente significativa na quantidade de fibras musculares lisas dos animais controle quando comparado ao grupo alcoolizado ($p= 0.002$), sendo menor neste último grupo.

Os achados são semelhantes aos encontrados neste estudo, pois após análise morfométrica das fibras musculares lisas dos corpos cavernosos em ratos controle e tratados com etanol a 20% durante sete semanas, observamos diminuição estatisticamente significativa na área ocupada pelo tecido muscular nos animais alcoolizados.

Adicionado a estes resultados, Yesilli et al. (2006) também observaram alterações no conteúdo de fibras colágenas e elásticas do tecido cavernoso. O conteúdo colágeno e elástico tem papel importante na capacidade do corpo cavernoso em alcançar rigidez, complacência e elasticidade durante a ereção. A elasticidade e a fácil expansão do tecido erétil promove compressão adequada e força de alongamento para drenar as vênulas abaixo da túnica albugínea e causa alta resistência à drenagem venosa (KIM et al., 1999). Assim, alterações nestas estruturas podem causar diminuição do relaxamento do tecido cavernoso a afetar o enchimento normal dos espaços vasculares (OHMURA; KONDO; SAITO, 1997; YOKOI et al., 1996). Após análise morfométrica da área ocupada pelos espaços cavernosos, obtida a partir de cinco campos escolhidos no tecido cavernoso em cada animal controle e alcoolizado, observamos valores pouco maiores nos animais

alcoolizados; porém, sem diferença estatisticamente significativa. Não encontramos na literatura, estudos semelhantes para discussão. No seu trabalho, Yesilli et al. (2006) observaram por avaliação histoquímica, decréscimo significativo no conteúdo de fibras elásticas ($p=0.002$) nos animais alcoolizados, comparados aos animais controle.

Diversos estudos por microscopia são comuns quanto à descrição de grande quantidade de fibras colágenas no tecido erétil de homens sadios (sem disfunção erétil). Esta matriz extracelular não deixa dúvida quanto à sua importante função durante as alterações estruturais extremas que ocorrem no pênis durante a ereção e a detumescência (GOLSTEIN et al., 1982 e 1985; PADMA-NATHAN et al., 1990).

A abundância do colágeno tipo IV pode ser explicado pela prevalência das células endoteliais que envolvem as trabéculas dos espaços cavernosos. Estas células são responsáveis pela secreção do colágeno tipo IV que forma a membrana basal dos vasos sanguíneos (FAWCHETT, 1986). A prevalência de células endoteliais e seu produto secretor, o colágeno tipo IV, atestam para a opinião de que o pênis é um órgão especializado de origem vascular (CONTI; VIRAG, 1989; VICKERS; SEILER; WEIDNER, 1990). Foi descrito por Vanegas et al. (1996) que na impotência orgânica e psicogênica, há diminuição no conteúdo de colágeno IV. Os resultados de Yesilli et al. (2006) demonstraram diminuição de colágeno tipo IV no tecido cavernoso dos animais alcoolizados ($p=0.002$), comparado aos animais controle.

Nosso estudo, a partir de avaliação morfométrica, quantificou a área ocupada pelas fibras colágenas; porém, de forma conjunta às fibras elásticas (coloração de tricrômico de *Masson*). Portanto, não foi realizada

avaliação morfológica e/ou imuno-histoquímica demonstrando exclusivamente as fibras colágenas e/ou o colágeno tipo IV nestes animais. Foi observado pequena diminuição na área ocupada pelas fibras colágenas nos animais alcoolizados, sem diferença estatisticamente significativa. Nossos resultados podem ser explicados pelo menor período de tempo em que os animais foram submetidos ao alcoolismo crônico, assim como pela concentração de etanol utilizada, em relação aos estudos de Yesilli et al. (2006). Nossos achados em relação à diminuição da área ocupada pelas fibras colágenas podem explicar o pequeno aumento observado na área referente aos espaços cavernosos nos animais do grupo A, como descrito anteriormente.

De acordo com os resultados de Yesilli et al. (2006) em adição a alguns resultados obtidos em nosso estudo morfométrico, podemos sugerir que a exposição crônica ao etanol pode alterar a expressão de actina nas fibras musculares lisas, assim como das fibras elásticas e colágeno tipo IV nos corpos cavernosos, que são as principais estruturas envolvidas na ereção peniana. Assim, o alcoolismo crônico pode levar à disfunção erétil nestes animais.

Aydinoglu et al. (2008) demonstraram pela avaliação funcional e pelo estudo ultraestrutural pela microscopia eletrônica de transmissão, que alterações degenerativas seletivas e funcionais são observadas nas células endoteliais dos corpos cavernosos em camundongos após 14 dias de tratamento por meio de inalação com etanol. Foram observadas múltiplas indentações profundas ou mais rasas na membrana nuclear das células endoteliais e núcleos com formas irregulares, permitindo aumento na área de contato entre o núcleo e o citoplasma. Em muitos casos isto parecia

demonstrar aumento de troca nucleocitoplasmática e da atividade metabólica (GHADIALLY, 1997). Segundo Aydinoglu et al. (2008), o aumento da atividade metabólica pode ser devido ao restabelecimento dos processos celulares em resposta aos danos endoteliais causados pelo etanol. Contudo, não foram observadas degenerações nas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos. Quanto aos experimentos funcionais, estes autores mostraram que 14 dias de exposição ao etanol, aboliu o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina, mas não alterou o relaxamento em resposta à estimulação elétrica e ao NO exógeno. Apesar dos danos histológicos e funcionais causados pelo etanol nas células endoteliais, a inervação e as fibras musculares parecem não ter sido funcionalmente afetadas e o efeito inibitório do etanol no relaxamento induzido pela acetilcolina tem sido correlacionado com os achados histológicos.

A morte celular programada tem um papel crítico durante o desenvolvimento e na homeostase celular normal. Kerr, Wyllie e Currie (1972) sugeriram que a apoptose é uma forma programada de morte celular, dependente de energia e descreve características morfológicas como a redução do volume celular, a presença de membrana com vesículas, condensação da cromatina e fragmentação do DNA. Contudo, a perda na regulação deste processo está implicada em doenças que vão desde o câncer e distúrbios autoimunes até doenças neurodegenerativas e isquemia.

Entre as caspases efetoras, a CASPASE 3 tem sido identificada como mediador chave da apoptose. As vias extrínseca e intrínseca de morte celular convergem na ativação de CASPASE 3, para a execução final da morte

programada (RAY et al., 2002), fato que nos motivou na escolha desta proteína como alvo do estudo do mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos.

Em nosso modelo de estudo, a apoptose foi avaliada pela expressão protéica de CASPASE 3 por imuno-histoquímica. Não foram encontrados estudos anteriormente descritos referente à expressão desta proteína nos corpos cavernosos associados ao alcoolismo crônico.

Vários estudos realizados em ratos demonstraram que a castração (YAMAMOTO et al., 2004; ZHANG et al., 1999), a denervação peniana (KLEIN et al., 1997; USER et al., 2003) e o diabetes mellitus causa apoptose nos corpos cavernosos (ALICI et al., 2000).

Kaplan; Olsson e Shabsigh (1994) descreveram a ocorrência de corpos apoptóticos especialmente nos corpos cavernosos e esponjoso de ratos no terceiro e no quinto dia após castração. Este achado sugere que um processo de remodelamento ocorre no pênis de ratos castrados, por meio do mecanismo de apoptose, especialmente no tecido erétil. Receptores de andrógeno são encontrados no pênis e uma alta concentração de testosterona está presente nas células endoteliais dos corpos cavernosos (TIETJEN et al., 1998). Yamamoto et al. (2004) descreveram o importante papel da testosterona em manter a estrutura do corpo cavernoso e que a apoptose envolvendo a proteína p53 é induzida nos corpos cavernosos nos estados de deficiência de testosterona. Assim, no grupo de animais castrados e no grupo de animais que recebeu estrógeno (castração química), células apoptóticas observadas por TUNEL e a expressão da proteína p53 observada por imunofluorescência e *Western blot* foram observadas na pele e nas células endoteliais do pênis de ratos sacrificados após 5 dias do tratamento. Contudo, a frequência de células

positivas à apoptose e à proteína p53 não se alterou após 14 ou 28 dias. Estes animais também apresentaram aumento do colágeno intersticial, que pode alterar a construção do tecido peniano.

Foi descrito por Klein et al. (1997) que a neurotomia cavernosa no rato, induz a perda das células eréteis por apoptose e pode ser a causa de impotência pós-operatória ou a notável redução da massa peniana após prostatectomia radical. O estudo de Klein et al. (1997) demonstrou apoptose no pênis de ratos submetidos à exploração abdominal e lesão bilateral dos nervos cavernosos por cauterização. A avaliação da apoptose foi realizada pelo estudo da expressão gênica por PCR e por *Northern blotting* da glicoproteína-2 sulfatada (SGP-2), produto gênico com alta expressão nos tecidos que apresentam apoptose. Também foi utilizado o kit *ApopTag* para visualização de células apoptóticas após 1, 2, 3, 6 e 10 dias do procedimento cirúrgico nos animais denervados comparados aos animais sham, onde não foi observado morte celular por apoptose.

As proteínas e genes pró-apoptóticos Bak e Bax e anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-x estavam presentes no tecido peniano de ratos jovens entre 3 a 12 meses. Consequentemente, em ratos jovens seu balanço pode conduzir à condições de homeostase do tecido erétil. No tecido peniano de ratos mais velhos entre 18 e 28 meses, a expressão gênica e protéica de Bcl-2 e Bcl-x estavam ausentes, embora a expressão de Bak e Bax ainda fosse observada. Este achado de Yamanaka et al. (2002) sugere a ausência de mecanismo protetor contra a apoptose e favorece o aumento da velocidade da apoptose nas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos. A perda de genes anti-apoptóticos no tecido peniano de ratos mais velhos suporta a hipótese de

que a disfunção erétil relacionada à idade ocorre em decorrência ao mecanismo de apoptose das fibras musculares lisas, que pode levar à diminuição da pressão intracavernosa em resposta à eletroestimulação dos nervos cavernosos.

A disfunção erétil é uma complicação comum e causa importante diminuição da qualidade de vida em homens com diabetes, afetando cerca de 75% dos homens com esta doença. A fisiopatologia da disfunção erétil por diabetes é multifatorial e envolve alterações no sistema nervoso central, na atividade de inervação periférica e disfunção das células endoteliais (SAENZ, 2005). Alguns estudos descrevem aumento de células apoptóticas, principalmente devido a alterações na expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas que afetam a hemodinâmica de alguns órgãos (ALICI et al., 2000). Costa et al. (2009) mostraram altos índices de apoptose nos corpos cavernosos identificados por TUNEL e pela imunofluorescência para células endoteliais e fibras musculares lisas. Estas avaliações foram realizadas em pacientes não diabéticos e diabéticos com implante peniano. Nestes últimos, foi observado aumento significativo de células apoptóticas por imunofluorescência, principalmente nas células endoteliais dos espaços cavernosos. O mesmo pode ser observado para o TUNEL, onde as células em apoptose foram quantificadas a partir do estabelecimento de um índice de densidade de células apoptóticas para cada amostra.

Lizarte et al. (2009 e 2010) investigaram o efeito do diabetes e do consumo crônico de etanol durante quatro semanas, no relaxamento mediado pelo NO, na musculatura lisa dos corpos cavernosos de ratos. Pela análise imuno-histoquímica e da expressão gênica por PCR em tempo real, foi

observado alta expressão de eNOS e iNOS nas fibras musculares lisas dos ratos diabéticos e diabéticos associado ao consumo crônico de etanol, quando comparado aos animais controle e isocalórico. Isto demonstrou diminuição na capacidade de relaxamento induzido pela acetilcolina, na musculatura dos corpos cavernosos via mecanismo endotélio dependente; sugerindo que o consumo crônico de etanol induz disfunção endotelial.

Quando analisamos a expressão protéica de CASPASE 3, observamos alta expressão desta proteína, com diferença estatisticamente significativa, nos animais tratados com etanol quando comparado aos animais controle. Como esperado nestes animais, baixa expressão foi encontrada. A alta expressão de CASPASE 3, mesmo avaliada após sete semanas de tratamento com etanol, foi observada de forma difusa e não específica à uma estrutura que compõe o tecido cavernoso.

Estudos avaliaram alguns dos eventos celulares e moleculares relacionados às modificações estruturais dos corpos cavernosos com a idade; dentre estes a apoptose, a proliferação celular e a síntese da matriz extracelular (CASTELA et al., 2011). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos no mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos de animais alcoolizados, não foram ainda descritos.

Os miRNAs são conhecidos por desempenhar um papel importante em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo tumorigênese, proliferação celular, hematopoiese, metabolismo, função imune e doenças epigenéticas e neurodegenerativas (DHARAP et al., 2009). Não encontramos trabalhos que relacionassem a expressão de miRNAs no tecido

cavernoso, assim como a expressão do miRNA-21 e sua associação com o alcoolismo.

Estudos de Chan, Krichevsky e Kosik (2005) mostraram no tecido nervoso, que a ausência de apoptose está relacionada diretamente com um tipo específico de miRNA, o miRNA-21. A expressão aberrante desse miRNA, bloqueia a expressão de produtos gênicos que promovem a diferenciação normal das células da glia, ou que induzem apoptose, mantendo as células em um estado proliferativo contínuo. Dessa forma, o miRNA-21 foi classificado como um fator antiapoptótico. Inibindo sua expressão é possível obter a ativação da cascata de caspases e a morte celular por apoptose. Isso sugere que a hiperexpressão do miRNA-21 pode funcionar como um micro-oncogene, agindo pelo bloqueio da expressão dos genes ativadores da cascata de caspases.

Como fator anti-apoptótico em diversos sistemas biológicos, o miRNA-21 foi estudado por Buller et al. (2010) após isquemia cerebral em ratos. A hibridização *in situ* revelou alta expressão do miRNA-21 nos neurônios da zona isquêmica limítrofe, e a análise da expressão gênica por PCR em tempo real mostrou que após a isquemia, houve aumento de aproximadamente três vezes nos níveis de miRNA-21 nos neurônios isolados da zona isquêmica limítrofe, observado após microdissecção a laser, em comparação com os neurônios homólogos contralaterais, dois e sete dias após reperfusão. Portanto, os resultados indicaram que a alta expressão de miRNA-21 protege contra a morte neuronal isquêmica e que a baixa expressão do ligante indutor de morte FAS (FASL), que desencadeia a apoptose pela via extrínica, gene alvo do miRNA-21, provavelmente media o seu efeito neuroprotetor.

Sathyan, Golden e Miranda (2007) demonstraram que altas doses (320mg/dl) de etanol suprime a expressão de miRNAs específicos durante a neurogênese cortical (miRNA-21, miRNA-335, miRNA-9 e miRNA 153). Dados utilizando a técnica de microarray indicaram que destes, o miRNA-21 e o miRNA-335 foram os mais altamente suprimidos. Para o miRNA-21, ocorre por mecanismos via receptor GABA_A dependente. O miRNA sensível ao etanol, comporta-se como agonista ou antagonista para a sobrevivência e o crescimento do neuroepitélio e a supressão coordenada de miRNA-21 e miRNA-335, explica porque o etanol conduz à proliferação ao invés da morte dos precursores do córtex cerebral fetal. Estes dados indicam que os miRNAs sensíveis ao etanol controlam genes importantes durante o desenvolvimento.

Comparado aos achados anteriores, nossos resultados mostraram baixa expressão gênica do miRNA-21 no sangue e no tecido cavernoso dos animais alcoolizados, sendo pouco maior quando comparada aos animais do grupo C. Quando comparamos sua expressão entre o sangue e o tecido, ela foi pouco maior no tecido cavernoso. Sabemos, contudo, que o etanol suprime a ação do miRNA-21. Estes resultados nos fazem pensar que a ação do etanol, impedindo a alta expressão do miRNA-21, foi suficiente para induzir sua função supressora sobre este miRNA, no modelo de alcoolismo crônico experimental utilizado neste estudo.

O diagnóstico precoce e o tratamento de doenças complexas como o alcoolismo, podem se beneficiar dos estudos de miRNAs, designados para identificar marcadores moleculares específicos às doenças, que fornecem uma impressão digital da condição; ou para identificar potenciais alvos terapêuticos.

Os rápidos avanços no campo da genômica oferecem novos diagnósticos e potenciais para triagem até mesmo para doenças como o alcoolismo. A importância da compreensão nas alterações de expressão dos miRNAs relacionados ao abuso de álcool e dependência, pode ser apreciada pelo impacto de vários estudos em outras doenças, principalmente o câncer. Nesta doença, os estudos levaram a melhores estratégias terapêuticas e uma classificação molecular da doença, que promete ser mais precisa e informativa do que os testes tradicionais de diagnóstico. Uma melhor compreensão das alterações de expressão de miRNAs induzida pelo etanol, pode também fornecer meios precisos para diagnosticar várias consequências do abuso de álcool, bem como para identificar possíveis estratégias terapêuticas para tratar a condição e/ou consequências do uso abusivo do etanol (MIRANDA et al., 2010).

Há pelos menos dois caminhos importantes para enfatizar os estudos a respeito do alcoolismo humano: a busca de marcadores genéticos que indiquem a predisposição ao alcoolismo e, a busca de terapêuticas eficazes para o tratamento do alcoolismo (QUINTANILLA et al., 2006).

Assim, nosso estudo descreveu as alterações morfométricas nos corpos cavernosos, com o objetivo de correlacionar estas alterações com a expressão protéica de CASPASE 3 e a expressão gênica pelo estudo do miRNA-21 (anti-apoptótico), associado aos efeitos deletérios do etanol.

A expressão protéica de CASPASE 3 foi alta nos animais do grupo A, considerado seu efeito apoptótico nestes animais. Quando comparamos a expressão gênica sérica e no tecido cavernoso do miRNA-21,

observamos que ela foi baixa nos grupos C e A; portanto, com pouca atividade nestes animais.

Algumas descrições são encontradas na literatura, a respeito das principais alterações morfológicas no tecido cavernoso a partir da exposição crônica ao etanol. A partir do modelo de alcoolismo crônico utilizado neste trabalho, nossos resultados após a análise morfométrica, mostrou lesão principalmente nas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos nos animais tratados com etanol. Porém, a partir do estudo molecular relacionando o mecanismo de apoptose às lesões morfológicas do tecido cavernoso, pudemos mostrar resultados originais. A análise morfométrica correspondente à área ocupada pelas fibras musculares dos corpos cavernosos nos animais do grupo A mostrou correlação com os locais de maior expressão protéica de CASPASE 3 e, portanto, de apoptose. Neste estudo, também observamos que a morte celular por apoptose não foi suprimida pela expressão do miRNA-21, que se encontrou pouco expresso.

Assim, a partir da justificativa e objetivos propostos para a realização deste trabalho, pudemos trazer resultados originais quanto à investigação da associação entre a avaliação morfométrica do tecido cavernoso e o mecanismo de apoptose a partir de um modelo experimental para estudo do alcoolismo crônico, um dos principais problemas de saúde pública mundial.

8. CONCLUSÕES

A análise dos corpos cavernosos de ratos controle e submetidos ao tratamento crônico com etanol permitiu concluir que a área total ocupada pelas fibras musculares lisas dos corpos cavernosos, foi significativamente menor nos animais do grupo A comparado aos animais C, e estiveram correlacionados com os locais de maior expressão protéica de CASPASE 3 nos animais A. A expressão gênica sérica e no tecido cavernoso do miRNA-21, pouco maior nos animais do grupo A, foi suprimida pela ação do etanol e demonstrou correlação inversa com a expressão protéica de CASPASE 3, com prevalência da apoptose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOSEIF, S.R.; LUE, T.H. Hemodynamics of penile erection. **Urol. Clin. North Am**, v. 15, p. 1-7, 1988.

ALICI, B. et al. Apoptosis in the erectile tissues of diabetic and healthy rats. **BJU Int.**, v. 85 (3), p. 326-329, 2000.

ANDERSSON, K.E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. **J Urol**, v. 170, p. s6–s14, 2003.

ANDERSSON, K.E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol Rev**, v. 75, p. 191–236, 1995.

AYDINOGLU, F. et al. Effects of ethanol treatment on the neurogenic and endothelium-dependent relaxation of corpus cavernosum smooth muscle in the mouse. **Pharmacological Reports**, v. 60, p. 725–734, 2008.

AZADZOI, K.M. et al. Mechanisms of ischemia-induced cavernosal smooth muscle relaxation impairment in a rabbit model of vasculogenic erectile dysfunction. **J Urol**, v. 160, p. 2216–2222, 1998.

AZADZOI, K.M. et al. Hemodynamics of penile erection: III Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. **J. Urol.**, v. 153, p. 521-526, 1995.

BARCINSKI, M. A. **Morte Celular**. IN: FERREIRA CG, ROCHA JCC. Oncologia molecular. 1^a ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2004, cap.5, p. 57-64.

BENSON, G.S.; DOILEAU, M.A. The penis: sexual function and dysfunction. In: Gillenwater JY, Groyhack JT, Howards SS, Duckett JW eds **Adult and Pediatric Urology**. Vol. 2 Mosby Year Book, Philadelphia 1991, pp. 1599–1642.

BLANCO, R. et al. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II. Acetylcholine synthesis. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 468-472, 1988.

BORTOLOTTI, A. et al. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. **Int. J. Androl.**, v. 20, p. 323-334, 1997.

BULLER, B. et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death, **The FEBS Journal**, v.277, n. 20, p. 4299-4307, 2010.

BURNETT, A.L. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. **J Urol**, v. 157, p. 320–324, 1997.

BURNETT, T.A.L. et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. **Science**, v. 257, p. 401–403, 1992.

CAGNON, V.H.A. et al. Ultrastructural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. **The Prostate**, v. 28, p. 341-346, 1996.

CÂNDIDO, E.M. et al. Experimental alcoholism and pathogenesis of prostatic diseases in UChB rats. **Cell Biology International**, v. 31, p. 459-472, 2007.

CASTELA, A. et al. Erectile tissue molecular alterations with aging: differential activation of the p42/44 MAP Kinase pathway. **AGE**, v. 33, p. 119-130, 2011.

CHAN, J.A.; KRICHEVSKY, A.M.; KOSIK, K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6029-6033, 2005.

CLAIR, H. R. St. Recognizing alcoholism and its effects: a mine-guide. **Basel:S. Karger**, p. 105, 1991.

CONTI, G.; VIRAG, R. Human penile erection and organic impotence: Normal histology and histopathology. **Urol Int**, v. 44, p. 303–308, 1989.

COSTA, C. et al. Increased endothelial apoptotic cell density in human diabetic erectile tissue--comparison with clinical data. **J Sex Med**, v. 6, p. 826-835, 2009.

CROCE, C.M.; CALIN, G. A. "miRNAs, cancer, and stem cell division." **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6-7, 2005.

DE LIMA, J.M.B. Da necessidade de uma nova abordagem – Parte II. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 33, p. 171-172, 1997.

DHARAP, A. et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral MicroRNA. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, p. 675–687, 2009.

DOLGANIUC, A. et al. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, p. 1704–1710, 2009.

FÁVARO, W.J.; CAGNON, V.H.A. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 609-618, 2008.

FAWCHETT, D.W. Connective tissue proper. In: Fawcett DW eds Bloom & Fawcett: **A Textbook of Histology**, vol. 9. WB Saunders, Philadelphia 1986, pp. 139–142.

FONTANELLI, B.A.F. et al. Chronic Ethanol Consumption Alters All-Trans-Retinoic Acid Concentration and Expression of Their Receptors on the Prostate:

A Possible Link Between Alcoholism and Prostate Damage. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 1, p. 49-56, 2013.

GARDNER, E.; GRAY, D.J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia. Estudo regional do corpo humano**. 4ªed. Editora Guanabara Koogan AS: Rio de Janeiro, 1978.

GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix**, 4th edn. Butterworth-Heinemann, Boston, 1997. Vol. 1, Chapter 1 (Nucleus), 2–10.

GOLDSTEIN, A.M.B. et al. The fibrous skeleton of the corpora cavernosa and its possible function in the mechanism of erection. **Br J Urol**, v.57, p. 574–578, 1985.

GOLDSTEIN, A.M.B. et al. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. **Urology**, v. 20, p. 259–266, 1982.

GOLDSTEIN, I. et al. Vasculogenic impotence: role of the pelvic steal test. **J.Urol.**, v. 128 (2), p. 300-306, 1982.

GRAYHACK, J.T.; KOZLOWSKI, J.M. Benign prostatic hyperplasia. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW eds **Adult and pediatric urology** 3rd Mosby Year Book, Baltimore 1996, pp. 1501–1574.

HATAKE, K. et al. Increased endothelium-dependent vascular relaxation in ethanol-fed rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 18, p. 1018–1023, 1994.

HAYASHIDA, H. et al. Comparison of neurogenic contraction and relaxation in canine corpus cavernosum and penile artery and vein. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 72 (3), p. 231-240, 1996.

HEDLUND, P.; ALM, P.; ANDERSSON, K.E. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127 (2), p. 349-360, 1999.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **Acta Physiol. Scand.**, v. 449, p. 295-311, 1992.

HYUNG, J.K. et al. Effects of acetaldehyde on responses of rabbit corpus cavernosal smooth muscle. **J Korean Med Sci**, v.15, p. 295–298, 2000.

IGNARRO, L.; MURAD, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p. 501-516, 1995.

JEVTICH, M.J.; KHAWAND, N.; VIDIC, B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. **J Urol**, v. 143, p. 289–293, 1990.

KALANT, H. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. **Biol. Alcohol. Biochem.**, v.1,p.1-62, 1983.

KAPLAN, S.A.; OLSSON, C.A.; SHABSIGH, R. Androgen deprivation and apoptosis in rat erectile tissue. **J Urol**, v. 151, p. 492, 1994.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239– 257, 1972.

KIM, H.J. et al. Effects of ethanol and its metabolite acetaldehyde on responses of the rat bladder. **BJU Int**, v. 83, p. 686–692, 1999.

KIM, N. et al. A nitric oxide-like factor mediates neurogenic relaxation of penile smooth. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 112-118, 1991.

KIM, N. et al. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 437-442, 1993.

KLEIN, L.T. et al. Apoptosis in the rat penis after penile denervation. **J Urol**, v. 158 (2), p. 626-630, 1997.

KNISPEL, H.H.; GOESSL, C.; BECKMAN, R. Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. **J. Urol.**, v. 146, p. 1429-1433, 1991.

KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 1648-1659, 1989.

LIZARTE, F.S. et al. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. **Urology**, v. 74 (6), p. 1250-1256, 2009.

LIZARTE, F.S. et al. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. **BJU Int.**, v. 105 (11), p. 1592-1597, 2010.

LOO, G.V. et al. The role of mitochondria factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death and Differentiaton**, v. 9, p. 1031-1042, 2002.

LUCAS, K.S. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52 (3), p. 375-414, 2000.

LUE, T.F. et al. Hemodynamic of erection in the monkey. **J. Urol.**, v. 130, p. 1237-1241, 1983.

LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Physiology of erection and pharmacological management of impotence. **J Urol**, v. 137, p. 829–836, 1988.

MARTINEZ, F.E. et al. Effects of experimental chronic alcoholism on the male system of the rat (*Rattus norvegicus*). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 12, n.2, p. 143-148, 1995.

MARTINEZ, M. et al. Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of *Calomys callosus*. **Tissue & Cell**, v. 41, p. 199-205, 2009.

MARTINEZ, M. et al. Evaluation of the ethanol intake on the *Calomys callosus* seminal vesicle structure. **Micron**, v. 39, p. 587-592, 2008.

MEHTA, S.L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Res. Rev.**, v. 54, p. 34–66, 2007.

MENDELL, J.T. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. **Cell Cycle**. v. 9, p. 1179-1184, 2005.

MENDES, L.O. et al. Mast Cells and Ethanol Consumption: Interactions in the Prostate, Epididymis and Testis of UChB Rats. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 1, p. 10.111, 2011.

MILLER, N.S.; GOLD, M.S. The human sexual response of alcohol and drugs. **J Subst Abuse Treat**, v. 5, p. 171-177, 1988.

MIRANDA, R.C. et al. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 34, n. 4, p. 575-587, 2010.

MOON, D.G. et al. Effect of TCDD on corpus cavernosum histology and smooth muscle physiology. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, p. 224–230, 2004.

OHMURA, M.; KONDO, A.; SAITO, M. Effects of ethanol on responses of isolated rabbit urinary bladder and urethra. **Int J Urol**, v. 4, p. 295–299, 1997.

PADMA-NATHAN, H. et al. The effects of aging, diabetes, and vascular ischemia on the biochemical composition of collagen found in the corpora and tunica of potent and impotent men. **Int J Impotence Res**, v.2, p. 75–78, 1990.

PICKARD, R.S.; POWELL, P.H.; ZAR, M.A. The effects of inhibition of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 755-759, 1991.

PINARDI, G. et al. Effects of chronic ethanol consumption on alpha-adrenegicinduced contractions in rat thoracic aorta. **Gen Pharmacol**, v. 23, p. 245–248, 1992.

PINHEIRO, P.F.F. et al. Morphologic changes in the urethral epithelium in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). **Micron**, v. 5, p. 8, 2007.

PUDDEY, I.B. et al. Alcohol and endothelial function: a brief review. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 28, p. 1020–1024, 2001.

RAND, M.J.; LI, C.G. Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 659–682, 1995.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.**, v. 9 (4-5), p. 281-96, 1983.

RAY, S.K. et al. Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiform: up regulation of calpain and CASPASE 3. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, n. 2, p. 197-206, 2002.

RIEDL, S.J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 897-907, 2004.

ROMAN, B.L.; PETERSON, R.E. In utero and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs prostate development. 1. Effects on gene expression. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 150, p. 240 – 253, 1998.

RUBIN, H.B.; HENSON, D.E. Effects of alcohol in male sexual responding. **Psychopharmacology**, v. 47, p. 123–134, 1976.

RUSSEL, S.; NEHRA, A. The physiology of erectile dysfunction. **Herz.**, v. 4 (28), p. 277-283, 2003.

SAENZ, T. Pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med**, v. 2, p. 26-39, 2005.

SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; KRANE, R.J. Local control of penile erection: nerves, smooth muscle and endothelium. In: Krane RJ (ed.), Impotence. **Urol. Clin. North Amer. Philadelphia: W. B. Saunders Co.**, v. 15, p. 9-15, 1988.

SAENZ DE TEJADA, I. et al. Smooth muscle of the corpora cavernosae: role in penile erection. **Surg. Forum.**, v. 36, p. 623-624, 1985.

SAENZ DE TEJADA, I. et al. Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. H1590-H1595, 1991.

SAITO, M. et al. Pharmacological effect of ethanol on the function of rabbit corporal cavernosal tissue. **Pharmacology**, v. 48, p. 335–340, 1994.

SATTAR, A.; SCHULMAN, C.; WESPES, E. Objective quantification of cavernous endothelium in potent and impotent men. **J Urol**, v. 153, p. 1136–1138, 1995.

SATTAR, A.; WESPES, E.; SCHULMAN, C. Computerised measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **Eur Urol**, v. 25, p. 142–144, 1994.

SHIRAI, M. et al. Hemodynamic mechanism of erection in the human penis. **Arch. Androl.**, v.1, p. 345-349, 1978.

STANDRING, S. **Gray's Anatomia. A base anatômica da prática clínica.** 40^a ed. Editora Elsevier:Rio de Janeiro, 2010.

SULLIVAN, M.E. et al. Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetics rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. **The journal of Urology**., v. 158, p. 1966-1972, 1997.

SULLIVAN, M.E. et al. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? **Cardiovasc. Res.**, v. 43, p. 658-665, 1999.

TEIXEIRA, C.E. et al. Effect of Tityus serrulatus scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrergic nerve fibres. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123 (3), p. 435-442, 1988.

TEIXEIRA, G.R. et al. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. **Tissue & Cell**, v. 44, p. 47-53, 2012.

THOMAZINI, J.A. (1988). **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1988. Estudo morfológico do tecido erétil do corpo cavernoso do pênis do rato albino Wistar.

TIETJEN, D.N. et al. Characterization of penile androgen receptor expression in micropenis due to hypogonadotropic hypogonadism. **J Urol.**, v. 160, p. 1075-1078, 1998.

TIRAPELLI, L.F. et al. Morphometric analysis of seromucous acini and granular ducts of submandibular glands from rats submitted to experimental chronic alcoholism. **Rev. Chil. Anat.**, v.19, p.263-269, 2001.

TIRAPELLI, C.R. (2005). **Tese de doutorado**- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2005. Conseqüências celulares e funcionais do consumo crônico do etanol sobre o sistema endotelina vascular.

TRAISH, A.M. et al. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. **Endocrinology**, v. 140, p. 1861 – 1868, 1999.

VANEGAS, J.P. et al. Intra-cavernous collagen analysis in impotence. **Acta Urol Belg.**, v. 64 (1), p. 7-10, 1996.

VICKERS, M.A.; SEILER, J.R,M.; WEIDNER, N. Corpora cavernosa ultrastructure in vascular erectile dysfunction. **J Urol**, v. 143, p. 1131–1134, 1990.

WALTEREIT, R.; WELLER, M. The role of caspase 9 and 9-short (9S) in death ligand-and drug-induced apoptosis in human astrocytoma cells. **Molecular Brain Research**, v. 106, p. 42-49, 2002.

WANG, L.L. et al. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. **Hum Reprod**, v. 24, p. 562–579, 2009.

WANG, R. et al. Nitric oxide mediates penile erection in cats. **J. Urol.**, v.151 (1), p. 234-237, 1994.

WESPES, E. et al. Computerised analysis of smooth muscle fibers in potent and impotent patients. **J Urol**, v. 146, p. 1015–1017, 1991.

WILLIAMS, S.P.; ADAMS, R.D.; MUSTAFA, S.J. The effects of chronic ethanol treatment on endothelium-dependent responses in rat thoracic aorta. **Alcohol**, v. 7, p. 121–127, 1990.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251– 306, 1980.

YAMAMOTO, H. et al. Penile apoptosis in association with p53 under lack of testosterone. **Urol Res**, v. 32 (1), p. 9-13, 2004.

YAMAN, O. et al. Alterations of intracorporeal structures in patients with erectile dysfunction. **Urol Int**, v. 71, p. 87–90, 2003.

YAMANAKA, M. et al. Loss of anti-apoptotic genes in aging rat crura. **J Urol**, v. 168 (5), p. 2296-2300, 2002.

YESILLI, C. et al. A. Effects of ethanol on intracorporeal structures of the rat. **International Urology and Nephrology**, v. 38, p. 129–132, 2006.

YOKOI, K. et al. Effects of ethanol on in vivo cystometry and in vitro whole bladder contractility in the rat. **J Urol**, v. 156, p. 1489–1491, 1996.

ZHANG, X.H. et al. Apoptosis in rat erectile tissue induced by castration. **Asian J Androl**, v.1 (4), p. 181-5, 1999.

Tabela 1 – Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pela musculatura lisa dos corpos cavernosos nos grupos C e A.

Animal	Grupo C	Grupo A
1	118.045,23	91.882,94
2	109.774,92	94.261,76
3	115.034,8	96.903,05
4	102.802,49	94.117,33
5	111.281,74	89.412,14
6	107.515,08	93.955,62
7	104.702,12	88.894,52
Média (μm^2)	109.879,48	92.775,33

Tabela 2 – Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pelas fibras colágenas do tecido conjuntivo dos corpos cavernosos nos grupos C e A.

Grupo C							Grupo A					
Animal	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Média	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Média
1	54.259,58	66.747,96	59.253,37	60.759,39	62.404,12	60.684,88	57.093,01	61.398,57	59.631,58	62.976,95	63.409,75	60.901,97
2	64.285,46	59.903,52	67.105,33	68.296,93	60.195,17	63.957,28	62.376,66	56.075,35	60.777,61	61.662,22	58.134,85	59.806,13
3	64.471,17	60.870,88	63.356,68	65.278,12	62.793,54	63.354,07	61.455,61	62.760,85	57.137,35	62.743,95	61.996,97	61.218,94
4	66.475,19	61.750,56	59.506	61.640,14	63.294,42	62.533,26	56.085,17	64.426,16	64.905,84	62.743,95	61.643,73	61.960,97
5	63.632	62.731,78	66.108,01	62.490,89	60.208,01	63.034,13	62.315,76	63.331,17	65.561,36	61.734,46	61.304,66	62.849,48
6	62.661,54	64.273,75	61.973,02	63.190,97	63.631,09	63.146,07	62.315,56	59.803,85	60.214,62	61.607,15	65.107,81	61.809,79
7	59.047,27	63.103,61	59.214,86	59.311,58	60.497,22	60.234,90	64.648,1	61.231,35	62.547,72	62.216,85	60.314,91	62.191,78
Média						62.420,65						61.534,15

Tabela 3 – Valores por animal e média, da morfometria da área ocupada (em μm^2) pelas lacunas ou espaços cavernosos nos grupos C e A.

Grupo C							Grupo A					
Animal	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Média μm^2	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Campo 4	Campo 5	Média μm^2
1	39.759,8	27.271,42	34.766,01	33.259,99	31.615,26	33.334,49	36.926,37	33.787,32	34.387,8	32.166,4	31.645,41	33.782,66
2	29.733,92	34.115,86	26.914,05	25.722,45	33.824,21	30.062,09	31.642,72	37.944,03	33.241,77	32.357,16	35.884,53	34.257,04
3	29.548,21	33.148,5	30.662,58	28.741,26	31.225,84	30.665,78	32.563,77	31.258,53	36.882,03	31.275,43	32.022,41	32.800,43
4	27.544,19	32.268,82	34.513,38	32.379,24	30.724,96	31.486,18	37.934,21	29.593,22	32.279,74	29.113,54	32.375,65	32.231,15
5	30.387,38	31.287,6	27.911,37	31.528,49	33.811,37	30.985,24	31.703,62	30.688,21	28.458,02	32.284,92	32.714,72	31.169,89
6	31.357,84	29.745,63	32.046,36	30.828,41	30.388,29	30.873,3	31.703,82	34.215,53	33.804,76	32.412,23	28.911,57	32.209,58
7	34.972,11	30.915,77	34.804,52	34.707,8	33.522,16	33.784,47	29.371,28	32.788,03	31.471,66	31.802,53	33.704,47	31.827,59
Média						31.598,79						32.611,19

Tabela 4 – Valores por animal e média, da expressão protéica de CASPASE 3 nos corpos cavernosos dos animais C e A.

Animal	Grupo C		Grupo A	
	Campo 1	Campo 2	Campo 1	Campo 2
1	Pos. 03 Neg. 113 Total/% 116/2.58%	Pos. 01 Neg. 135 Total/% 136/0.73%	Pos. 27 Neg. 123 Total/% 150/18%	Pos. 11 Neg. 108 Total/% 119/9.24%
2	Pos. 01 Neg. 142 Total/% 143/0.69%	Pos. 02 Neg. 126 Total/% 128/1.56%	Pos. 14 Neg. 103 Total/% 117/11.96%	Pos. 16 Neg. 112 Total/% 128/12.5%
3	Pos. - Neg. 110 Total/% 110/0%	Pos. 02 Neg. 137 Total/% 139/1.43%	Pos. 10 Neg. 108 Total/% 118/8.47%	Pos. 14 Neg. 135 Total/% 149/9.39%
4	Pos. 01 Neg. 148 Total/% 149/0.67%	Pos. 01 Neg. 133 Total/% 134/0.74%	Pos. 25 Neg. 137 Total/% 162/15.43%	Pos. 17 Neg. 126 Total/% 143/11.88%
5	Pos. 02 Neg. 141 Total/% 143/1.39%	Pos. 02 Neg. 155 Total/% 157/1.27%	Pos. 11 Neg. 115 Total/% 126/8.73%	Pos. 13 Neg. 121 Total/% 134/9.70%
6	Pos. - Neg. 134 Total/% 134/0%	Pos. 01 Neg. 149 Total/% 150/0.66%	Pos. 13 Neg. 106 Total/% 119/10.92%	Pos. 09 Neg. 123 Total/% 132/6.81%
7	Pos. - Neg. 124 Total/% 124/0%	Pos. 01 Neg. 137 Total/% 138/0.72%	Pos. 10 Neg. 112 Total/% 122/8.19%	Pos. 15 Neg. 120 Total/% 135/11.11%
Média		0.88%		10.88%