

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

JOÃO PAULO DA CUNHA

**Expressão do microrna-27b, eNOS e iNOS nos corpos
cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes
*mellitus***

**Ribeirão Preto
2016**

JOÃO PAULO DA CUNHA

**Expressão do microrna-27b, eNOS e iNOS nos corpos
cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes
*mellitus***

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Silvio Tucci Júnior

Ribeirão Preto

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Cunha, João Paulo

Expressão do microrna-27b, eNOS e iNOS nos corpos cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes *mellitus*, 2016.

45 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Tucci Jr., Silvio

1. Alcoolismo. 2 Diabetes. 3. corpus cavernosum
4. microRNA 5. eNOS 6. iNOS 7. Disfunção erétil

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO DA CUNHA

Expressão do microRNA-27b, eNOS e iNOS nos corpos cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes *mellitus*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

Cunha, JP. Expressão do microRNA-27b, eNOS e iNOS nos corpos cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes *mellitus*. 45 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

A Disfunção Erétil (DE) é um problema de elevada prevalência e mostra-se relacionada com o envelhecimento, diabetes, etilismo, obesidade, dislipidemia, tabagismo e outras doenças que se demonstram relacionadas com disfunção endotelial. O Óxido Nítrico (NO), produto da ação da Óxido Nítrico Sintetase (NOS), foi comprovado ser o mais importante vasodilatador de musculatura lisa associado à ereção. Os microRNAs (miRNA) são moléculas recentemente descobertas, que supõe-se atuar como reguladoras de aproximadamente um terço dos genes humanos. O miRNA-27b está relacionado à função endotelial e angiogênese. O presente trabalho tem por objetivo estudar a expressão da NOS endotelial (eNOS) e indutível iNOS), além do miRNA-27b nos corpos cavernosos e sangue periférico de ratos saudáveis, diabéticos, alcoolizados e com as duas patologias. Foram criados 4 grupos de 12 ratos Wistar: grupo controle(saudáveis) (C), grupo com alcoolismo (A), grupo diabético (D) e grupo com as duas patologias (A+D). Em cada grupo, 6 animais foram estudados por imunohistoquímica para eNOS e iNOS e 6 animais tiveram a expressão gênica da eNOS, iNOS e miRNA-27b avaliados por qT-PCR nos corpos cavernosos e sangue periférico. Os resultados demonstraram diminuição da expressão do miRNA-27b nos grupos A, D e A+D tanto na amostra tecidual quanto do sangue periférico. A imunohistoquímica mostrou maior expressão de eNOS no grupo D+A e de iNOS nos grupos A e A+D.

Palavras chaves: Alcoolismo, Diabetes, corpus cavernosum, microRNA, eNOS, iNOS, Disfunção erétil.

ABSTRACT

Cunha, JP. Expression of microRNA-27B, eNOS and iNOS in the corpus cavernosum of rats submitted to alcoholism and to diabetes mellitus. 45 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Erectile Dysfunction (ED) is a high prevalence problem and appears to be related to aging, diabetes, alcoholism, obesity, dyslipidemia, smoking and other diseases that show related to endothelial dysfunction. Nitric oxide (NO), a product of Nitric Oxide Synthase (NOS), was shown to be the most important vasodilator of smooth muscles associated with the erection. Micro-RNAs (miRNA) are recently discovered molecules which are supposed to act as regulators of approximately one third of human genes. The miRNA-27b is related to endothelial function and angiogenesis. This work aims to study the expression of endothelial and inducible NOS in addition to the miRNA-27b in the corpus cavernosum and peripheral blood of healthy rats, diabetic, alcoholic and with both pathologies. Were created four groups of 12 rats Wistar: control group (healthy) (C), a group with alcoholism (A), diabetic group (D) and group with both disorders (A + D). In each group 6 animals were studied for eNOS and iNOS immunohistochemistry and 6 animals the gene expression of eNOS, iNOS and miRNA-27b evaluated by qT-PCR in the corpus cavernosum and peripheral blood. The results showed increase expression of miRNA-27b in Group A, D and A+D in both the tissue sample and peripheral blood. Immunohistochemistry showed a increase of eNOS expression in group A+D and iNOS high expression in groups A and A+D.

Keywords: Alcoholism, Diabetes, Corpus cavernosum, MicroRNA, eNOS, iNOS, Erectile dysfunction.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do gene eNOS entre os grupos estudados..... 27
- Gráfico 2 - Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do gene iNOS entre os grupos estudados 27
- Gráfico 3- Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-27b no tecido entre os grupos estudados..... 28
- Gráfico 4 - Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-27b no sangue entre os grupos estudados..... 28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Anatomia e fisiologia da ereção peniana	12
Figura 2 -	Fluxo sanguíneo correlacionado com pressão intracavernosa: 1- fase latente; 2- tumescência; 3- ereção completa; 4- aumento da rigidez pela contração do isqueocavernoso; 5- detumescência inicial; 6- detumescência lenta; 7- detumescência rápida	13
Figura 3 -	Via da biogênese do microRNA (Urbich, 2008).....	18
Figura 4 -	Fotomicrografia da expressão global da proteína eNOS (setas) em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Observar marcação difusa endotelial no tecido erétil. Espaço vascularou cavernoso (EC).100x	29
Figura 5 -	Detalhe da marcação positiva para a expressão de eNOS no tecido cavernoso de um animal do GD+A. Observar espaçosvasculares ou cavernosos (EC) circundado pelas células endoteliais com forte marcação (setas). 400x	30
Figura 6 -	Marcação positiva para a expressão difusa de iNOS no tecido cavernoso de um animal do GA	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AUA	American Urological Association
Ca ²⁺	Cálcio
cDNA	Ácido desoxidorribonucleico complementar
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CC	Corpo cavernoso
CE	Corpo esponjoso
CT	Ciclo <i>threshold</i>
DCV	Doença cardiovascular
DE	Disfunção erétil
DEPC	Dietil pirocarbonato
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	Ácido desoxidorribonucléico
EC	Espaços cavernosos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EV	Espaço vascular
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GA	Grupo alcoolizado
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
L	Litro
Lin4	do inglês <i>lineage-deficient-4</i>
miR	MicroRNA
n	Tamanho da amostra

NA	Noradrenalina
NANC	Não adrenérgico e não colinérgico
ncRNAs	Ácido ribonucléico não codificante
ng	Nanograma
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
mg	Miligrama
ug	Micrograma
uL	Microlitro
ml	Mililitro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Molécula de oxigênio
qT-PCR	Técnica de PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Tempo real
rpm	Rotações por minuto
TE	Tecido cavernoso erétil
USP	Universidade de São Paulo
C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Justificativa.....	19
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Grupos experimentais	22
3.2.1 Grupo Controle (C).....	22
3.2.2 Grupo Alcoolizado (A)	22
3.2.3 Grupo Diabético (D).....	23
3.2.4 Grupo Diabético e Alcoolizado (D+A)	23
3.3 Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RTPCR)	24
3.3.1 Extração do RNA.....	24
3.3.2 Síntese de cDNA.....	24
3.3.3 Condições da reação de PCR em tempo real (qT-PCR).....	25
3.4 Análise imunohistoquímica	26
3.5 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 PCR em tempo real	27
4.1.1 Genes.....	27
4.1.2 microRNAs tecido.....	28
4.1.3 microRNAs sangue.....	28
4.1.4 Avaliação Imunohistoquímica	29
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A função erétil desempenha há milhões de anos um papel fundamental no processo evolutivo. Isto se torna mais evidente quando observamos que o intercuro de alguns mamíferos pode durar frações de segundo.

Problemas de ereção, como uma doença, são registrados desde 2000 a.C em papiros egípcios, sendo posteriormente investigados por Hipócrates, Aristóteles e Leonardo da Vinci¹. Nos últimos 25 anos houve uma revolução no tratamento da Disfunção Erétil (DE), quando pode-se entender o papel do óxido nítrico (NO) na fisiologia da ereção e empregou-se os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5) no tratamento da DE².

A DE ganha notoriedade quando falamos em epidemiologia e saúde pública. Estima-se que a prevalência global seja de aproximadamente 20% da população masculina³. Em 1995 foi estimado haver 152 milhões de homens com DE no mundo e projetou-se 322 milhões com esta doença para 2025⁴. A prevalência eleva-se com a idade e comorbidades como diabetes do tipo II, obesidade, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, dislipidemia, depressão e hiperplasia prostática benigna (HPB)⁵⁻⁷. A premissa de que DE e comorbidades associadas compartilham mecanismos fisiopatológicos como disfunção endotelial, obstrução arterial e inflamação sistêmica, é apoiada por vários autores⁸⁻¹¹.

O pênis é mantido em seu estado flácido com um baixo fluxo sanguíneo. As arteríolas e sinusóides mantêm-se contraídas em estado de repouso e isto da-se basicamente por três mecanismos: atividade miogênica intrínseca¹²; neuroestimulação adrenérgica; fatores derivados do endotélio (angiotensina II, PGF2 α e endotelinas)¹³⁻¹⁵. Após o estímulo sexual, para ocorrer a ereção, são necessários basicamente três eventos: relaxamento dos sinusóides, dilatação arterial e compressão venosa¹⁶. Em uma descrição cronológica de eventos, inicialmente temos um estímulo sexual com liberação de neurotransmissores nos terminais dos nervos cavernosos com ação direta sobre a musculatura lisa arterial e dos sinusóides e de maneira secundária, estimulando o endotélio a liberar fatores de relaxamento de musculatura lisa. Sucede-se a esse evento, um rápido influxo de sangue com expansão dos sinusóides terminando por comprimir o plexo das veias subtunicas e perforantes, causando represamento do sangue no corpo cavernoso.

Nesta ocasião o pênis apresenta-se com uma pressão de aproximadamente 100mmHg, esta pressão pode elevar-se pelo reflexo bulbocavernoso (pela contração do musculo isquiocavernoso), com progressivo bombeamento de sangue para dentro dos corpos cavernosos e conseqüente aumento de sua pressão, podendo chegar a varias centenas de mmHg. Nesta situação, o fluxo sanguineo dentro do corpo cavernoso é praticamente zero (Figura 1).

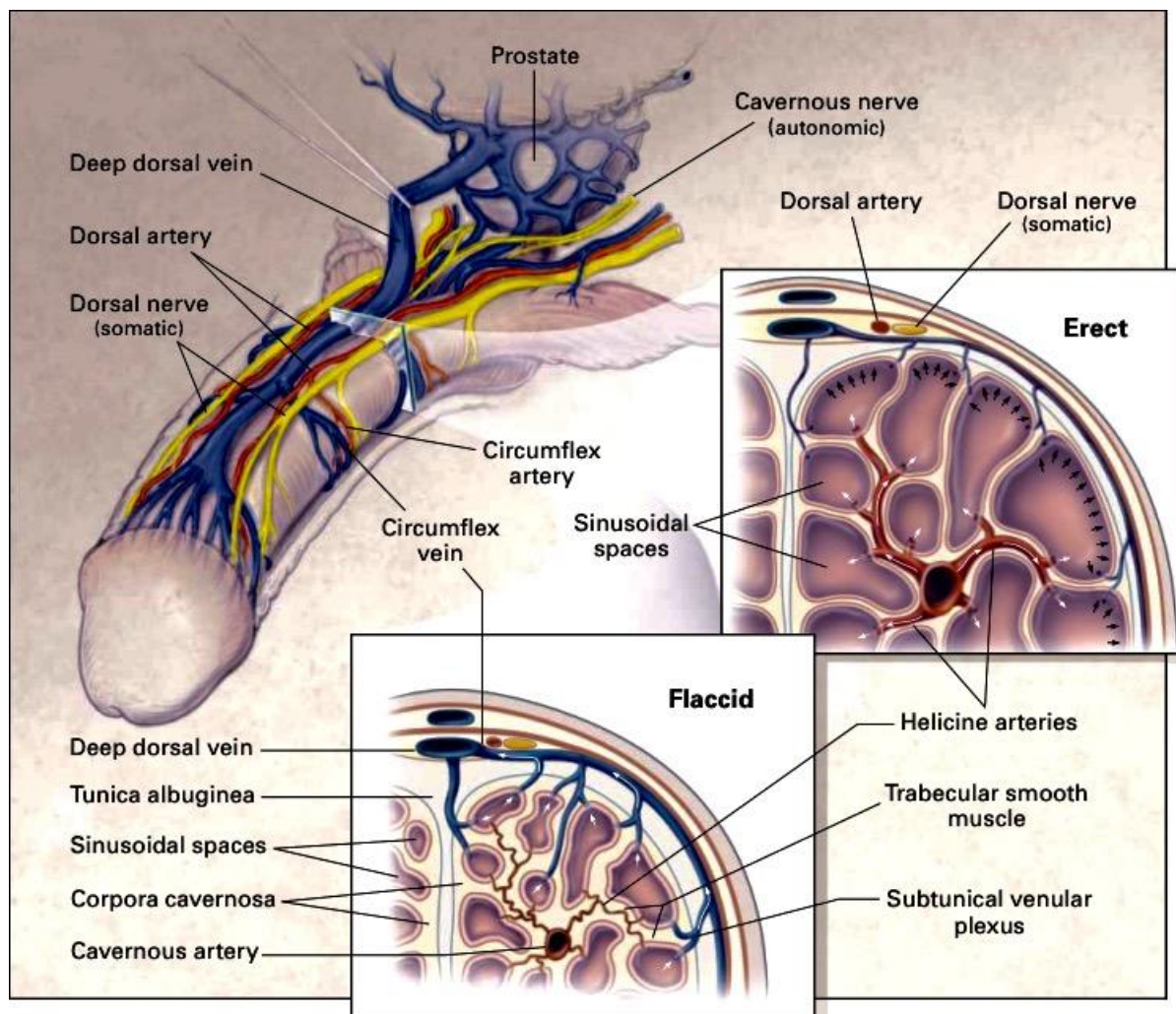


Figura 1: Anatomia e fisiologia da ereção peniana ¹⁷.

Para resumir os eventos hemodinâmicos que envolvem a ereção e a detumescência, sete fases têm sido observadas em experimentos animais onde pode-se relacionar o fluxo sanguíneo com a pressão intracavernosa. Estes eventos estão sobrepostos na Fig. 2, onde estão expostos as fases da ereção em ordem cronológica.

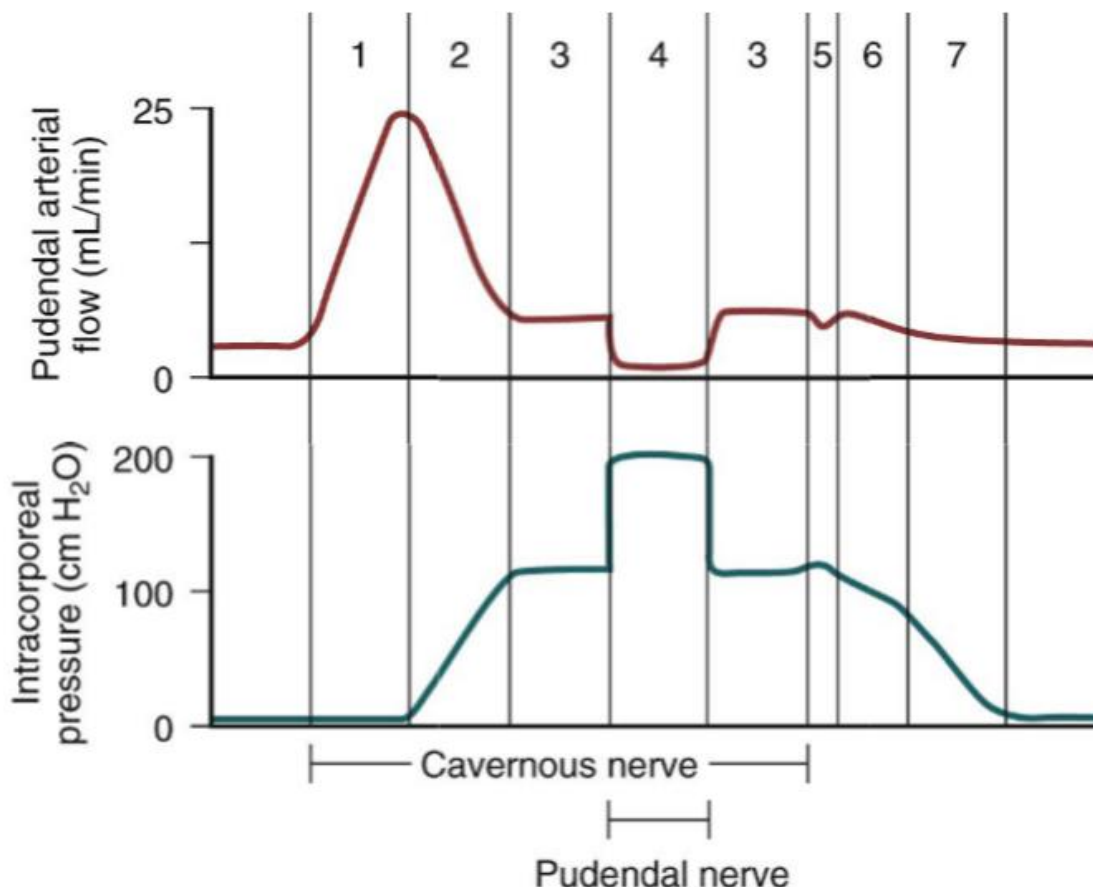


Figura 2: Fluxo sanguíneo correlacionado com pressão intracavernosa: 1-fase latente; 2-tumescência; 3-ereção completa; 4- aumento da rigidez pela contração do isqueocavernoso; 5- detumescência inicial; 6- detumescência lenta; 7- detumescência rápida¹⁶.

A importância do relaxamento da musculatura lisa destes vasos tem sido demonstrada em estudos animais e humanos, além disso, tem sido bem caracterizada em modelos experimentais uma ação vasodilatadora direta sobre a musculatura lisa cavernosa e uma ação endotélio dependente^{17,18}. A acetilcolina atua diretamente sobre a musculatura lisa cavernosa inibindo neurônios adrenérgicos pré-sinápticos^{19,20} e sobre as células endoteliais estimulando a liberação de NO. Hoje é amplamente aceito que a liberação de NO no tecido cavernoso é o mais importante evento desencadeador da ereção, ele surge como neurotransmissor de neurônios não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC) e como vasodilatador derivado do endotélio, atuando de forma a aumentar os níveis intracelulares de GMPc na musculatura lisa vascular cavernosa^{18,21-26}. É consenso que o NO derivado das terminações nervosas nitrérgicas (produzidas pela óxido nítrico sintetase neuronal – nNOS), é responsável pela rápida e inicial vasodilatação, enquanto o NO derivado do endotélio (produzido pela óxido nítrico sintetase

endotelial – eNOS), contribui pela manutenção da ereção²⁶. Desempenhando papel secundário, fatores derivados do endotélio que atuam como relaxadores de musculatura lisa, tais como: monóxido de carbono, prostaciclina (PGI₂) e endotelina (atuando estimulando receptores ETB)^{28,29}.

O NO é formado a partir do aminoácido precursor, L-arginina, pela ação enzimática da sintase de óxido nítrico (NOS), que existe como três isoformas principais: nNOS, eNOS e NOS induzível (iNOS). As três isoformas já foram detectadas no pênis, contudo, nNOS e eNOS são as principais isoformas expressas constitutivamente no tecido cavernoso em condições fisiológicas³⁰⁻³². Após liberação, o NO difunde-se localmente para as células do músculo liso adjacentes do corpo cavernoso e liga-se à guanilatociclase solúvel (sGC), que catalisa a conversão do trifosfato de guanósina (GTP) a 3',5'-monofosfato cíclico de guanósina (cGMP). Este nucleotídeo cíclico, por sua vez, ativa a proteína quinase G, também conhecida como proteína quinase I dependente de cGMP (cGKI), a qual diminui a concentração de cálcio (Ca²⁺) citosólico. O decaimento da concentração citosólica de Ca²⁺ induz o relaxamento das células de músculo liso vascular e do corpo cavernoso, levando à dilatação dos vasos arteriais, aumento do fluxo sanguíneo nos sinusóides do corpo cavernoso, e consequente ereção peniana^{33,34}.

A produção de NO pelas NOS, da-se com a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidina da L-Arg, formando NO e L-citrulina em duas etapas, com formação do intermediário N-hidroxi-L-arginina. Quanto aos mecanismos de ação, as NOS são divididas em duas famílias: (1) NOS constitutivas (isoformas neuronal e endotelial), reguladas pelo complexo Ca²⁺/calmodulina (CaM) e responsáveis pela produção de pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), o qual desempenha funções regulatórias na neuro transmissão e no sistema cardiovascular; e (2) NOS induzível, enzima essencialmente Ca²⁺-independente, responsável pela produção de NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão³⁵.

Ainda que os mecanismos responsáveis pela redução de liberação de NO na circulação peniana de pacientes com aterosclerose não tenham sido esclarecidos, os mesmos já foram investigados em outros vasos sanguíneos. Em artérias de animais com aterosclerose, há aumento da formação de O₂ devido à redução de atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD. A reação de O₂ com NO para formar ONOO⁻ pode reduzir a disponibilidade de NO, que levaria à vasoconstrição e consequentemente flacidez^{35,37}. O ONOO⁻ relaxa a musculatura lisa através da formação de GMPc, porém é cerca de 1000 vezes menos potente que o NO

Entretanto, o ONOO- também se degrada formando óxidos de nitrogênio e radical hidroxila altamente tóxicos para as células endoteliais³⁸.

Estudos recentes sugerem que a atividade de eNOS pode também ser regulada pelo endotélio mitogen, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). VEGF induz a fosforilação da ser-1177 em eNOS, dependendo da atividade de PI3-quinase e de Akt, no tecido cavernoso dos ratos e em células endoteliais penianas humanas isoladas. Interessantemente, vários estudos têm encontrado a expressão de VEGF aumentada em resposta ao estiramento mecânico, introduzindo a idéia que VEGF pôde mediar o fluxo de cisalhamento ou estiramento, induzindo a ativação de eNOS após o aumento inicial do fluxo sanguíneo provocado pela vasodilatação inicial dependente de neurônios NANC. Entretanto, um papel fisiológico para VEGF endógeno na ereção deve ainda ser melhor esclarecido. Os receptores VEGF-2 e algumas moléculas de adesão tem sido associados ao stress de cisalhamento nas células endoteliais vasculares. Foi relatada uma diminuição no receptor de VEGF e da expressão da proteína de Akt em um modelo animal de diabetes tipo II, sugerindo a participação desta via nesta doença associada à disfunção erétil³⁹.

Diversos estudos demonstraram que inibidores da NOS têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso provocado por estimulação elétrica em várias espécies, como coelho⁴⁰, cão^{41,42}, cavalo⁴³, macaco⁴⁴, rato⁴⁵, camundongo⁴⁶ e humanos^{47,48}.

Inibidores de NOS também bloqueiam as respostas eretogênicas *in vivo* decorrentes da estimulação do nervo cavernoso no coelho⁴⁹, no camundongo, no gato⁵⁰, no rato^{51,52}, estimulação da medula sacral no rato⁵³ e estimulação do nervo pélvico no cão⁵⁴.

Estudos demonstram que após a estimulação elétrica do corpo cavernoso, foram observados níveis teciduais aumentados de nitrito e citrulina em coelho⁵⁵ e em humanos foram detectados níveis aumentados de nitritos e nitratos⁴⁸. Na vigência de inibição da NOS ou bloqueio da condução axonal, observou-se o bloqueio na geração destes metabólitos do NO. Adicionalmente, o NO, bem como doadores de NO, relaxam preparações de tecidos eréteis de humanos e coelhos^{55,56} e causa tumescência em cães⁷⁵, gatos⁵⁷, macacos⁵⁸ e humanos⁵⁹. A estimulação direta do endotélio pela acetilcolina representa um mecanismo alternativo para a liberação de NO no pênis²⁴. Substância Pebradicina também podem relaxar o tecido cavernoso por estimular a formação e liberação de NO do endotélio^{50,59}.

Inibidores de guanilatociclase solúvel (GCs) regulam 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 GMPc nos relaxamentos de corpo cavernoso mediados pelo NO em várias espécies^{22,40,42,43,45,46,49}.

A ativação da GCs pelo NO causa uma elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do GTP^{60,61}. São propostos vários mecanismos para explicar a atividade relaxante resultante de um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO^{61,62}. Este inclui: (1) inibição da geração de inositol-1,4,5-trifostato; (2) aumentado seqüestro da Ca²⁺-citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca²⁺; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e (7) abertura de canais de K⁺.

Várias são as causas que podem levar a ED. Na classificação da *International Society of Impotence Research*, as causas estão divididas em orgânicas e psicogênicas. As orgânicas subdivididas em vasculogênicas (arteriais, venosas ou mistas), neurogênicas, anatômicas ou endócrinas. As psicogênicas são divididas em generalizadas e situacionais. Na prática clínica, observa-se as causas se sobrepondo e associadas com o uso de drogas e medicações, bem como agravadas por comorbidades. As drogas mais relacionadas à ED são antihipertensivos (diuréticos tiazídicos e β -bloqueadores não seletivos); psicotrópicos (neurolépticos, antidepressivos e ansiolíticos); antiandrogênicos (antagonistas de receptores androgênicos, análogos do LHRH e inibidores da 5- α redutase); opióides; antirretrovirais; drogas recreacionais onde deve-se destacar o tabaco e o álcool em grandes quantidades. Como citado anteriormente, algumas doenças estão associadas à ED e atuam simultaneamente em diversos fatores envolvidos com a ED como é o caso da Síndrome Metabólica, onde se associam hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, obesidade e diabetes⁶³.

O DM uma doença metabólica de etiologia múltipla bastante comum, caracteriza-se pelo aumento dos níveis glicêmicos sanguíneos. Estima-se que 2% da população global seja acometida. A prevalência de ED na população diabética é de aproximadamente duas a três vezes maior (28% vs. 9,6%)⁶⁴. São bem conhecidos os efeitos desta síndrome sobre o sistema vascular. O DM do tipo II, mais prevalente, pode aumentar de 2 a 4 vezes o risco de doenças cardiovasculares e complicações microvasculares⁶⁵⁻⁶⁷. A presença de ED está associada com um risco de até 14 vezes maior da presença de doença coronariana silenciosa, maiores complicações

cardiovasculares e morbidade⁶⁸. Os diabéticos apresentam maior incidência de ED, provavelmente pelas alterações vasculares e neurológicas decorrentes da doença, no entanto esta disfunção pode ocorrer mesmo com índices glicêmicos normais. Alterações patológicas nas artérias cavernosas⁶⁹, alterações ultraestruturais na musculatura lisa cavernosa⁷⁰ e diminuição do relaxamento endotélio dependente da musculatura lisa cavernosa¹⁷, foram observados em amostras de tecido cavernoso de pacientes diabéticos. Os mecanismos que levam à ED têm sido avaliados por estudos, onde alguns sugerem que o óxido nítrico e o estresse oxidativo desempenham importante papel³¹. Também foi observado uma diminuição da resposta de relaxamento do tecido cavernoso em ratos diabéticos pela diminuição do NO derivado do endotélio⁽³²⁾. O relatório da comissão do *Second International Consultation of Sexual Medicine*, resumiu diversas alterações relacionadas à ED em estudos com animais diabéticos e humanos. Alteração endotelial, diminuição da nNOS e eNOS, estresse oxidativo, diminuição da elastina, diminuição do fator de crescimento endotelial vascular, hipercontratilidade do tecido cavernoso e alteração do colágeno cavernoso levando a alteração do mecanismo veno oclusivo⁷¹.

O alcoolismo também tem sido associado com a ED, sendo este, em muitos locais um problema de saúde pública⁷²⁻⁷⁴. Diversos são os mecanismos descritos entre os quais as alterações neurológicas⁷⁵, endocrinológicas⁷⁶, psicológicas⁷⁷ e supostas alterações vasculares⁷⁸, onde observou-se associação com a alteração das endotelinas^{79,80}. O alcoolismo em baixas doses pode melhorar a função erétil pelo efeito vasodilatador e aumento do libido, pelo bloqueio da ansiedade, porém em altas doses, leva a diminuição da libido e ED^{81,82}. A redução dos níveis de testosterona⁸³ e aumento da descarga simpática poderia explicar tais achados⁸⁴. Outros achados sugerem uma diminuição da resposta de relaxamento do corpo cavernoso em ratos com alcoolismo crônico pela diminuição da resposta endotelial ao estímulo colinérgico⁸⁵. Um estudo com coelhos submetido ao alcoolismo por 6 semanas uma resposta elevada em relação ao controle para contração e relaxamento à atividade elétrica e a várias substâncias exceto o nitroprussiato de sódio, sugerindo alteração na função neurovascular⁸⁶. Um outro estudo em ratos mostrou lesão endotelial e diminuição da resposta endotélio dependente, quando a exposição ao álcool foi por 14 dias, mas não para 7 dias⁸⁸.

Em busca de esclarecer eventos moleculares associados à DE estudos atuais tem analisado o papel dos microRNAs (miRNA). Os microRNAs foram recentemente

reconhecidos como uma classe de moléculas curtas de RNA (em torno de 22 nucleotídeos), não codificadoras de proteínas, altamente conservadas (entre espécies distantes), cuja função parece ser a regulação da expressão gênica em seu nível pós transcricional. Eles podem atuar diminuindo a síntese proteica impedindo a tradução do RNA mensageiro (mRNA) ou promovendo a degradação do mRNA, dessa forma diminuindo a expressão de determinado gene⁸⁹. A Figura 1 mostra esquematicamente a ação do miRNA.

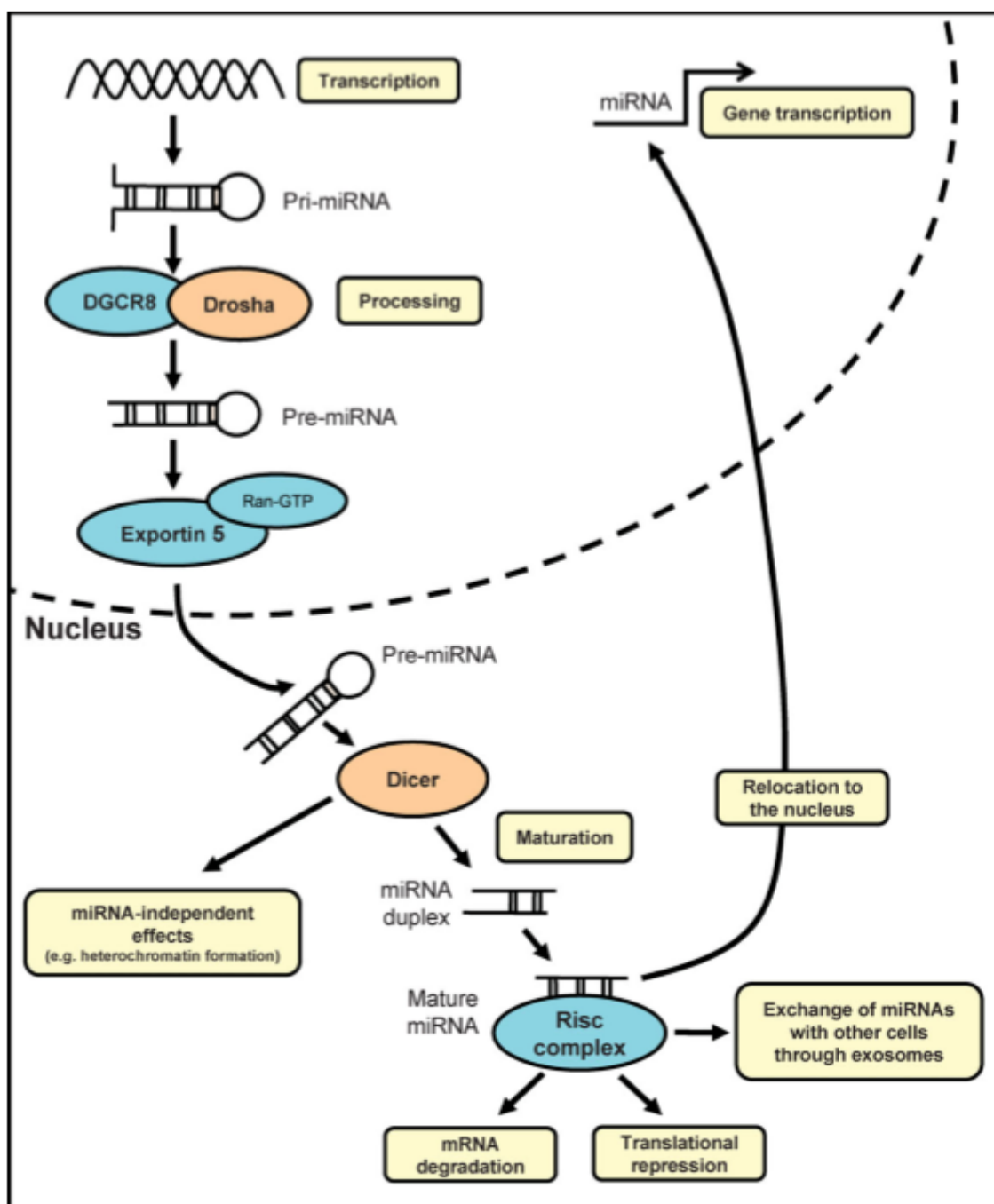


Figura 3: Via da biogênese do microRNA⁸⁹.

Existem mais de 7000s miRNAs descritos para as mais diversas espécies de vertebrados, invertebrados e plantas. A transcrição de um determinado miRNA, depende da localização de seu gene correspondente, que poderá estar em região não codificadora de um intron ou em uma região codificadora de um exon⁹⁰. Uma vez expresso, é chamado de pri-microRNA e pode conter mais de mil bases. Sua maturação é mediada por endonucleases RNase III: DICER e DROSHA⁹¹. Inicialmente o pri-miRNA apresenta uma estrutura *hairpin* que é clivada por Drosha ainda no núcleo gerando uma molécula precursora o pré-miRNA, este é transportado até o citoplasma onde é processado pela Dicer, transformando-o em uma molécula fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos. Após esta etapa, agora maduro, é incorporado ao *RNA-induced silencing complex* (RISC), e apenas uma das fitas permanece no complexo para controlar a expressão dos genes-alvos⁹².

Tem sido observado a expressão de diferentes tipos de miRNAs associados à diferentes tipos de tecidos e doenças. O miRNA-92b e miRNA-9, por exemplo, têm sido usados na diferenciação de tumores cerebrais⁹³. O miRNA-27b foi descrito associado ao endotélio vascular e angiogênese⁹⁴. Vários miRNAs são encontrados com expressão elevada em células endoteliais por técnicas de PCR, dentre as quais a let-7f e miR-27b. Este mesmo estudo mostrou que o bloqueio destes miRNAs alvejando Dicer e Drosha nestas células afetou a proliferação angiogênica⁹⁴. Foi ainda encontrado elevação do miRNA-27b no sangue periférico de pacientes com doença arterial periférica onde também havia elevação de substâncias relacionadas ao stress oxidativo⁹⁵. Ainda há muito a se estudar sobre as funções destes microRNAs em geral. Pretendemos neste estudo observar a expressão do miRNA-27b e sua relação com a eNOS e iNOS, cujas funções e mecanismos de ação já são mais estabelecidas e associadas a DE.

1.1 Justificativa

A disfunção erétil é uma doença prevalente que causa acentuado impacto na qualidade de vida do indivíduo. A principal causa desta doença é a alteração vascular que também relacionam-se com outras doenças e fatores: hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, dislipidemia, obesidade, sedentarismo e alcoolismo. Sendo o alcoolismo e o DM problemas endêmicos, e os

mecanismos fisiopatogênicos de sua relação com a DE ainda não completamente esclarecidos, torna-se necessário estudos para maior compreensão do tema abrindo possibilidades para novos recursos terapêuticos para a DE.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão gênica e protéica das isoformas iNOS e eNOS nos corpos cavernosos, assim como o microRNA-27b no tecido de corpos cavernosos e no sangue de ratos submetidos a modelo de alcoolismo e de diabetes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 48 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 durante o período pré-operatório, com livre acesso à ração balanceada 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 –USP.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

3.2.1 Grupo Controle (C)

Foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunohistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR. Todos os animais receberam diariamente água *ad libitum*.

3.2.2 Grupo Alcoolizado (A)

Foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunohistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR. Todos os

animais receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água pelo período de 3 semanas.

3.2.3 Grupo Diabético (D)

Foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunohistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR.

3.2.4 Grupo Diabético e Alcoolizado (D+A)

Foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunohistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR.

Para os animais do grupo etanol (A, A+D), 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, 20%, tendo início a fase experimental após a terceira semana de tratamento⁸⁸.

Já para os animais do grupo diabético (D, A+D), foi utilizado o modelo de indução de diabetes pela administração intravenosa de aloxana, após jejum alimentar de 24 horas, com fornecimento de água *ad libitum*. Uma única injeção de 50µL de solução contendo aloxana foi administrada na veia caudal dos animais. Depois deste procedimento, os animais foram alimentados normalmente e receberam solução de glicose 5% *ad libitum* por 4 horas. Decorrido este tempo, a solução de glicose foi substituída por água.

Para finalizar, cada rato recebeu 100 µl de insulina (100 UI/ml) diluído 1:10 em água destilada, por via subcutânea, 24 e 48 horas após a injeção de aloxana. Os

níveis de glicose sanguínea foram monitorados utilizando-se o aparelho Accu-CheckBlood glucose monitor (Boehringer Mannheim Corporation, Germany).

3.3 Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR)

3.3.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA do tecido, foi adicionado 250 μ L de PBS e 750 μ L de TRIZOL às amostras de corpos cavernosos, as quais foram lisadas em homogeneizador do tipo “Polytron” por aproximadamente 3 minutos. Em seguida, o RNA total foi extraído pelo método de TRIZOL (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Já para a extração do RNA do sangue, as amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal de animais anestesiados com tiopental sódico (Thiopental; 40 mg/kg i.p.), utilizando-se seringas heparinizadas. As amostras foram acondicionadas em tubos BD Vacutainer® com EDTA e centrifugadas 10’ por 3000 rpm, sendo o plasma transferido para um tubo eppendorf de 2,0 ml. Em seguida, o RNA total foi extraído com o RNeasy Mini Kit Qiagen®, conforme as instruções do fabricante.

3.3.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do mRNA a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (AppliedBiosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 0,5 μ g de RNA, foi adicionado 2,5 μ l de RT Buffer; seguido de 1,0 μ l de dNTP’s; 2,5 μ l de RandomPrimers e 1,25 μ l da enzima MultiScribe™, 0,6 μ l de RNase out, completando com água DEPC o volume final de 20 μ l. Já para a síntese do cDNA do microRNA a transcrição reversa foi realizada também utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems), porém para cada 5ng de

RNA, é adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNAs ou controles endógenos) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, sendo as amostras 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.

3.3.3 Condições da reação de PCR em tempo real (qT-PCR)

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão dos microRNA-27b, relacionados ao mecanismo de disfunção erétil em ratos nos grupos de estudo.

A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-PCR), com a utilização da TaqMan Master Mix (AppliedBiosystems). Para a análise quantitativa da expressão gênica, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqManAssay, compostos por oligonucleotídeos e sondas (AppliedBiosystems). 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 "housekeeping" (neste caso o β actina para o mRNA e RNU24, 48 para microRNAs) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT 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 Δ CT de uma amostra do Δ CT de outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT), reflete a diferença existente entre as amostras. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT}. Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 SequenceDetection System (AppliedBiosystems).

3.4 Análise imunohistoquímica

Neste estudo foram utilizados 24 animais, sendo as amostras dos corpos cavernosos, processadas de acordo com a rotina para a inclusão do tecido histológico do Laboratório de Histologia e de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP – USP.

Para a obtenção da expressão protéica para as isoformas de NOS (eNOS e iNOS), pela técnica de imunohistoquímica, foi utilizado o método de quantificação “em cruces” da imunorreatividade do tecido muscular liso dos corpos cavernosos marcados (imunorreativas). Os cortes foram avaliados quanto a porcentagem de células marcadas e graduadas de 0 (nenhuma marcação) até 4++++ (mais de 75% das células marcadas), sendo considerado 1+ quando a marcação ocorrer em até 25% das células, 2++ quando a marcação envolver de 25 a 50% das células e 3+++ quando de 50 a 75% das células estiverem marcadas. A análise das lâminas foi realizada em um microscópio Zeiss®, em aumento de 400x. As imagens serão registradas por uma câmera (Axio Cam Hrc ®) acoplada ao microscópio, que serão arquivadas pelo programa Axiovision 4.6®.

3.5 Análise Estatística

Para a técnica de qT-PCR, foram consideradas para análise as amostras em que a diferença entre as duplicatas não excediam meio ciclo. A partir do limiar foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 Real-Time PCR System os valores de Ct para cada amostra testada. Os valores, cujas diferenças entre os diferentes grupos experimentais foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis e seguido de pós-teste de Dunn's Multiple Comparison Test.

4 RESULTADOS

4.1 PCR em tempo real

4.1.1 Genes

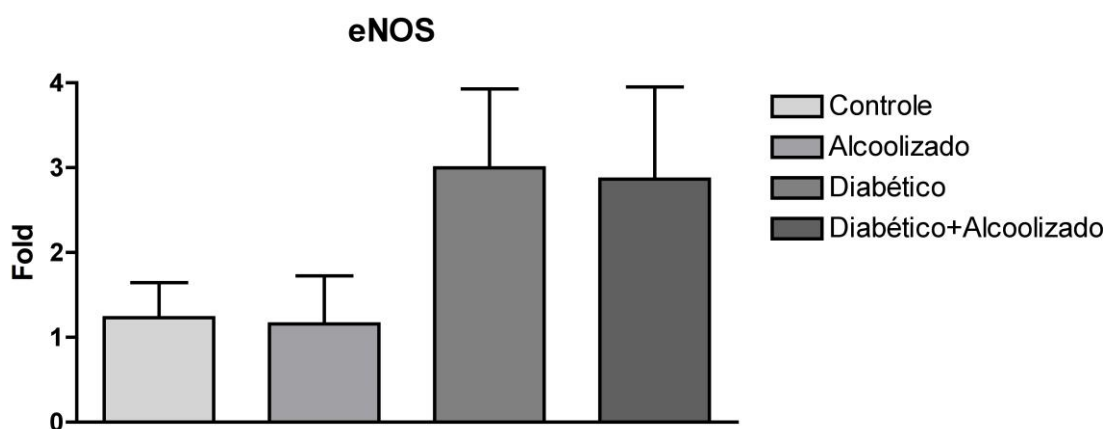


Gráfico 1: Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do gene eNOS entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa para os grupos ($p = 0,0968$, Kruskal Wallis test).

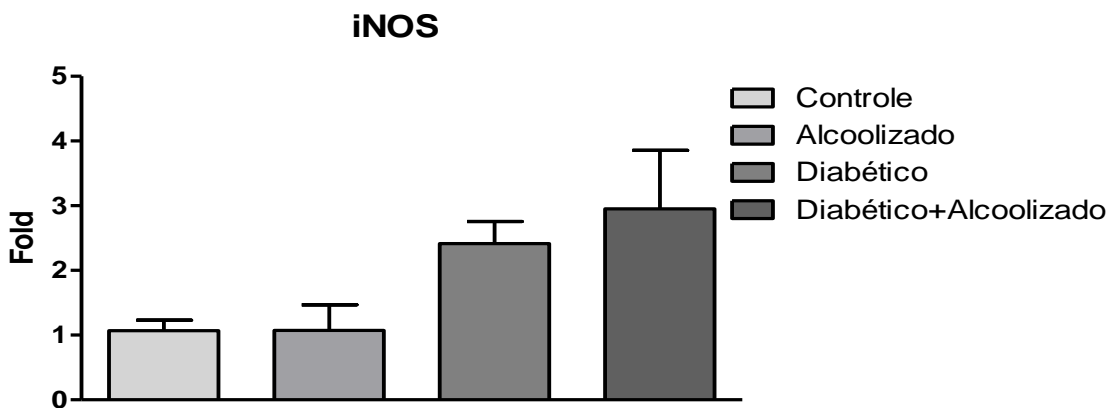


Gráfico 2: Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do gene iNOS entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0629$, Kruskal Wallis test).

4.1.2 microRNAs tecido

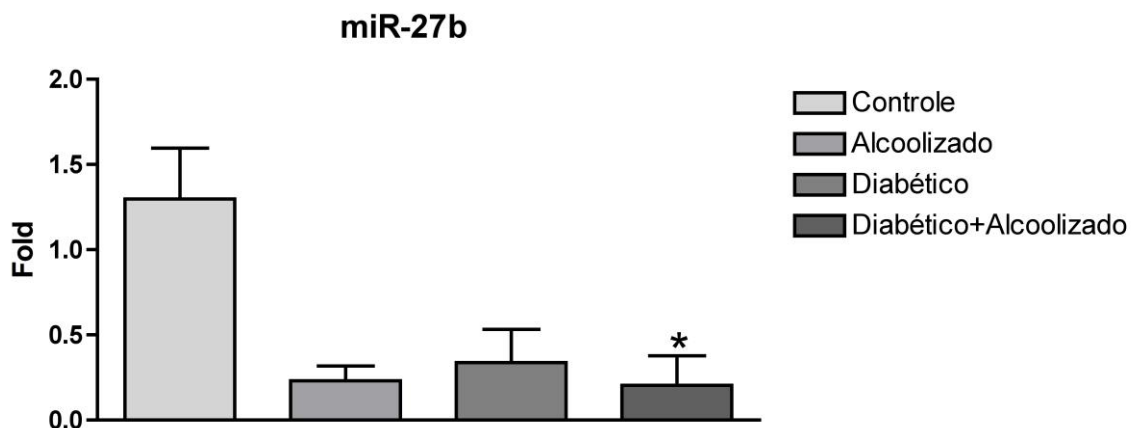


Gráfico 3: Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-27b entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo Diabético+alcoolizado ($p = 0,0123$, Kruskal Wallis test $p < 0,001$, pos-testDunn's).

4.1.3 microRNAs sangue

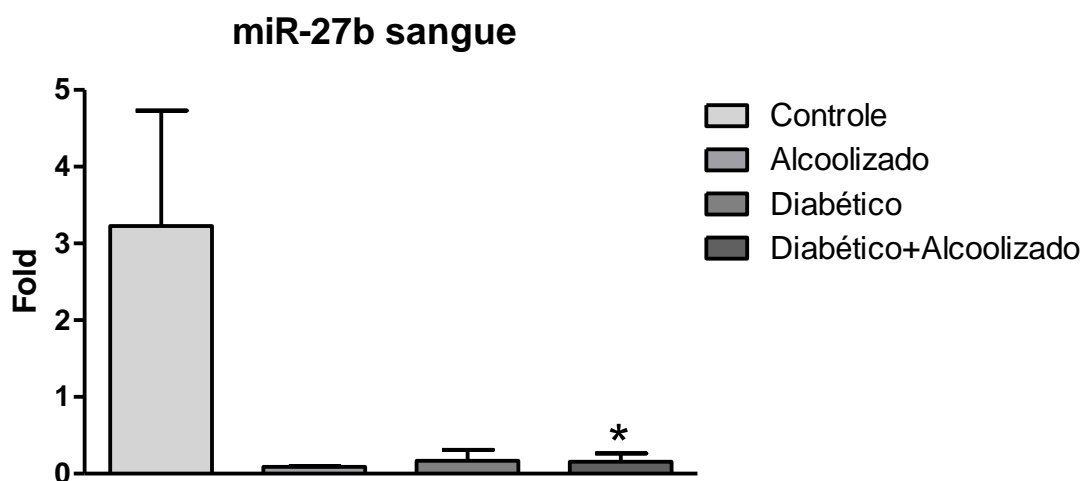


Gráfico 4: Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-27b entre os grupos estudados. Houve diferença significativa para o grupo controle em relação ao grupo Diabético+alcoolizado ($p = 0,0339$, Kruskal Wallis test, $p < 0,05$, pos-testDunn's).

4.1.4 Avaliação Imunohistoquímica

A partir da avaliação global do padrão de marcação para a expressão da proteína eNOS nos corpos cavernosos por imunohistoquímica, em todos os grupos estudados, foi observada baixa expressão tecidual nos animais em todos os grupos, sendo pouco maior nos animais do grupo GD+A (marcação por cruzes: 1X) (Figuras 4 e 5).

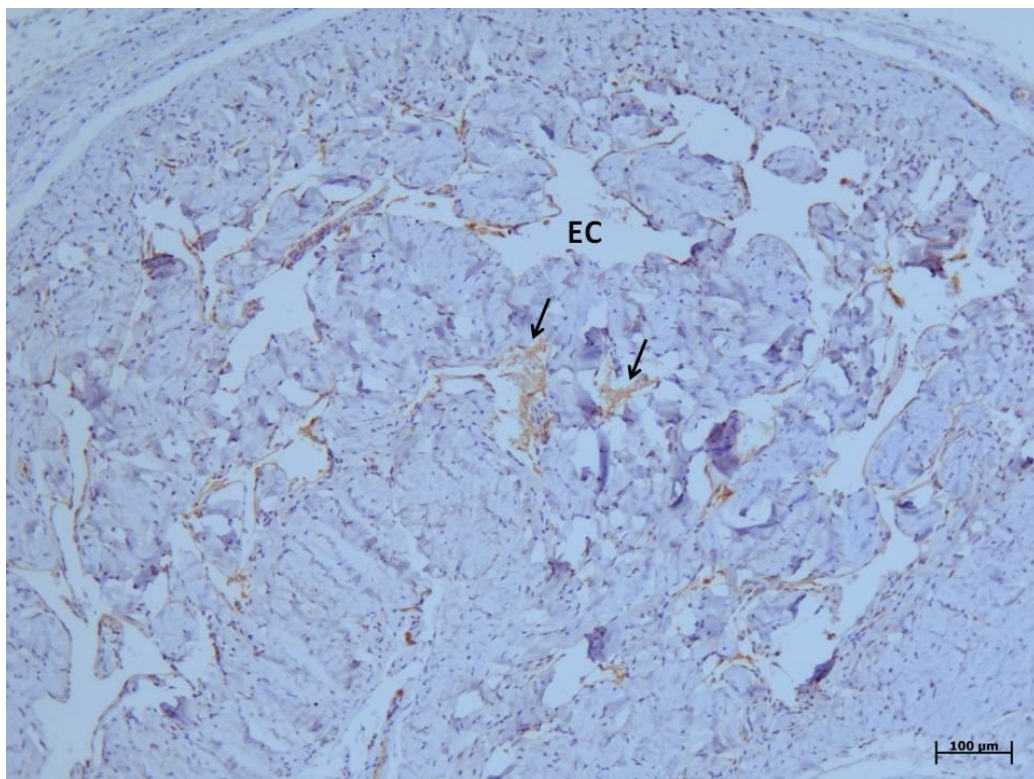


Figura 4: Fotomicrografia da expressão global da proteína eNOS (setas) em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Observar marcação difusa endotelial no tecido erétil. Espaço vascular ou cavernoso (EC).100x.

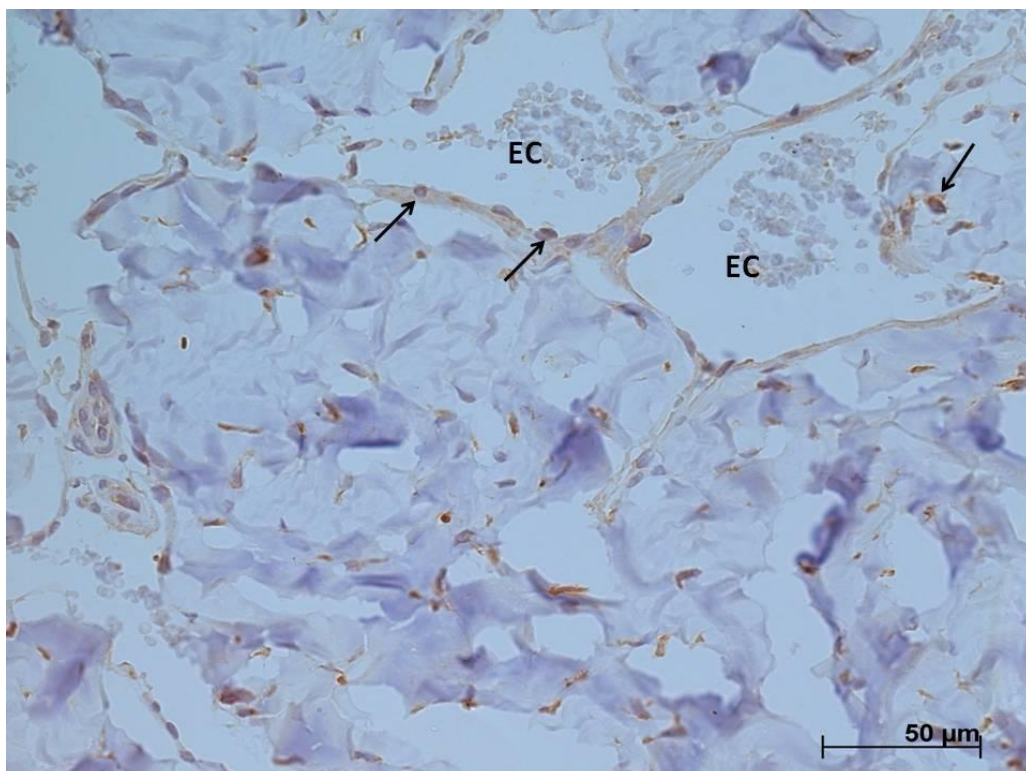


Figura 5: Detalhe da marcação positiva para a expressão de eNOS no tecido cavernoso de um animal do GD+A. Observar espaços vasculares ou cavernosos (EC) circundado pelas células endoteliais com forte marcação (setas). 400x.

A expressão protéica de iNOS nos corpos cavernosos dos animais do grupo controle (GC) e diabético (GD) foi baixa, sendo maior nos animais do GD+A e principalmente nos animais do GA, onde foi observada marcação positiva difusa no tecido erétil (marcação por cruces: 2X) (Figura 6).

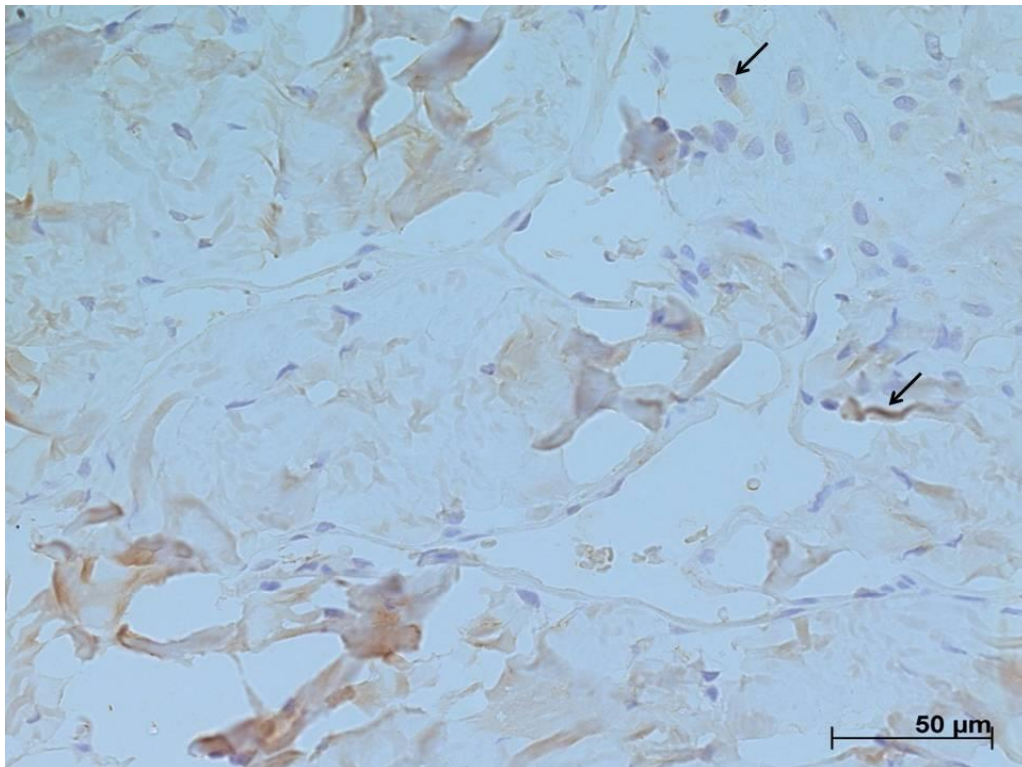


Figura 6: Marcação positiva para a expressão difusa de iNOS no tecido cavernoso de um animal do GA (setas). 400x.

5 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.^{12,71}

Como consequência do seu consumo, a ação do etanol no sistema nervoso central causa vários efeitos na atividade sexual masculina, assim como as polineuropatias alcoólicas⁸².

Como descrito por Benson e Doileau⁹⁶, 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 coelhos⁹⁷ e ratos⁹⁸. Estes estudos avaliaram o conteúdo de estruturas fundamentais dos corpos cavernosos por análise imunohistoquímica 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.

A disfunção erétil é uma complicação comum e causa importante da diminuição da qualidade de vida em homens com diabetes, afetando até 75% dos homens com esta doença. A fisiopatologia da disfunção erétil por diabetes é multifatorial e envolve alterações no sistema nervoso central, atividade da inervação periférica e a disfunção das células endoteliais⁷¹.

Estudos com o objetivo de avaliar o papel dos microRNAs em modelos experimentais diabetes e disfunção erétil são escassos. Liu e colaboradores (2011) demonstraram que o microRNA-145 apresentou baixos níveis de expressão em modelo de diabetes associado a disfunção erétil. Nossos resultados também demonstraram uma baixa expressão do microRNA-27b no grupo de animais submetidos ao diabetes¹⁰².

Lizarte et al.^{86,87} investigaram o efeito do diabetes mellitus e consumo crônico de etanol durante quatro semanas, no relaxamento mediado pelo óxido nítrico na musculatura lisa dos corpos cavernosos de ratos. Ao realizarem a análise de imunohistoquímica e da expressão gênica por PCR em tempo real, foi observado

alta expressão de eNOS e iNOS nas fibras musculares lisas dos ratos dos grupos etanol, diabéticos e diabéticos associado ao consumo crônico de etanol quando comparado aos animais do grupo controle. Estes estudos demonstraram uma diminuição na capacidade de relaxamento induzido pela acetilcolina, na musculatura dos corpos cavernosos dos animais, via mecanismo endotélio dependente; sugerindo, portanto, que o consumo crônico de etanol induz disfunção endotelial. Comparado aos achados descritos, resultados semelhantes foram demonstrados em nosso estudo na análise da expressão gênica de eNOS e iNOS dos animais dos grupos diabético e diabético alcoolizado, sendo observado também um aumento da expressão protéica de eNOS e principalmente de iNOS nos animais do grupo diabético alcoolizado.

Nossos resultados demonstraram, pela técnica de PCR em tempo, aumento da expressão gênica de eNOS e iNOS no grupo de animais diabéticos e também no grupo de animais diabéticos associado ao alcoolismo. Nos resultados da análise de expressão protéica de eNOS e iNOS por imunohistoquímica foi observada expressão de forma difusa no tecido cavernoso, tanto de eNOS quanto de iNOS, sendo que eNOS apresentou maior expressão no grupo Diabético-alcoolizado e iNOS apresentou aumento de expressão no grupo Diabético-alcoolizado e maior expressão ainda no grupo de animais submetidos ao alcoolismo isolado.

Sathyan, Golden e Miranda⁹⁹ 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 apresentaram níveis de expressão muito baixos, sendo que o o miRNA-21, regula mecanismos via receptor GABA_A dependente. Estes miRNAs alterados sobre a ação do etanol, comportam-se como agonistas ou antagonistas regulando a sobrevivência e o crescimento do neuroepitélio⁹⁹. A diminuição da expressão dos microRNAs miRNA-21 e miRNA-335, explica porque o etanol conduz à proliferação ao invés da morte dos precursores do córtex cerebral fetal pois os mesmos apresentam ação anti-apoptótica. Estes resultados sugerem que a ação do etanol, impedindo o aumento da expressão do miRNA-21, foi suficiente para induzir a função anti-apoptótica deste microRNA, no modelo de alcoolismo crônico experimental.

A maioria dos estudos sobre a ação dos microRNAs em modelos experimentais de alcoolismo crônico tem analisado o tecido nervoso. Portanto,

pouco se sabe sobre o papel dos microRNAs no tecido cavernoso. Em nosso estudo o microRNA-27b apresentou baixos níveis de expressão tanto no grupo submetido ao alcoolismo isolado quanto no grupo submetido ao alcoolismo associado ao diabetes.

Estudos recentes demonstraram que classes específicas de miRNAs afetam a função das células endoteliais que estão envolvidas em muitos aspectos da biologia vascular, produzindo diferentes fatores que atuam regulando a proliferação celular muscular lisa e o tônus vascular, dentre esses miRNAs tem sido relatado o miRNA-27b com um papel significativo na angiogênese de células endoteliais¹⁰⁰. Nossos resultados demonstraram baixa expressão gênica do miRNA-27b no sangue e no tecido cavernoso dos animais alcoolizados, diabéticos e diabéticos-alcoolizados, sendo menor quando comparada aos animais do grupo controle. Sabemos, contudo, que a supressão do miRNA-27b pelo etanol pode ser o responsável pela inibição da angiogênese das células endoteliais, sugerindo que a supressão da sua expressão inibe a formação de células endoteliais, promovendo assim um desequilíbrio nos mecanismos regulatórios do óxido nítrico que são essenciais para a ocorrência da angiogênese. Portanto, o alcoolismo crônico desempenha um importante papel na patogênese da disfunção erétil.

Nossos resultados demonstraram uma possível regulação das isoformas eNOS e iNOS pelo microRNA-27b, visto que os mesmos apresentaram níveis de expressão contrários, ou seja, a expressão gênica e proteica de eNOS e iNOS apresentaram aumento nos grupos diabéticos e diabéticos associado ao álcool enquanto a expressão do microRNA-27b foi baixa nos referidos grupos.

O diagnóstico precoce e o tratamento de doenças complexas como a disfunção erétil, o alcoolismo e o diabetes, 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 a disfunção erétil, o alcoolismo e diabetes. 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. Novos estudos tem levado a melhores estratégias terapêuticas e uma classificação molecular de doenças que prometem ser mais precisa e informativa¹⁰¹.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após análise dos corpos cavernosos de ratos controle, alcoólatra, diabético e diabético alcoólatra, nos permitiram concluir que:

- Foi observada maior expressão gênica de eNOS e iNOS no tecido cavernoso diabético e diabético-alcoolizado;
- Foi observada baixa expressão gênica tecidual e sérica do miR-27b nos grupos etanol, diabético e diabético-álcoolizado;
- A expressão protéica de eNOS por imunohistoquímica foi observada de forma difusa no tecido cavernoso, sendo maior no grupo Diabético-alcoolizado;
- A expressão protéica de iNOS por imunohistoquímica foi observada de forma difusa pelo tecido cavernoso, sendo maior nos animais dos grupos Álcool e Diabético-alcoolizado.

REFERÊNCIAS

1. Brenot PH. Male impotence—a historical perspective. France: L'Esprit du Temps; 1994.
2. Derogatis LR, Burnett AL. The epidemiology of sexual dysfunctions. *J Sex Med.* 2008;5:289-300.
3. Burnett AL. Phosphodiesterase 5 mechanisms and therapeutic applications. *Am J Cardiol.* 2005;96:29M-31M.
4. Aytac IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int.* 1999;84(1):50-6.
5. Braun M, Wassmer G, Klotz T, et al. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the Cologne Male Survey. *Int J Impot Res.* 2000;12:305-311.
6. Martin-Morales A, Sanchez-Cruz JJ, Saenz de Tejada I, et al. Prevalence and independent risk factors for erectile dysfunction in Spain: results of the Epidemiologia de la Disfuncion Erectil Masculina Study. *J Urol.* 2001;166:569-574.
7. Selvin E, Burnett AL, Platz EA. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. *Am J Med.* 2007;120:151-157.
8. Solomon H, Man JW, Jackson G: Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart.* 2003 89:251-253.
9. Montorsi P, Briganti A, Salonia A, et al.: Impaired vascular reactivity in patients with erectile dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1339-1340.
10. Ganz P. Erectile dysfunction: pathophysiologic mechanisms pointing to underlying cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2005;96:8M-12M.
11. Guay AT. ED2: erectile dysfunction = endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36:453-463.

12. Andersson KE, Wagner G: Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 1995; 75:191-236.
13. Becker AJ, Uckert S, Stief CG, et al.: Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology.* 2001;57(1):193-198.
14. Holmquist F, Andersson KE, Hedlund H: Actions of endothelin on isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol Scand.* 1990;139 (1):113-122.
15. Saenz de Tejada I, Carson MP, de las Morenas A, et al.: Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am J Physiol.* 1991;261(4Pt.2):H1078-H1085.
16. Lue TF, Takamura T, Schmidt RA, et al.: Hemodynamics of erection in the monkey. *J Urol.* 1983;130:1237-1241.
17. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoi K, et al. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med.* 1989;320:1025-1030.
18. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, et al.: Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Comm.* 1990;170:843-850.
19. Traish AM, Carson MP, Kim N, et al. Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. *J Urol.* 1990;144:1036-1040.
20. Saenz de Tejada I, Kim N, Lagan I, et al. Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J Urol.* 1989;142:1117-1121.
21. Holmquist F, Stief CG, Jonas U, et al. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol Scand.* 1991;143:299-304.
22. Kim N, Azadzoi KM, Goldstein I, et al. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J Clin Invest.* 1991;88:112-118.

23. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, et al. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992;257:401-403.
24. Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, et al. Nitric oxide—dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med*. 1996;2:288-296.
25. Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J Urol*. 1993;150:73-76.
26. Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, et al. Nitric oxide and cGMP mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol*. 1993;264 (2Pt.2):H419-422.
27. Burnet AL. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res*. 2004;16(1):15-19.
28. Crist GJ, Lerner SE, Kim DC, Melman A. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *The journal of urology*.1995;153:1998-2003.
29. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ &Mikhaildis. Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetics rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *The journal of urology*.1997;158:1966-1972.
30. Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod*. 1995;52(3):485-489.
31. Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, et al. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med*. 1996;2(3):288-296.
32. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*. 1992;326(2):90-94.
33. Dail WG, Barba V, Leyba L, Galindo R. Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res*. 1995;282(1):109-116.

34. Leite R, Giachini FR, Carneiro FS, Nunes KP, Tostes RC, Webb RC. Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2007;2(2):119-132.
35. Ignarro, L. & Murad, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology.* 1995;34:1-516.
36. Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(1):1822.
37. Darley-Usmar V, White R. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. *Exp Physiol.* 1997;82(2):305-316.
38. Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268(3):1114-1121.
39. Chitale K, Wessels H. Vasculogenic mechanisms of erectile dysfunction. *Drug Discovery Today: Diseases Mechanisms.* 2004;1(1):105-110.
40. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause of corpus relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170: 843-850.
41. Hedlund P, Larsson B, Alm P, Andersson KE. Distribution and function of nitric oxide-containing nerves in canine corpus cavernosum and spongiosum. *Acta Physiol.* 1995;155(4):445-455.
42. Hyashida H, Fujimoto H, Yoshida K, Tomoyoshi T, Okamura I, Toda N. Comparison of neurogenic contraction and relaxation in canine corpus cavernosum and penile artery and vein. *J Pharmacol.* 1996;72(3):231-240.
43. Recio P, Lopez PG, Hernandez M, Prieto D, Contreras J, Garcia-Sacristan A. Nitrgic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of cGMP. *Eur. J. Pharmacol.* 1988;351(1):85-94.
44. Okamura T, Ayajiki K, Toda N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol.* 1998;274(4Pt2):H1075-1081.

45. Hedlund P, Alm P, Anderson KE. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* 1999;127(2):349-360.
46. Mizusawa H, Hedlund P, Hakansson A, Alm P, Andersson KE. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.* 2001;132(6):1333-1341.
47. Holmquist F, Hedlund H & Andersson KE. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol.* 1992;449:295-311.
48. Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport,* 1994; 5(6):733-736.
49. Holmquist F, Stief CG, Jonas U & Andersson KE. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor N-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol.* 1991;143:299-304.
50. Wang R, Damer FR, Sikka SC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J Urol.* 1994;151(1):234-237.
51. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Ver Immunol.* 2001;21(5):399-425.
52. Escrig A, Marin R, Mas M. Repeated PGE1 treatment enhances nitric oxide and erection response to nerve stimulation in the rat penis by upregulation constitutive NOS isoforms. *J Urol.* 1999;162(6):2205-2210.
53. Finderg JPM, Levy S, Vardi Y. Inhibition of nerve stimulation-induced vasodilation in corpora cavernosa of the pithed rat by blockade of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1993;108:1038-1042.
54. Trigo-Rocha F, Aronson WJ, Hohenfellner M, Ignarro LJ, Rajfer L & Lue TF. Nitric oxide and cGMP: mediators of pelvic nerve-stimulated erection in dogs. *Am J Physiol.* 1993;1264:H419-H422.
55. Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ. Biosynthesis of nitric oxide and from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1993;186(1):308-314.

56. Holmquist F, Fridstrand M, Hedlund H, Andersson KE. Actions of 3-morpholininosydnomin (SIN-1) on rabbit isolated penile erectile tissue. *J Urol.* 1993;150(4):1310-1315.
57. Wang R, Domer FR, Sikka SC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J Urol.* 1994;151(1):234-237.
58. Hellstrom WJG, Monga M, Wang R, Domer FR, Kadowitz PJ & Roberts JÁ. Penile erection in the primate: induction with nitric oxide donors. *J Urol.* 1994; 151:1723-1727.
59. Truss MC, Becker AJ, Djamilian MH, SiiefCG, Jonas U. Role of the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate (SIN-1) in the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Urology*, 1994;44(4):553-556.
60. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52(3):352-357.
61. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):375-414.
62. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 1987;39:163-196.
63. Lue TF. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Campbell-Walsh Urology 10th, Elsevier*, 2012.
64. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, et al. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol.* 1994;151:54-61.
65. Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *J Diabetes Complications.* 2000;14(2):108-115.
66. Stratton IM, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321(7258):405-412.

67. Robinson AM, Ryder REJ. Impotence in diabetes. *Elsevier Science Inc.* 1997; 8:98-101.
68. Gazzaruso C, Giordanetti S, De Amici E, et al. Relationship between erectile dysfunction and silent myocardial ischemia in apparently uncomplicated type 2 diabetic patients. *Circulation.* 2004;110:22-26.
69. Michal V, Kramár R, Pospíchal J, et al. Vascular surgery in the treatment of impotence; its present possibilities and prospects. *Czech Med.* 1980;3:213-217.
70. Mersdorf A, Goldsmith PC, Diederichs W, et al. Ultrastructural changes in impotent penile tissue: a comparison of 65 patients. *J Urol.* 1991;145:749-758.
71. Sáenz de Tejada I, Angulo J, Cellek S, González-Cadavid N, et al. Pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2005;2(1):26-39.
72. Galduroz JC, Carlini EA. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil--2001. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(3):367-375 .
73. Tan ET, Johnson RH, Lambie DG, Vijayaseenan ME, Whiteside EA. Erectile impotence in chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1984;8(3):297-301.
74. Cheng JY, Ng EM, Chen RY, Ko JS. Alcohol consumption and erectile dysfunction: meta-analysis of population-based studies. *Int J Impot Res.* 2007;19(4):343-352.
75. Ravaglia S, Marchioni E, Costa A, Maurelli M, Moglia A. Erectile dysfunction as a sentinel symptom of cardiovascular autonomic neuropathy in heavy drinkers. *J Peripher Nerv Syst.* 2004;9(4):209-14.
76. Troncale JA. Endocrine effects of alcoholism. *J Fam Pract.* 1984;19(1):21-22
77. Krupnov AN, Shustov DI, Novikov SA, Kiselev DN. Peculiarities of erectile dysfunction in men with alcohol dependence. *Zh Nevrol PsikhiatrIm Im S S Korsakova.* 2011;111(11 Pt 2):55-57.
78. Tirapelli CR. Tese de Doutorado: Conseqüências celulares e funcionais do consumo crônico do etanol sobre o sistema endotelina vascular. Ribeirão Preto: Departamento de Farmocologia FMRP-USP; 2005.

79. Crist GJ, Lerner SE, Kim DC, Melman A. Endothelin-1 as a putative modulator of erectile dysfunction: I Characteristics of contraction of isolated corporal tissue strips. *The journal of urology*.1995; 153:1998-2003.
80. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetics rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *The journal of urology*.1997;158:1966-1972.
81. Bortolotti A, Parazzini F, Colli E, Landoni M. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. *Int J Androl*. 1997;20(6):323-334.
82. Miller NS, Gold MS. The human sexual response and alcohol and drugs. *J Subst Abuse Treat*. 1988;5(3):171-177.
83. Oliva SU, Messias AG, Silva DA, et al. Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. *Reprod Toxicol*. 2006; 22:599-605.
84. Chan TC, Wall RA, Sutter MC. Chronic ethanol consumption, stress, and hypertension. *Hypertension*. 1985;7(4):519-524.
85. Saito M, Broderick GA, Wein AJ, et al.: Effect of chronic ethanol consumption on the pharmacological response of the rabbit corpus cavernosum. *Pharmacology*. 1994;49:386-391.
86. Lizarte FS, Morgueti M, Tirapelli CR, Claudino MA, Evora PR, Novais PC, Tirapelli DP, Celotto AC, Capellini VK, Celini FP, Tucci S Jr, Cologna AJ, Antunes E, Martins AC, Tirapelli LF. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. *BJU Int*. 2010;105(11):1592-1597.
87. Lizarte FS, Morgueti M, Tirapelli CR, Claudino MA, et al. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. *Urology*. 2009; 74(6):1250-1256.
88. Aydinoglu F, Yilmaz SN, Coskun B, et al. Effects of ethanol treatment on the neurogenic and endothelium-dependent relaxation of corpus cavernosum smooth muscle in the mouse. *Pharmacol Rep*. 2008;60(5):725-734.

89. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):581-588.
90. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005;11(3):241-247.
91. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
92. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146-50.
93. Nass D, Rosenwald S, Meiri E, Gilad S, Tabibian-Keissar H, Schlosberg A, Kuker H, Sion-Vardy N, Tobar A, Kharenko O, Sitbon E, Lithwick Yanai G, Elyakim E, Cholakh H, Gibori H, Spector Y, Bentwich Z, Barshack I, Rosenfeld NMiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. *Pathol*. 2009;19(3):375-383.
94. Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101(1):59-68.
95. Signorelli SS, Li Volsi G, Pitruzzella A, Fiore V, Mangiafico M, Vanella L, Parenti R, Rizzo M, Li Volti G. Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in Patients With Peripheral Artery Disease and Their Potential Relationship With Oxidative Stress: A Pilot Study. *Angiology*. 2016;pii: 0003319716638242.
96. Benson GS, Doileau MA. The penis: sexual function and dysfunction. In: Gillenwater JY, Groyhack JT, Howards SS, Duckett JW eds *Adult and Pediatric Urology*. 1991;2:1599-1642.
97. Saito M, Broderick GA, HypoliteJA, Levin RM. Pharmacological effect of ethanol on the function of rabbit corporal cavernosal tissue. *Pharmacology*, 1994;48:335-340.
98. Yessilli C, Mungan G, Seckiner I, Akuduman B, Numanoglu G, Mungan A. Effects of ethanol on intracorporeal structures of the rat. *International Urology and Nephrology*. 2006;38:129-132.

99. Sathyan P, Golden HB, Miranda RC. Competing interactions between microRNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *J Neurosci.* 2007;27(32):8546-8557.
100. Staszczak T, Zapala B, Polus A, Sadakierska-Chudy A, Kieć-Wilk B, Stępień E, Wybrańska I, Chojnacka M, Dembińska-Kieć A. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol Arch Med Wewn.* 2011;121(10):361-366.
101. Miranda RC, Pietrzykowski AZ, Tang Y, Sathyan P, Mayfield D, Keshavarzian A. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34(4):575-587.
102. Wei AY1, Yang Y, He SH, Luo XG, Zhang T, Liu Y. Role of miR-145 in erectile dysfunction in diabetic rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011 Jun;31(6):1051-4.