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

VAGNER SCHIAVONI SARRAIPO

**Expressão de AIF, PARP e dos microRNAs miR-145, -210 e -486
associados à apoptose nos corpos cavernosos de ratos
submetidos ou não a modelo de alcoolismo crônico**

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

VAGNER SCHIAVONI SARRAÍPO

Expressão de AIF, PARP e dos microRNAs MIR-145, MIR-210 e MIR-486 Associados a Apoptose nos Corpos Cavernosos de Ratos Submetidos ou não à Modelo de Alcoolismo Crônico

Tese de Doutorado 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: Cirurgia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

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

Sarraipo, Vagner Schiavoni

Expressão de AIF, PARP e dos Micrornas MIR-145, MIR-210 e MIR-486 Associados a Apoptose nos Corpos Cavernosos de Ratos Submetidos ou não à Modelo de Alcoolismo Crônico.

59 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Tirapelli., Luís Fernando.

1. Alcoolismo. 2. Apoptose 3. Corpos cavernosos. 4.microRNA. 5. Disfunção erétil.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vagner Schiavoni Sarraipo

Expressão de AIF, PARP e dos microRNAs MIR-145, MIR-210 e MIR-486 Associados a Apoptose nos Corpos Cavernosos de Ratos Submetidos ou não à 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 do título de Doutor em Ciências Médicas.

Programa: Clínica Cirúrgica- opção: Cirurgia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

*Ao **Breno**, que foi sempre o meu incentivador em todas as etapas para conclusão dessa tese.*

*À **minha família**, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Essa conquista não seria possível sem vocês*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Luís Fernando Tirapelli** e a **Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli** por todas as oportunidades e ensinamentos – os científicos e os não científicos, por toda ajuda e amizade ao longo desses anos de convívio.*

*Aos **amigos, colegas e ex-colegas** do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela amizade desses anos todos em especial a minha amiga **Andressa Romualdo Rodrigues** por compartilharmos pensamentos, ideias, sentimentos, opiniões e pela ajuda ao longo desses anos. Só tenho a agradecer por essa amizade verdadeira que me faz tão bem.*

*À aluna mestranda **Fabiana de Oliveira Buono** e a pós-doutoranda **Ana Leda Bertoncini Simões** pela colaboração na realização dos experimentos desse trabalho.*

*Ao **Departamento de Cirurgia e Anatomia**, à toda equipe de secretaria, em especial a **Juliana Pischiotin Moraes** pela paciência e dedicação com nós alunos da pós – graduação.*

*À minha Mãe, **Dulcineia Schiavoni**, minha maior fonte de determinação que conheço, agradeço pela sua confiança em mim. Sua simplicidade e sua pureza, me ensinam sempre! Só tenho a agradecer por ter você em minha vida, sou privilegiado.*

*Ao meu Pai, **José Ailton Sarraipo**, por ter me passado sempre às melhores qualidades que um ser humano pode construir em sua vida.*

*À minha irmã **Vanessa Schiavoni** por ser uma das minhas inspirações, sempre se mostrou uma pessoa forte e batalhadora em busca de seus objetivos.*

*Em especial minha avó **Helena Schiavoni** pessoa mais linda e de um amor puro e verdadeiro.*

*Ao **Breno Resende**, hoje uma pessoa mais que especial em minha vida pessoa que me fez e faz enxergar sempre novos horizontes que o universo tem para nos dar nos meus momentos mais triste.*

*Á dona **Argentina Resende** pelo seu carinho, preocupação e dedicação sempre comigo e claro por todos os seus cafezinhos.*

*E aos **meus amigos** que não fazem parte dessa área acadêmica mas que estão sempre na torcida pelo meu sucesso, vocês estão sempre comigo em meus pensamentos e no coração.*
Gratidão.

“ Não há maior ego do que o daquele que se julga acima dos outros por ter domado o ego. Ao dominar o ego, ao buscar a transcendência e negar o mundo, ele comete o maior ego de todos: Achar que não tem ego, e que está além do mundo em que vive. ”

Osho

RESUMO

SARRAIPO, V.S. **Expressão de AIF, PARP e dos MicroRNAs MIR-145, MIR-210 e MIR-486 Associados a Apoptose nos Corpos Cavernosos de Ratos Submetidos ou não à Modelo de Alcoolismo Crônico.** 2018. 59 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2018

Introdução: A ereção peniana é um processo neurovascular complexo iniciado através de estimulação sexual, que podem ser fatores físicos ou psicológicos com atuação de substâncias no endotélio vascular resultando no ato sexual satisfatório. Diversos fatores podem interferir de forma negativa no mecanismo fisiológico da ereção peniana, conseqüentemente, levando a disfunção erétil, tais fatores como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo e alcoolismo. O etanol é uma das substâncias mais consumidas nas diferentes sociedades, tornando-se, assim, alvo de inúmeros estudos que visam conhecer sobre sua toxicidade. Apesar da grande associação entre o consumo de álcool e o aumento da incidência da disfunção erétil, os mecanismos moleculares envolvidos ainda são poucos conhecidos. Devido a abundância, os microRNAs tem sido descrito envolvidos em diversas funções fisiológicas dos processos celulares, e além disso estão envolvidos em muitos processos fisiopatológicos, como, por exemplo, a disfunção erétil. Dentre os processos celulares, os microRNAs exercem funções anti ou pró apoptóticas. Embora a conexão dos microRNAs a apoptose esteja bem estabelecida, sua função em resposta a apoptose induzida pelo etanol permanece em grande parte desconhecida. **Objetivos:** Avaliar o mecanismo de apoptose, pela expressão de AIF e PARP, assim como dos seus microRNAs reguladores: miR-145, miR-210 e miR-486, nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de “alcoolismo semivoluntário”. **Material e métodos:** Foram utilizados 12 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 AIF e PARP por imunohistoquímica e para o estudo da expressão gênica no tecido cavernoso do miR- 145, miR-210 e do miR-486, por PCR em tempo real. **Resultados:** A análise imuhistoquímica mostrou pouca marcação positiva nuclear para a proteína PARP e AIF nos corpos cavernosos dos animais dos grupos controle e tratado com etanol. Após análise da expressão dos microRNAs miR-145, -210 e -486, nos 12 animais estudados, não foram encontrados resultados com diferença estatística significativa entre os grupos controle e alcoolizado. **Conclusões:** A expressão gênica do miRNA -145 e miRNA-486 foi maior nos animais do grupo tratado com etanol quando comparado aos animais do grupo controle; A expressão gênica do miRNA -210 foi maior nos animais do grupo controle quando comparado aos animais do grupo tratado com etanol; Foi observada correlação entre a expressão protéica de PARP e AIF e do miRNA -210, ambos com maior marcação positiva no grupo controle.

Palavras-chave: alcoolismo; apoptose; corpo cavernoso; miRNA

ABSTRACT

SARRAIPO, V.S. Expression of AIF, **PARP** and the microRNAs **miR-145**, **miR-210** e **miR-486** Associated to Apoptosis in the Cavernous bodies oh rats submitted or not to chronic alcoholism model. 2018. 59 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2018

Introduction: Penile erection is a complex neurovascular process initiated through sexual stimulation, which can be physical or psychological factors with action of substances in the vascular endothelium resulting in the satisfactory sexual act. Several factors can negatively interfere in the physiological mechanism of penile erection, consequently leading to erectile dysfunction, such factors as systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking and alcoholism. Ethanol is one of the most consumed substances in different societies, becoming, therefore, the target of numerous studies that aim to know about its toxicity. Despite the large association between alcohol consumption and the increased incidence of erectile dysfunction, the molecular mechanisms involved are still poorly understood. Due to abundance, microRNAs have been described involved in various physiological functions of cellular processes, and in addition are involved in many pathophysiological processes, such as erectile dysfunction. Among the cellular processes microRNAs have anti-apoptotic or pro functions. Although the connection of the microRNAs to apoptosis is well established, their function in response to ethanol-induced apoptosis remains largely unknown. **Objectives:** To evaluate the mechanism of apoptosis, by the expression of AIF and PARP, as well as of its regulatory microRNAs: miR-145, miR-210 and miR-486, in the cavernous bodies of rats submitted to a model of "semi-voluntary alcoholism". **Material and methods:** 12 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 immunohistochemical analysis showed little positive nuclear marking for the PARP and AIF protein in the corpus cavernosum of the control and ethanol treated groups. After analysis of miR-145, -210 and -486 microRNA expression in the 12 animals studied, no statistically significant differences were found between the control and alcoholized groups. **Conclusions:** The gene expression of miRNA-145 and miRNA-486 was higher in the animals of the ethanol treated group when compared to the animals in the control group; Gene expression of miRNA - 210 was higher in the control group than in the animals treated with ethanol; A correlation was observed between the protein expression of PARP and AIF and of the -210 miRNA, both with greater positive marking in the control group.

Keywords: alcoholism; apoptosis; corpus cavernosum; miRNA.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia de corte transversal do pênis de rato controle utilizado para a avaliação imunohistoquímica para a proteína PARP, mostrando os seus três tecidos eréteis: os corpos cavernosos (CC) contendo os espaços cavernosos (setas) e o corpo esponjoso (CE) atravessado pela uretra (U). Túnica albugínea (TA); veia dorsal profunda do pênis (*). 50x.....	16
Figura 2	Biogênese do microRNA e os possíveis mecanismos de regulação gênica. Fonte: Retirada de (Gandellini et al., 2017).	22
Figura 3	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).....	33
Figura 4	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).....	35
Figura 5	Fotomicrografias dos corpos cavernosos de ratos mostrando a marcação imonohistoquímica para PARP-1 (em A: grupo controle e B: grupo etanol) e AIF (em C: grupo controle e D: grupo etanol). As setas indicam algumas células com marcação positiva nuclear. Espaços cavernosos (EC); tecido conjuntivo (TC). 400x.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p=0,6279$, pós teste de Dunns).	38
Gráfico 2	Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF nos animais do grupo controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p=0,6831$, pós teste de Dunns).....	39
Gráfico 3	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,9372$, t-test, pós teste Mann-Whitney).....	41
Gráfico 4	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-210 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,3939$, t-test, pós teste Mann-Whitney).....	41
Gráfico 5	Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-486 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,9372$, t-test, pós teste Mann-Whitney).....	42

LISTA DE SIGLAS

AUA	American Urological Association
C	Graus Celsius
Ca ²⁺	Cálcio
CC	Corpo cavernoso
cDNA	Ácido desoxidorribonucleico complementar
CE	Corpo esponjoso
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
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	iNOS Enzima óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
L	Litro
Lin4	do inglês <i>lineage-deficient-4</i>
mg	Miligrama
miR	MicroRNA
ml	Mililitro
n	Tamanho da amostra
NA	Noradrenalina
NANC	Não adrenérgico e não colinérgico
ncRNAs	Ácido ribonucléico não codificante
ng	Nanograma

nNOS	nNOS Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	NO Óxido nítrico
NOS	NOS Óxido nítrico sintase
O ₂	O ₂ Molécula de oxigênio
qT-PCR	qT-PCR Técnica de PCR em tempo real
RNA	RNA Ácido ribonucleico
Rpm	rpm Rotações por minuto
RT	RT Tempo real
TE	TE Tecido cavernoso erétil
Ug	ug Micrograma
uL	uL Microlitro
USP	USP Universidade de São Paulo

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	1.1 Anatomia do pênis e disfunção erétil.....	15
1.2	1.2 O alcoolismo e sua associação com a disfunção erétil.....	18
1.3	1.3 Os microRNAs.....	21
1.4	1.4 A apoptose e os microRNAs.....	23
2.	OBJETIVOS.....	27
2.1	2.1 Objetivo geral.....	28
2.2	2.2 Objetivos específicos.....	28
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Animais	30
3.2	Grupos experimentais	30
3.3	Análise imuno-histoquímica	31
3.4	Análise da expressão gênica do MiRNA-210 MiRNA-145 MiRNA-486	32
3.4.1	Extração de RNA	32
3.4.2	Síntese de DNA complementar (cDNA) do miRNA- 210 miRNA - 145 miRNA – 486.....	33
3.4.3	PCR em tempo real	34
3.5	Análise estatística.....	36
4.	RESULTADOS.....	37
4.1	Análise imunohistoquímica.....	38
4.1.1	Análise imunohistoquímica de PARP.....	38
4.1.2	Análise imunohistoquímica de AIF.....	39
4.2	PCR em tempo real.....	40
5.	DISCUSSÃO.....	43
6.	CONCLUSÃO.....	48
	REFERENCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia do pênis e disfunção erétil

O pênis é formado por dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso por onde atravessa parte da uretra masculina. Ele possui duas porções: a raiz, fixa, e corpo, livre. A raiz consiste em dois ramos, que são as partes proximais dos corpos cavernosos inseridas ao arco púbico, e o bulbo do pênis, que é a parte proximal do corpo esponjoso ancorado na membrana do períneo. O corpo do pênis é formado pelas duas partes livres dos corpos cavernosos (Figura 1) e pela parte livre do corpo esponjoso e inteiramente coberto por pele. Na posição anatômica do pênis no estado ereto, os corpos cavernosos pareados são definidos como a parte dorsal do corpo do pênis, e o corpo esponjoso (Figura 1) único, como a parte ventral, embora as posições sejam invertidas no estado não ereto (flácido) do órgão. Os corpos cavernosos são estruturas eréteis formadas por um núcleo central de tecido vascular expansível e em sua cápsula envoltória de tecido conjuntivo (DRAKE, 2015).

A ereção do pênis é um evento vascular gerado pelas fibras parassimpáticas conduzidas nos nervos esplâncnicos pélvicos dos ramos anteriores de S2 a S4. Quando ocorre a estimulação desses nervos ocorre o relaxamento de artérias específicas dos tecidos eréteis. Esse evento permite que o sangue encha esses tecidos, fazendo com que o pênis torne-se ereto (DRAKE, 2015; GUYTON, HALL, 2006). As artérias que suprem o pênis são ramos da artéria pudenda interna; os ramos do nervo pudendo (S2 a S4) conduzem os nervos sensoriais a este órgão (DRAKE, 2015).

A ereção peniana é o primeiro sinal de excitação sexual. Com o estímulo nervoso parassimpático, são liberadas substâncias tais como óxido nítrico e a acetilcolina. O óxido nítrico é responsável pelo relaxamento das artérias do pênis, e do próprio tecido erétil dos corpos cavernosos e do corpo esponjoso. O tecido erétil é formado por grandes sinusóides ou espaços cavernosos (Figura 1) que se dilatam para acomodar um grande volume sanguíneo já que normalmente não contém sangue. Além disso, possuem a capacidade de ocluir parcialmente a drenagem venosa para que o fluxo de sangue provoque a ereção. Outro fator a ser destacado, é o fato de que os tecidos eréteis, principalmente os corpos cavernosos, são envolvidos pela túnica albugínea (Figura 1), uma membrana fibrosa espessa que promove o aumento da pressão no local e potencializando o enchimento do tecido erétil

(GUYTON; HALL, 2006).

Figura 1 - Fotomicrografia de corte transversal do pênis de rato controle utilizado para a avaliação imunohistoquímica para a proteína PARP, mostrando os seus três tecidos eréteis: os corpos cavernosos (CC) contendo os espaços cavernosos (setas) e o corpo esponjoso (CE) atravessado pela uretra (U). Túnica albugínea (TA); veia dorsal profunda do pênis (*). 50x.

Sendo principalmente um fenômeno neurovascular, a ereção peniana requer, portanto, dilatação da vasculatura peniana, relaxamento da musculatura lisa, aumento do fluxo sanguíneo intracavernoso e função veno-oclusiva normal. Vários mecanismos fisiopatológicos, incluindo diminuição do influxo arterial, relaxamento cavernoso de músculos lisos prejudicados, aumento da contração da musculatura lisa cavernosa induzida por isquemia crônica, fibrose cavernosa, disfunção veno-oclusiva e crônica ou hipoxemia episódica podem promover disfunção erétil (MCMAHON, 2012).

Disfunção erétil (DE) é a “incapacidade de alcançar ou manter a ereção

peniana adequada para a satisfação sexual” segundo o National Institute of Health e a *American Urological Association*. A DE promove diminuição da qualidade de vida e traz dificuldades nas relações sociais e afetivas (JOHANNES et al., 2000). Basicamente, a principal ferramenta de diagnóstico para a DE é a história médica e sexual. Raramente são necessários testes complementares (GLINA et al., 2014).

As disfunções sexuais masculinas são comuns. Alguns estudos que foram realizados de forma multicêntrica descrevem que entre 9% a 29% dos homens podem apresentar algum tipo de alteração em sua função sexual (LAUMANN et al., 2005). Entre as disfunções sexuais, a disfunção erétil é uma das mais prevalentes. A prevalência da disfunção erétil nos Estados Unidos e na Europa está descrita em 25 a 30 casos por 1.000 homens/ano. No Brasil, as estatísticas descrevem aproximadamente 65 casos por 1.000 homens/ano. Os estudos demonstram que o envelhecimento da população corrobora para o aumento na incidência das disfunções já que os indivíduos acima de 65 anos eram 13% da população mundial em 2000, e as projeções indicam que, em 2020, serão 20% (SIVALINGAM et al., 2006). É estimado ainda que no ano de 2025, cerca de 322 milhões de homens terão DE (WESPES et al., 2002).

A doença vascular das artérias penianas é reconhecida como a causa mais comum de DE, sendo responsável por até 80% dos casos. O sistema óxido nítrico-guanosina-3'5'-monofosfato cíclico é importante na produção da dilatação arterial e oclusão venosa necessária para atingir e manter uma ereção. Anormalidades desse sistema vasodilatador devido à disfunção endotelial desempenham um papel importante na fisiopatologia da DE. Sendo assim, as drogas para o tratamento da DE que produzem vasodilatação e melhoram a função das células endoteliais, são muito eficazes no tratamento de disfunção erétil (JENSEN et al., 1999; GOLDSTEIN et al., 1998).

A função sexual é uma associação de situações psicológicas, endócrinas, vasculares e neurológicas. Sendo assim, qualquer um destes fatores pode contribuir para a ocorrência da disfunção. Portanto, a DE é classificada como psicogênica, orgânica (quando envolve fatores neurogênicos, hormonais, arteriais, cavernosas ou indução por drogas) ou orgânica mista. Entre as drogas que podem induzir a DE orgânica ou orgânica mista, estão alguns anti-hipertensivos, antidepressivos, tranquilizantes além do fumo e do álcool (SHAMLOUL; GHANEM, 2012).

1.2 O alcoolismo e sua associação com a disfunção erétil

O consumo excessivo de álcool é estudado desde os anos 1950 e, as consequências do uso abusivo desta substância estão relacionadas aos diversos órgãos (COURVILLE, 1955; VICTOR et al., 1959) sendo que alterações cerebrais e cardiovasculares estão entre as mais estudadas.

Na maioria dos países ocidentais, o álcool é consumido em reuniões sociais, casamentos e cerimônias religiosas e é apreciado com moderação pela grande maioria da população. No entanto, o consumo de álcool também causa uma ampla gama de problemas. O abuso de álcool pode levar à dependência física de danos associados a órgãos alvos, particularmente o encéfalo e o fígado. Os efeitos do álcool no corpo são complexos. Esses efeitos abrangem tanto o organismo em sua forma estrutural, celular e molecular, quanto em outros níveis que estão além do indivíduo: família, sociedade, cultura e comportamento (REILLY et al., 2014).

A desinibição, euforia e a sedação são alguns dos sintomas que ocorrem quando do consumo de baixas doses de álcool. Porém, quando consumido em altas doses e com grande frequência, o consumo de álcool pode promover perda de coordenação, coma e até a morte (HARPER, 2009).

Após a ingestão, o álcool é encontrado em órgãos com maior concentração de água e difunde-se nos tecidos devido sua propriedade hidrofílica (KALANT, 1983). Portanto, o encéfalo é um dos órgãos bastante atingidos pelo consumo abusivo de álcool e entre as consequências estão, além das alterações biológicas, deficiências cognitivas e emocionais. De acordo com estudos de psicologia, neuropsicologia, neuropatologia e neuroimagem, o lobo frontal, o sistema límbico e o cerebelo são particularmente vulneráveis aos danos e disfunções relacionadas ao uso excessivo do álcool (OSCAR-BERMAN, 2007).

Além do encéfalo, a incidência de doenças cardiovasculares também está relacionada ao consumo excessivo de bebidas alcóolicas (O'KEEFE et al., 2014). O elevado consumo de álcool e o alcoolismo crônico são fatores de risco independentes para o acidente vascular encefálico, por exemplo (KLATSKY et al., 2001). Por outro lado, existe um efeito cardiovascular protetor relacionado ao consumo moderado de álcool (ISO et al., 2004).

Portanto, o efeito de etanol sobre o sistema cardiovascular é dose-

dependente: o consumo regular e moderado tem efeitos benéficos, enquanto o consumo excessivo está associado a efeitos prejudiciais sobre o sistema cardiovascular, tais como hiperlipidemia, vasoconstrição e hipertensão arterial (COSTANZO *et al.*, 2010; DI CASTELNUOVO *et al.*, 2006; MOVVA; FIGUEREDO, 2013).

Os fatores de risco citados acima são comuns tanto às doenças cardiovasculares quanto à disfunção erétil. O consumo crônico e excessivo de álcool possui um efeito citotóxico que prejudica a saúde em sua totalidade. Portanto, acredita-se na relação entre DE e consumo de álcool (CHENG *et al.*, 2007).

Além das características sociodemográficas, como nível de escolaridade e desemprego, a disfunção sexual em homens dependentes de álcool está relacionada ao período de início do consumo de álcool em idade precoce e ao tabagismo a longo prazo. Acredita-se que os profissionais de saúde possam determinar o status da função sexual de homens dependentes de álcool usando uma ferramenta simples e confiável como o Índice internacional de Disfunção Erétil (DISSIZ; OSKAY, 2011).

Estudos anteriores do nosso grupo descrevem as consequências do uso do etanol na disfunção erétil. O mais recente demonstrou que o consumo crônico de etanol associado ao diabetes desempenhou um papel na patogênese da DE através de alterações nos receptores ET_a e ET_b da endotelina-1 que é um potente peptídeo vasoconstritor (GONÇALVES *et al.*, 2018). Já Lizarde *et al.* (2010), analisou o comprometimento do relaxamento do endotélio promovido pelo óxido nítrico e da sensibilidade contrátil no músculo liso cavernoso em ratos também diabéticos e submetidos à ingestão de etanol.

Em estudo anterior, Lizarde *et al.* (2009), observaram que ratos submetidos a um modelo de alcoolismo crônico semivoluntário apresentaram menor taxa sérica de testosterona, com aumento na contração dos corpos cavernosos a partir de estímulo noradrenérgico e diminuição no relaxamento endotelial induzido por acetilcolina, apesar da taxa de nitrato, uma forma de estimar o NO, encontrar-se inalterada entre o grupo alcoolizado e o grupo controle.

Estudo recente demonstrou uma forte associação entre a disfunção erétil e vários fatores tais como: dependência de álcool, idade e testosterona. O estudo também mostrou que os níveis dos hormônios sexuais na população com dependência de álcool eram substancialmente menores quando comparado aos indivíduos que não faziam uso abusivo desta substância (CHAO *et al.*, 2015).

O uso abusivo e crônico de álcool é propício para a lesão tecidual. Vários mecanismos fisiopatológicos foram identificados como fatores causais na lesão de tecidos e órgãos resultantes do abuso de álcool tais como: estresse oxidativo, inflamação, geração de acetaldeído, diminuição da função de barreira, prejuízo na sinalização anabólica, aumento dos processos catabólicos, ativação de fibroblastos, lesão mitocondrial e perturbação da membrana celular (MOLINA et al., 2003). Estes mecanismos podem ser o resultado da ação direta do álcool ou do seu metabolismo (CEDERBAUM, 2012).

O uso abusivo de álcool interfere no estado nutricional do indivíduo prejudicando o equilíbrio entre os mecanismos anabólico e catabólico. Está associado a uma incidência de 50% de miopatia de músculo esquelético que é resultado da diminuição da síntese protéica muscular e da acelerada proteólise muscular causando uma menor disponibilidade de micronutrientes e conseqüentemente modulação dos fatores circulantes e de crescimento tecidual. O álcool crônico resulta em diminuição dos níveis circulantes e teciduais de andrógenos e IGF-I, aumento da regulação da miostatina, e regulador negativo do crescimento do músculo esquelético, por exemplo. (MOLINA et al., 2014).

O uso abusivo de etanol causa disfunção sexual. Altos níveis de álcool provocam diminuição na tumescência peniana e redução da performance sexual (RUBIN; HENSON, 1976). Esta disfunção ocorre pela ação do álcool no sistema nervoso central, diminuição nos níveis de testosterona e pelo aumento nos níveis de estrógeno (MILLER; GOLD, 1988).

O estresse oxidativo é um fator importante que leva ao dano e disfunção celular, bem como à ativação de fibroblastos produzindo fibrose. A combinação de disfunção celular e fibrose leva à redução da contratilidade. Outro fator importante é a presença de inflamação. Ambos são consequência do uso abusivo de etanol (GARDNER; MOUTON, 2015).

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 indução de alcoolismo em ratos, foi estudado por LIZARTE et al. (2010). Um estudo que realizou análise por microscopia eletrônica de transmissão descreveu endentações profundas na membrana nuclear das células endoteliais, assim como diminuição das vesículas de pinocitose e vacuolização no citoplasma de algumas células endoteliais no corpo cavernoso de coelhos. Estes

achados, podem afetar o tecido erétil e agir promovendo diversas alterações hormonais, indução de alterações morfológicas e funcionais, tais como fibrose, hiperplasia da musculatura lisa e depósito de tecido adiposo trabecular (MOON et al., 2004); além disso, pode promover indução de apoptose nos testículos (TRAISH et al., 1999).

A castração em ratos atenua a função erétil e induz a fibrose promovendo a apoptose das células do músculo liso cavernoso. É importante papel dos andrógenos na manutenção da integridade da estrutura e função do corpo cavernoso através da regulação da apoptose (WANG et al, 2015).

MicroRNAs (miRs) são pequenos RNAs não-codificadores de proteínas (ncRNAs), constituídos por, cerca de, 19 a 25 nucleotídeos, com importante ação reguladora pós-transcricional da expressão gênica, a partir da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm) (COWLAND, HOTHER, GRONBAEK, 2007).

1.3 Os microRNAs

Os microRNAs foram descritos pela primeira vez em 1993, sendo, nesta época, associados à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (LEE, FEINBAUM e AMBROS, 1993). Atualmente, sabe-se que essas pequenas moléculas estão associadas a diversos processos celulares, como diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo celular. Assim, a expressão de um miRNA, de maneira desregulada, pode conduzir a uma série de desordens em um organismo (KULSHRESHTLA et al., 2007).

Apesar de pequenos e, estudados há pouco mais de vinte anos, a literatura atual nos mostra que cerca de 60% dos genes humanos sejam controlados por microRNAs, além disso, são vários os estudos que demonstram que um único microRNA pode regular centenas de diferentes genes alvos, o que determina grande impacto nos inúmeros processos tanto fisiológicos, quanto patológicos (KULSHRESHTLA et al., 2007; REIS et al., 2010; BURGOS-ACEVES et al. 2018).

A biogênese dos microRNAs inicia-se no núcleo celular, a partir da transcrição do gene deste, em seguida, há exportação para o citoplasma e, por fim, processamento e maturação também no citoplasma (SINGH et al., 2008; SUN; TSAO, 2008; TAN et al., 2009). No núcleo, a transcrição do gene inicia-se com RNA

polimerase II, gerando um microRNA primário (pri-miRNA), o qual exibe uma estrutura secundária complexa, denominada *hairpin* (semelhante a grampos de cabelo) (SUN, TSAO, 2008). No núcleo, o pri-microRNA é processado pelo complexo nuclear formado pela Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region in gene 8*), originando o microRNA precursor (pré-miRNA), com aproximadamente 70 nucleotídeos que é, então, exportado para o citoplasma pela Exportina-5 (SINGH et al., 2008).

No citoplasma, os pré-microRNAs são processados pela enzima Dicer, e perdem a estrutura *hairpin*, gerando um microRNA, ainda de fita dupla, com cerca de 22 nucleotídeos (ZHANG et al., 2007; SCHMITTGEN, 2008). Este é acoplado ao complexo RISC, e as duas fitas são separadas. Uma dessas fitas permanece associada ao RISC, formando o microRNA maduro, enquanto que a fita complementar é degradada (TAYLOR et al., 1996; SU; TSAO, 2008; REDELL et al., 2009). O microRNA maduro é, então, conduzido às sequências complementares de um RNAm alvo, e a interação entre eles ocorre através do pareamento das bases, resultando na degradação ou na inibição desse RNAm (SINGH et al., 2008; TAN et al., 2009; AMARAL et al., 2010.) (Figura 2).

Figura 2 - Biogênese do microRNA e os possíveis mecanismos de regulação gênica.
Fonte: Retirada de (Gandellini et al., 2017).

1.4 A apoptose e os micorRNAs

Como descrito, um dos inúmeros processos celulares associados aos microRNAs é o processo de morte celular programada, ou apoptose. Esse termo foi utilizado pela primeira vez em estudo de Kerr e colaboradores (1972), no qual os autores descreveram uma forma de morte celular, associada à fisiologia normal e, com algumas modificações morfológicas, como, por exemplo, a retração celular, perda de aderência com a matriz extracelular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE E CURRIE, 1972; GRIVICICH, REGNER, DA ROCHA, 2007).

O processo de apoptose é regulado por genes e envolve a ação coordenada e eficiente de vários grupos de proteínas. A maioria das alterações morfológicas citadas ocorre a partir de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos, causadas por proteases pertencentes a uma grande família de proteínas com atividade enzimática, conhecida como caspases (WALTEREIT e WELLER, 2002). Essas proteases têm a capacidade e função de reconhecer e clivar determinados substratos e, então, sinalizam e iniciam o processo de apoptose. Atualmente, conhecem-se 14 caspases humanas, seis destas participam do processo de morte celular programada – e são divididas em caspases iniciadoras e efetoras-, as demais estão envolvidas no processo de maturação de citoquinas (GRIVICICH, REGNER, DA ROCHA, 2007).

Além das caspases, o processo de apoptose pode ser conduzido por vias independentes de caspases através, por exemplo, da ação de uma flavoproteína, denominada Fator Indutor de Apoptose (AIF). Essa proteína migra da mitocôndria para o núcleo celular após estímulo de morte, fazendo com que haja condensação da cromatina e fragmentação do DNA, de maneira independente de caspases (BRÖKER, KRUYT, GIACCONE, 2005). Da mesma forma, a AIF também pode participar da regulação da permeabilização da membrana mitocondrial apoptótica e exibir uma atividade da NADH oxidase (CANDÉ et al., 2002).

Outra família de enzimas também muito estudadas e correlacionadas ao processo de morte celular é família de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). Essa enzima tem ação de reparo no DNA celular danificado, isto é, um componente chave do *checkpoint* do ciclo celular, em G2, que impede que uma célula danificada, com

quebras em uma das fitas de DNA, seja capaz de entrar na mitose. Inclusive, a inibição de PARP resulta em instabilidade genômica e na parada do ciclo celular (MORALES et al., 2014).

O processo de morte celular programada está envolvido em processos fisiológicos, como no desenvolvimento, diferenciação, no controle da proliferação celular, e na remoção de células com danos genéticos e nocivos. No entanto, induzidas por algum processo patológico, algumas células podem ser levadas à apoptose, ou evadem da morte celular, como, por exemplo no desenvolvimento do câncer, doenças cardiovasculares, entre outras, em que há desordem entre a taxa de proliferação, e a ordem de morte celular (NICOLOSO, CALIN, 2008).

Assim, alguns microRNAs interferem no processo de apoptose através da supressão deste, e são denominados anti-apoptóticos, ou, contribuem para o processo de morte celular e são chamados de pró-apoptóticos (MENS, GHANBARI, 2018).

A ereção peniana é um processo neurovascular complexo, e diversos eventos moleculares estão envolvidos nesse processo. Estudos recentes, mostram que microRNAs podem regular grande parte dos passos relacionados à disfunção erétil (LIU, WANG, 2017).

Pesquisas recentes revelaram que a expressão de microRNAs está relacionada à expressão de óxido nítrico, por exemplo. O microRNA 27b e eNOS mostraram níveis de expressão opostos nos corpos cavernosos de ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes mellitus. Além disso, a redução dos microRNAs miR-221 e -222 no endotélio humano, fizeram com que aumentassem os níveis de mRNA da eNOS circulante, ou seja, a ligação de miRNAs com RNAm de NOS faz com que haja inibição de óxido nítrico, essencial ao mecanismo de ereção (CUNHA et al., 2017; CERDA et al., 2015).

Alguns microRNAs também apresentam-se como importantes reguladores das funções de células endoteliais, primeiramente, por regularem a apoptose nessas células. Em pacientes com disfunção erétil há aumento de apoptose nas células endoteliais do pênis. Na literatura, são citados microRNAs miR-1 e -203 como reguladores importantes da apoptose nas células endoteliais, através da inibição de AKT3 e PIK3CA, dois importantes fatores de transcrição. Além da apoptose, os microRNAs também podem regular a proliferação e migração de células endoteliais, função do músculo liso e ereção dependente de andrógenos (LIU, WANG, 2017). O

microRNA-150, por exemplo, desempenha função importante como sinalizador de moléculas mediadoras de comunicação intercelular (ZHANG et al., 2010). Os microRNAs miR-145, -133a, e -206 participam da regulação da proliferação celular no músculo liso do pênis. Além disso, esses microRNAs regulam, diretamente, o relaxamento e a contração no músculo liso (JALALI et al., 2012; GAO et al., 2014).

Pan e colaboradores (2014) usaram um estudo de *array* quantitativo para avaliar a expressão de diversos microRNAs em ratos com disfunção erétil decorrente da idade. Os autores encontraram 428 microRNAs desregulados quando compararam tecido peniano de ratos idosos, com disfunção erétil, e ratos jovens. Além disso, neste trabalho, os autores também relacionaram os microRNAs diferencialmente expressos com a regulação de processos como apoptose, fibrose e disfunção endotelial.

Barbery e colaboradores (2015), encontraram 65 microRNAs hipoexpressos e cinco microRNAs hiperexpressos em ratos com disfunção erétil vasculogênica, e os autores concluíram que os microRNAs estão associados com esse processo patológico (BARBERY et al., 2015).

Embora tenham sido identificados diferentes níveis de expressão de microRNAs em diversos tipos de modelo animal e humano com disfunção erétil (LIU, WANG, 2017), o papel destes no contexto de doença urológica benigna, especificamente na disfunção erétil, permanece limitado (PAN et al., 2014) e maiores estudos são necessários a fim de que sejam reveladas as evidências diretas dos mecanismos regulatórios dos microRNAs no mecanismo de disfunção erétil.

Como descrito, os microRNAs desempenham importantes papéis em diversos processos biológicos, sendo, assim, é esperado que eles participem do processo de lesão decorrente do alcoolismo (MIRANDA et al., 2010). Apesar da maioria dos estudos disponíveis na literatura mostrarem basicamente estudos correlacionando a expressão de microRNAs ao processo de dependência etílica e danos hepáticos (TAPOCIK et al. 2013), neste trabalho avaliamos, a partir de um modelo experimental de alcoolismo crônico, o mecanismo de apoptose celular nos corpos cavernosos, por meio do estudo da expressão protéica e de alguns microRNAs, e que podem estar associados à disfunção erétil.

Alguns estudos que rastrearam a alteração na expressão de microRNAs, a partir do consumo de álcool, encontraram cerca de 2% de alteração na expressão destes, sendo aumento ou diminuição. Até os dias atuais, o mecanismo de alteração dos miRNAs, nesse caso, ainda não foi completamente elucidado. Uma das hipóteses

é a redução nos níveis de metilação do DNA. Além disso, há associação entre a tolerância alcoólica, que é uma alteração importante para os efeitos danosos decorrente do etilismo, e modificações moleculares baseadas em mecanismos dos miRNAs (MIRANDA et al., 2010).

Sabe-se que a ocorrência do mecanismo de apoptose nos corpos cavernosos pode estar associado à denervação, e à doenças crônicas como o diabetes, além disso, a alteração da expressão de alguns microRNAs, como os relacionados a receptores de endotelina, podem estar diretamente ligados ao alcoolismo e à disfunção erétil. Em trabalho de Gonçalves e colaboradores (2018), os autores estudaram a expressão dos microRNAs-155 e -199 e a sua associação com receptores de endotelina (ETa e ETb) em corpos cavernosos de ratos alcoólicos, e observaram que esses receptores foram regulados por esses microRNAs (GONÇALVES et al., 2018).

Outros estudos in vivo são necessários para elucidar o real efeito dos microRNAs, para o desenvolvimento futuro de alvos moleculares terapêuticos capazes de interferir nos mecanismos dos diversos processos patológicos.

2.1 Objetivo Geral

- O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o mecanismo de apoptose, pela expressão de AIF e PARP, assim como dos seus microRNAs reguladores: miR-145, miR-210 e miR-486, nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de “alcoolismo semi-voluntário”.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão proteica de AIF e PARP em corpos cavernosos de ratos, por imuno-histoquímica;
- Avaliar a expressão dos microRNAs: miR-145, miR-210 e miR-486 em corpos cavernosos de ratos, por PCR em tempo real;
- Comparar a avaliação da expressão das proteínas e microRNAs estudados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, disponibilizado pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os animais se mantiveram em gaiolas plásticas (38x23x15cm – três ratos por gaiola), junto com uma tampa metálica tipo grade, forradas com maravalha. A temperatura ambiente permaneceu mantida próximo a 25° C com exaustão do ar ambiente contínuo e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram fornecidos a todos os animais, livre acesso à ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) e água, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP. Durante todo o experimento foram respeitadas as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, visando manter sempre um procedimento ético em todas as etapas da pesquisa. Os procedimentos experimentais do presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, sob o protocolo 112/2007.

3.2 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). Posteriormente, esses animais foram induzidos a eutanásia sem tratamento prévio.

Grupo Alcoolizado (A): constituído por 12 animais, sendo seis animais utilizados para o estudo pela técnica de imunohistoquímica e seis animais para o estudo da expressão gênica no tecido por RT-PCR. Para os animais desse grupo, foi fornecido diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água pelo período de quatro semanas. O fornecimento da solução de etanol a 20% foi o único líquido disponível a estes animais. Entretanto, a adaptação desse grupo experimental ficou condicionada a um breve período de adaptação gradativa ao consumo de etanol, que consistiu no fornecimento de etanol diluído em água com sua concentração alterada

gradativamente em doses crescentes semanais de 5%, 10% e 20%, tendo início à fase experimental, a partir da quarta semana de tratamento (TIRAPELLI et al., 2001). Portanto, três semanas de adaptação e quatro semanas de tratamento ao etanol. Cabe citar que quatro animais foram a óbito durante a fase de tratamento ao consumo de etanol (total de 16 animais nesse grupo).

3.3 Análise imuno-histoquímica

Posteriormente 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 imunohistoquímico. Logo após a fixação, as amostras foram submetidas à desidratação em bateria 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. A análise da expressão protéica foi realizada em seis animais de cada grupo, e em cada lâmina de reação imunohistoquímica, foram selecionados dois campos (um em cada corpo cavernoso) 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 (AIF e PARP). A partir da contagem do número total de células positivas (marcação nuclear) e negativas em cada campo, foi calculada a porcentagem de células positivas.

As lâminas foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em uma série decrescente de concentrações de álcoois e água destilada. Após estas etapas, o bloqueio da peroxidase endógena foi preparado para a incubação das lâminas em H₂O₂ (30%) e 3% em metanol por 10 minutos, e novamente foram lavadas em água destilada por 15 minutos. Para a exposição antigênica, os cortes foram colocados em tampão Citrato de Sódio 0.01M, pH 6,0 em panela a vapor modelo *Optisteam Plus*, modelo 652, (Marca *Krupis* North America, Inc., Closter, NJ, USA) por 40 minutos e a seguir resfriado em Banho Maria com gelo por 15 minutos, para posterior lavagem em Tampão Fosfato Salino (PBS – Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 0,45M pH 7,4). Em seguida, foi realizado o bloqueio com soro *goat* 10% em Tampão PBS, por 40 minutos em

câmara úmida. Após remoção do tampão de bloqueio, os cortes foram incubados “overnight” à temperatura de 4^o C com os anticorpos primários [(*rabbit* anti-AIF ab 32516; e *rabbit* anti-PARP ab 32138 – Abcam)] diluídos em 1:200 e 1:300 em albumina bovina sérica (BSA), respectivamente. Os cortes foram lavados em banhos sequenciais em Tampão Fosfato Salino com detergente não iônico Triton (PBST – Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 0,45M + Triton 2%, pH7,4) + PBS por 20 minutos. Removidos os anticorpos primários, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase anti-*goat* feito em *rabbit* (ab-97050, Abcam®) diluído 1:300 em BSA por uma hora. Com o término desta etapa, os cortes foram lavados e tratados com *Extravidin-Peroxidase* HRP (*Sigma-Aldrich* diluído em PBST pH7,4) por uma hora. A revelação foi realizada com solução de (3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloreto; *Sigma*, St Louis, MO, USA) e peróxido de hidrogênio 0,3% em tampão PBS pH 7,4 por cinco minutos. Por fim, as lâminas foram submetidas à contra coloração com Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcoois e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount®.

3.4 Análise da expressão gênica do miRNA-210, miRNA-145 e miRNA-486

Foi realizada a análise da expressão gênica do miRNA-210, miRNA-145, miRNA-486 a partir da coleta de amostras do tecido cavernoso, que após serem colocadas individualmente em *ependorff*, foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido (-196^oC) até o momento da sua utilização.

3.4.1 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 3), 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 a 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 3 - 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).

3.4.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) do miRNA- 210, miRNA- 145 e miRNA- 486

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do microRNA, 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 (microRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima *MultiScribe™*, 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.

3.4.3 PCR em tempo real

O método de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial dos miRNAs em estudo. 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-210, miRNA-145 e miRNA-486.

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 é subtraído do CT determinado para um miRNA *house-keeping* (neste caso o U6 (000391) para mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste miRNA 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 4).

Figura 4 - 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 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente especfico Taqman Master Mix, 0,5 μ l de cada sonda especfica e 4,5 μ l 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 cáculo 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 estatstica.

As condições padrão de amplificação foram 95C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95C por 15 segundos e 60C 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".

3.5 Análise estatística

Para a avaliação de todos os estudos desta pesquisa (expressão proteica e expressão gênica), a análise estatística foi realizada utilizando o t-test, e pós-teste de Dunns. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism version 5.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4.1 Análise imuno-histoquímica

4.1.1 Análise imuno-histoquímica de PARP

A análise mostrou pouca marcação positiva nuclear para a proteína PARP nos corpos cavernosos dos animais dos grupos controle e tratado com etanol. A marcação positiva para PARP foi semelhante nos dois grupos avaliados sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,6279$, t test), pós teste de Dunns (Gráfico 1). A marcação positiva foi difusa no tecido cavernoso, sendo observada de forma homogênea e semelhante quando comparamos sua distribuição no tecido conjuntivo (entre os espaços cavernosos) e nas células musculares lisas e células endoteliais que revestem os espaços cavernosos (Figura 5).

Gráfico 1 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de PARP-1 nos animais do grupo controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p=0,6279$, pós teste de Dunns).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.1.2 Análise imunohistoquímica de AIF

A análise mostrou pouca marcação positiva nuclear para a proteína AIF nos corpos cavernosos dos animais dos grupos controle e tratado com etanol. A marcação positiva para AIF foi pouco maior nos animais do grupo controle em relação ao grupo alcoolizado, porém; sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,6831$, t test), pós teste de Dunns (Gráfico 2). A marcação positiva foi difusa no tecido cavernoso, sendo observada de forma homogênea e semelhante quando comparamos sua distribuição no tecido conjuntivo (entre os espaços cavernosos) e nas células musculares lisas e células endoteliais que revestem os espaços cavernosos (Figura 5).

Gráfico 2 - Representação gráfica da média e do desvio padrão da expressão proteica de AIF nos animais do grupo controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p=0,6831$, pós teste de Dunns).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Figura 5 - Fotomicrografias dos corpos cavernosos de ratos mostrando a marcação imonohistoquímica para PARP-1 (em A: grupo controle e B: grupo etanol) e AIF (em C: grupo controle e D: grupo etanol). As setas indicam algumas células com marcação positiva nuclear. Espaços cavernosos (EC); tecido conjuntivo (TC). 400x

4.2 PCR em tempo real

Após análise da expressão dos microRNAs miR-145, -210 e -486, nos 12 animais estudados, não foram encontrados resultados com diferença estatística significativa entre os grupos controle e alcoolizado (Gráficos 3 a 5).

Gráfico 3 – Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-145 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,9372$, t-test, pós teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 4 – Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-210 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,3939$, t-test, pós teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 5 – Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-486 entre os animais dos grupos controle e alcoolizado. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,9372$, t-test, pós teste Mann-Whitney).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Neste trabalho, utilizou-se modelo experimental para alcoolismo proposto por Tirapelli et al., 2001, pois além de tratar-se de um mamífero, o rato é o modelo experimental de maior facilidade, além de requerer pouco custo e pouco espaço para o seu desenvolvimento.

Apesar de o alcoolismo ser muito prevalente nos dias atuais, principalmente nos homens, numa proporção de dez homens para uma mulher, até o momento existem poucas publicações disponíveis em que são avaliadas alterações no corpo cavernoso relacionadas à disfunção erétil (CARDIM et al, 1986).

A ereção peniana é um processo neurovascular complexo iniciado através de estimulação sexual, que podem ser fatores físicos ou psicológicos com atuação de substâncias no endotélio vascular resultando no ato sexual satisfatório. Diversos fatores podem interferir de forma negativa no mecanismo fisiológico da ereção peniana, consequentemente, levando a disfunção erétil, tais fatores como hipertensão arterial sistêmica, diabetes méllitus, tabagismo e alcoolismo (SARRIS et al, 2017), alvo deste estudo.

O etanol é uma das substâncias mais consumidas nas diferentes sociedades, tornando-se, assim, alvo de inúmeros estudos que visam conhecer sobre sua toxicidade (PIVETTA, 2005). As células do musculo liso, que compõe a base estrutural do espaço do corpo cavernoso, relaxam e levam a ereção peniana (LUO et al, 2017).

Apesar da grande associação entre o consumo de álcool e o aumento da incidência da disfunção erétil, os mecanismos moleculares envolvidos ainda são poucos conhecidos (LEITE, et al 2017). Devido a abundância, os microRNAs tem sido descritos envolvidos em diversas funções fisiologicas dos processos celulares, e além disso estão envolvidos em muitos processos fisiopatológicos, como, por exemplo, a disfunção erétil (XIU – JU LUO, 2013). Dentre os processos celulares, os microRNAs exercem funções anti ou pró apoptóticas. Embora a conexão dos microRNAs a apoptose esteja bem estabelecida, sua função em resposta a apoptose induzida pelo etanol permanece em grande parte desconhecida.

Para realização deste trabalho, foi feita uma busca *in silico* em tres importantes plataformas de base de dados: *Diana Tools*, *TargetScan* e *MirWalk*. Nessa busca foram identificados 3 microRNAs- miR 145, - 210 e – 486, relacionados às proteínas AIF e PARP, que estão envolvidas no processo de apoptose.

O microRNA 145 é um dos microRNAs mais abundantes na parede

vascular e em células do músculo liso vascular, sendo uma das moléculas comunicantes mais importantes que regula a modulação fenotípica e a homeostase vascular (LUO, 2017).

Numa pesquisa realizada por Mullany e colaboradores, observou-se que o consumo de álcool a longo prazo alterou a expressão de 84 microRNAs em tecido normal da mucosa retal. Esses resultados sustentam a hipótese de que o consumo de álcool regular pode influenciar na expressão dos microRNAs. Esse estudo sugeriu também que diferentes tipos de álcool são capazes de impactar na expressão de microRNAs de maneiras diferentes (MULLANY et al., 2017).

O microRNA 145 foi estudado por Luo e colaboradores em 2017, e foi demonstrado que a expressão e a função desse microRNA em células musculares do corpo cavernoso são ainda pouco conhecidas. Sabe-se que este microRNA apresenta-se como pró apoptótico, participando também da diferenciação celular e da modulação fenotípica. Em trabalho de Luo (2013), os autores descreveram que após a exposição às altas doses de etanol houve hiperexpressão do microRNA 145 em tecidos gastricos.

Neste estudo, quando comparados animais do grupo controle e do grupo alcolizado não encontramos diferença estatística significativa ($p=0,9372$); no entanto, observamos discreto aumento da expressão do microRNA 145 no grupo alcolizado, o que justifica um possível aumento da apoptose, isto é, um dos danos consequentes ao consumo de álcool.

Em trabalho de Ay et al. (2011), os autores investigaram o papel do microRNA 145 no tecido muscular liso dos corpos cavernosos na patogênese da disfunção erétil em ratos diabéticos. Os autores encontraram diferença significativa ($p<0,01$) da expressão do microRNA 145 quando compararam ratos do grupo controle com ratos diabéticos, sendo o nível de expressão deste significativamente reduzido em ratos diabéticos e com disfunção erétil (AY et al, 2011).

O microRNA-145 em níveis fisiológicos regula os mecanismos apoptóticos, diferenciações e modulações fenotípicas das células musculares lisas dos corpos cavernosos e seu epitélio vascular, embora, o experimento não tenha apresentado variações estatísticas significativas o discreto aumento sugere a interferência corroborando a disfunção erétil, visto que aumentar a taxa apoptótica prejudica a homeostasia tecidual. (LUO, 2017).

O microRNA-210, também alvo deste estudo, foi relacionado à diversas

funções celulares, tais como, hipóxia, angiogênese, apoptose, proliferação, diferenciação, regulação do ciclo celular, reparo do dano no DNA, metabolismo mitocondrial e crescimento tumoral (WANG, 2013).

Mullany e colaboradores, em trabalho de 2017, analisaram a expressão de diversos microRNAs em 1447 casos de câncer colorretal associados ao consumo regular de álcool. Neste estudo, os autores encontraram 84 microRNAs significativamente associados à tumorigênese, dentre eles, o miR-210, o qual mostrou-se hiperexpresso quando associado a pacientes adeptos ao consumo regular de álcool, inclusive, relacionado aos maiores índices de mortalidade (MULLANY et al., 2107).

Neste trabalho, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na expressão do miR-210 quando comparamos tecido do corpo cavernosos de animais do grupo controle e do grupo alcoolizado ($p= 3939$); contudo, é possível observar um discreto aumento na expressão deste no grupo controle, o que vai de encontro à sua ação anti-apoptótica.

Além disso, o microRNA-210, quando hiperexpresso, pode inibir a translocação da proteína AIF da mitocôndria para o núcleo, impedindo, dessa forma, a indução da morte celular (WANG, 2013).

Através da análise de imunohistoquímica, também feita a partir do corpo cavernoso de animais controle e animais alcoolizados, encontramos marcação nuclear positiva para essa proteína, no entanto, sem diferença estatística significativa ($p=0,6831$). A partir da contagem de células marcadas, encontramos maior marcação positiva no grupo controle, assim como o miR-210.

Por fim, analisamos a expressão do miR-486, o qual apresenta função na miogênese e na plasticidade celular, além de exercer função anti-apoptótica. Da mesma forma dos demais microRNAs deste estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na expressão do miR-486 quando comparados animais do grupo controle e alcoolizados ($p=9372$).

Sabe-se que o miR-486 inibe a via de apoptose mediada por mitocôndria e protege cardiomiócitos contra a morte estimulada por H_2O_2 (LI et al., 2018), além disso, o tratamento com exossomos contendo esse microRNA, foi estudado como uma estratégia eficaz para proteger contra lesão endotelial em casos de isquemia renal (VINÃS et al., 2016).

Apenas um estudo foi encontrado na literatura demonstrando associação

do miR-486 com a proteína PARP. Na ocasião, os autores utilizaram análise de PCR em tempo real, *Imunoblotting* e imunohistoquímica em tecido muscular de ratos, e encontraram que houve diminuição dos níveis de expressão do miR-486 e da proteína PARP em músculos de ratos caquéticos, evidenciando o papel desse microRNA na miogênese. No entanto, os autores ressaltam que, a partir desses achados, não foi possível diferenciar animais caquéticos de animais não-caquéticos (CHACON-CABRERA et al., 2015).

A partir da análise de imunoistoquímica, neste trabalho, não encontramos diferença estatística significativa quando comparamos animais do grupo controle e alcoolizado ($p=0,6279$).

Ao final deste trabalho, entendemos que haja, pelo menos, dois caminhos importantes para enfatizar os estudos a respeito do alcoolismo humano e a sua relação com a disfunção erétil: a busca de marcadores genéticos e, a busca de terapêuticas eficazes para o tratamento dessa patologia (QUINTANILLA et al., 2006).

Apesar de o estudo de microRNAs ser, relativamente, recente, esses demonstram importante papel em processos fisiológicos e patológicos. Ao serem analisados de maneira isolada e em pequena escala, corre-se o risco de não serem identificadas as suas principais funções, no entanto, trabalhos como esse, são demasiadamente importantes por se tratarem do início do conhecimento de diversos processos patológicos, podendo, no futuro, tornarem-se úteis no diagnóstico e tratamento das doenças.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos após avaliação da apoptose, associada ou não a modelo de alcoolismo crônico, permitiram as seguintes conclusões:

- Não foi observado diferença na expressão de AIF e PARP, assim como dos seus microRNAs reguladores: miR-145, miR-210 e miR-486, nos corpos cavernosos de ratos submetidos a modelo de “alcoolismo semivoluntário”.
- Apesar de não observamos diferença estatística significativa foi possível constatar que: 1) a expressão proteica de PARP e AIF nos corpos cavernosos de ratos foi baixa e semelhante nos animais dos grupos controle e tratado com etanol; 2) A expressão gênica do microRNA - 145, miR-210 e miR-486 nos corpos cavernosos de ratos foi baixa nos animais dos grupos controle e tratado com etanol; 3) A expressão gênica do microRNA -145 e miRNA-486 foi maior nos animais do grupo tratado com etanol quando comparado aos animais do grupo controle; 4) A expressão gênica do microRNA - 210 foi maior nos animais do grupo controle quando comparado aos animais do grupo tratado com etanol; 5) Foi observada correlação entre a expressão protéica de PARP e AIF e do miRNA-210, ambos com maior marcação positiva no grupo controle.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ALBA CHACON-CABRERA, CLARA FERMOSELLE, IDA SALMELA, JOSE YELAMOS, ESTHER BARREIRO. MicroRNA expression and protein acetylation pattern in respiratory and limb muscles of Parp-1^{-/-} and Parp-2^{-/-} mice with lung cancer cachexia. Elsevier.v.4.,12,2015.

AMARAL, B. A. D. et al. MicroRNAs: biogênese, functions and its potential role in oral carcinogenesis. Odontol. Clinic cient., v. 09., p. 105-109, 2010.

Barbery CE, Celigoj FA, Turner SD, Smith RP, Kavoussi PK, Annex BH, et al. Alterations in microRNA expression in a murine model of diet-induced vasculogenic erectile dysfunction. J Sex Med.v.07.,11,2015.

Bröker LE, Krüyt FAE, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. Clin Cancer Res. V.,11, 2005

BURGOS-ACEVES MA, COHEN A, PAOLELLA G, LEPRETTI M, SMITH Y, FAGGIO C, LIONETTI L. Modulation of mitochondrial functions by xenobiotic-induced microRNA: From environmental sentinel organisms to mammals. Sci Total Environ, v.08.,12,2018.

CEDERBAUM AI. Alcohol metabolism. Clin Liver.v,04., 10, 2012.

Céline Candé, Isabelle Cohen, Eric Daugas, Luigi Ravagnan, Nathanael Larochette, Naoufal Zamzami, Guido Kroemer. Biochimie. v. 84.,11, 2002.

Cerda A, Fajardo CM, Basso RG, Hirata MH, Hirata RD. Role of microRNAs 221/222 on statin induced nitric oxide release in human endothelial cells. Arq Bras Cardiol; v. 07.,11, 2002.

CHAO J, MA M, LIN Y, CHIANG H, I-SHENG HWANG T. Study on Alcohol Dependence and Factors Related to Erectile Dysfunction Among Aborigines in Taiwan. American Journal of Men's Health.,v. 9.,13,2014.

CHENG JY, NG EM, CHEN RY, KO JS. Alcohol consumption and erectile dysfunction:

meta-analysis of population-based studies. International journal of impotence research. v.19.,12,2014.

CHENGYUAN YU,YANG LIU,LI SUN, DINGYU WANG, YIKE WANG, SHIQI ZHAO, HUI DAI, JING ZHAO, SONG ZHANG, MINGHUI LI, YU HAN, SHUANG LU, XINWEN DONG, GUANGZHONG LIU, SHENGZHU YU AND YUE LI. Chronic obstructive sleep apnea promotes aortic remodeling in canines through miR-145/Smad3 signaling pathway. Ocontarget. v.17., 11, 2017.

COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; DONATI, M. B. *et al.* Cardiovascular and overall mortality risk in relation to alcohol consumption in patients with cardiovascular disease. Circulation. v.19.,12, 2010.

COURVILLE, C. B. Effects of Alcohol on the Nervous System of Man. Los Angeles: San Lucas Press.Springer.v.8.,11, 1955.

COWLAND, J. B.; HOTHER, C.; GRØNBAEK, K. MicroRNAs and cancer. APMIS, v. 115.,10, 2007.

Cunha JP, Lizarte FS Neto, Novais PC, Gattas D, Carvalho CA, Tirapelli DP, et al. Expression profiles of eNOS, iNOS and microRNA-27b in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. Acta Cir Bras;v.32.,12,2017.

DI CASTELNUOVO, A.; COSTANZO, S.; BAGNARDI, V. *et al.* Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. Arch Intern Med. v. 166, 12, 2006.

DISSIZ M; Oskay UYI. Evaluation of Sexual Functions in Turkish Alcohol-Dependent Males. J Sex Med v.32.,09,2007.

DRAKE RL; VOGL AW; MITCHELL AWM. Gray's anatomia clínica para estudantes / - 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier,v.32.,12, 2015.

FEI WANG, LEI XIONG, XIN HUANG, TONG ZHAO, LI-YING WU, ZHAO-HUI

XUEFENG DING, SHUHONG LIU, YAN WU, YONGQI ZHAO, KUIWU WU*, LING-LING ZHU, MING FAN* miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells. April. v. 9,12, 2013.

F.Z. GONÇALVES, F.S. LIZARTE, NETO, P.C. NOVAIS, D. GATTAS, L.G. LOURENÇO, C.A.M. DE CARVALHO, D.P.C. TIRAPELLI, C.A.F. MOLINA, L.F. TIRAPELLI, S. TUCCI, JR. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. Braz J Med Biol Res. v. 35,12, 2018.

GANDELLINI, P.; DOLDI, V.; ZAFFARONI, N. microRNAs as players and signals in the metastatic cascade: implications for the development of novel anti-metastatic therapies. Semin Cancer Biol. v.8,36, 2017.

Gao S, Wassler M, Zhang L, Li Y, Wang J, Zhang Y, et al. MicroRNA-133a regulates insulin-like growth factor-1 receptor expression and vascular smooth muscle cell proliferation in murine atherosclerosis. Atherosclerosis.v.36,12, 2014.

GARDNER JD, MOUTON AJ. Alcohol Effects on Cardiac Function. Comprehensive Physiology.v.8,11.2015.

GLINA S, COHEN DJ, VIEIRA M. Diagnosis of erectile dysfunction. Current Opinion Psychiatry.v.27,11,2014.

GOLDSTEIN I, LUE TF, PADMA-NATHAN H, ROSEN RC, STEERS WD, WICKER PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. N Engl J Med.v.8,13,1998.

GONÇALVES FZ, LIZARTE NETO FS, NOVAIS PC, GATTAS D, LOURENÇO LG, DE CARVALHO CAM, TIRAPELLI DPC, MOLINA CAF, TIRAPELLI LF, TUCCI S JR. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. Braz J Med Biol Res. v.29,13, 2018.

GUYTON AC; HALL JE. Tratado De Fisiologia Médica 11. Ed. RJ. Guanabara Koogan, 2006.

HARPER, C. The neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. Alcohol & Alcoholism. v.44., 15, 2009.

ISO, H.; BABA, S.; MANNAMI, T.; et al. Alcohol consumption and risk of stroke among middle-aged men: the JPHC Study Cohort I. Stroke, v. 35.,13, 2004.

Jalali S, Ramanathan GK, Parthasarathy PT, Aljubran S, Galam L, Yunus A, et al. Mir-206 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and differentiation. PLoS One, v.7.,12, 2012.

JENICA D. TAPOCIK, MATTHEW SOLOMON, MEGHAN FLANIGAN, MARCUS MEINHARDT, ESTELLE BARBIER, JESSE SCHANK, MELANIE SCHWANDT, WOLFGANG H. SOMMER, MARKUS HEILIG. Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. Pharmacogenomics. v.13., 14, 2013.

JENSEN J, LENDORF A, STIMPEL H, FROST J, IBSEN H, ROSENKILDE P. The prevalence and etiology of impotence in 101 male hypertensive outpatients. *Am J Hypertens.*v.12.,13,1999.

J LUO, L LIU, Z WU, G CHEN, E LI, L LUO, F LI, S ZHAO, A WEI & Z ZHAO. The effects of miRNA-145 on the phenotypic modulation of rat corpus cavernosum smooth muscle cells. International Journal of Impotence Research. v.27.,13, 2017.

JIN LI, QIULIAN ZHOU, TINGTING YANG, YONGQIN LI, YUHUI ZHANG, JINHUA WANG, ZHENG JIAO. SGK1 inhibits PM2.5-induced apoptosis and oxidative stress in human lung alveolar epithelial A549 cells. Elsevier.v.496.,13,2018.

JOHANNES CB, ARAUJO AB, FELDMAN HÁ, DERBY CA, KLEINMAN KP, MCKINLAY JB (2000) Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J.Urol.*v.269.,11,2000.

JULIO C. MORALES, LONGSHAN LI, FARJANA J. FATTAH, YING DONG, ERIK A. BEY, MALINA PATEL, JINMING GAO, and DAVID A. Boothman. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* v.24.,13, 2014.

KALANT, H. Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effects on biological membranes. *Biology of Alcoholism.* v.1.,62, 1983.

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.

KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A.; FRIEDMAN, G. D.; SIDNEY, S. Alcohol drinking and risk of hospitalization for ischemic stroke. *Am J Cardiol.* v.88., 6, 2001.

KULSHRESHTHA, R. et al. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle.* v.6.,12,2007.

LAUMANN EO, NICOLOSI A, GLASSER DB, et al. GSSAB Investigators' Group. Sexual problems among women and men aged 40–80 y: prevalence and correlates identified in the global study of sexual attitudes and behaviors. *international Journal of Impotence Research.* v.17.,39-57,2005.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* v.5., 843-854, 1993.

LILA E.; MULLANY; JENNIFER S.; HERRICK1; ROGER K.; WOLF1; JOHN R. STEVENS; MARTHA L.; SLATTERY. Alterations in microRNA expression associated with alcohol consumption in rectal cancer subjects. v.28.,545-555, 2017.

LIU C, WANG R. The role of microRNA in erectile dysfunction. *Journal Integrative Andrology.* v4., 81-86,2017.

LIZARTE FS, CLAUDINO MA, TIRAPELLI CR, et al. Chronic ethanol consumption

induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. *Urology*.v4.,11,2009.

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. *BJUI international*.v.11.,12, 2010.

MARISA DE SOUZA CARDIM; SIMONE GONÇALVES DE ASSIS; MARCY SBERZE; TAKUMI IGUCHI; ANASTÁCIO FERREIRA MORGADO. Epidemiologia descritiva do alcoolismo em grupos populacionais do Brasil. Trabalho de Conclusão do Curso de Metodologia da Pesquisa em Saúde Mental - ENSP/FIOCRUZ. Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ – RJ. 1985.

MCMAHON CG. Erectile dysfunction. *International Medicine Journal*.v44.,11,2014 .

MENS, MICHELLE M. J., GHANBARI, MOHSEN. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev*.v,14., 309–322, 2018.

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

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

MOBLEY, D.F.; KHERA, M.; BAUM, N. Recent advances in the treatment of erectile dysfunction. *Original article*.v.8.,7, 2017.

MOLINA PE, GARDNER JD, SOUZA-SMITH FM, WHITAKER AM. Alcohol Abuse: Critical Pathophysiological Processes and Contribution to Disease Burden. *PHYSIOLOGY*.v.29., 203–215, 2014.

MOLINA PE, HOEK JB, NELSON S, GUIDOT DM, LANG CH, WANDS JR, CRAWFORD JM. Mechanisms of alcohol- induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp*

Res.v. 27., 563–575, 2003.

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

MOVVA, R.; FIGUEREDO, V. M. Alcohol and the heart: to abstain or not to abstain?. *Int J Cardiol.*v. 164., 267-276, 2013.

NICOLOSO, M. S.; CALIN, G. A. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain Pathol*. v.18.,122-9, Jan 2008.

O'KEEFE, J. H.; BHATTI, S. K.; BAJWA, A.; DINICOLANTONIO, J. J.; LAVIE, C. J. Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison...or the remedy. *Mayo Clin Proc*. v. 89., 382-93, 2014.

OSCAR-BERMAN, M.; MARINKOVIC, K. Alcohol: effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychol Rev*.v.17., 239-257, 2007.

Pan F, Xu J, Zhang Q, Qiu X, Yu W, Xia J, Chen T, Pan L, Chen Y, Dai Y. Identification and characterization of the MicroRNA profile in aging rats with erectile dysfunction. *J Sex Med*.v.11.,9 , 2014.

PIVETTA, L.A. Efeitos tóxicos do etanol e sua relação com o estresse oxidativo. (Dissertação). Apresentado à Universidade Federal de Santa Maria-RS. 2005.

REDELL, J. B.; LIU, Y.; DASH, P. K. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes. *J Neurosci Res*.v. 87.,6, 2009.

REILLY MT, NORONHA A, WARREN K. Perspectives on the neuroscience of alcohol from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. *Handbook of Clinical Neurology* .*Handb Clin Neurol*.v.125.,15-29, 2014.

REIS LO, PEREIRA TC, LOPES-CENDES I, FERREIRA U. MicroRNAs: a new paradigm on molecular urological oncology. *Urology*.v.76.,521-527, 2010.

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

SCHMITTGEN, T. D. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*. v.12.,9 , 2008.

SHAMLOUL R, GHANEM H. Erectile dysfunction. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040455> *Lancet*.v.122.,153-165, 2013.

SINGH, S. K. et al. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J*.v. 275., 4929-44, 2008.

SIVALINGAM S, HASHIM H, SCHWAIBOLD H. An overview of the diagnosis and treatment of erectile dysfunction. *Drugs*. v. 66., 18, 2006.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. *Journal American Academia Dermatol*. v., 59.,12, 2008.

TAN, K. S. et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLOS One*. v. 4.,11, 2009.

TAYLOR, C. L. et al. Temporary vessel occlusion during intracranial aneurysm repair. *Neurosurgery*. v.39.,12, 1996.

TRAISH, A.M. et al. Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology*, v. 140.,7,1999.

VICTOR, M.; ADAMS, R.D.; MANCALL, E. L.; A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. *Arch Neurol*. v. 1.,13,1959.

Viñas JL, Burger D, Zimpelmann J, et al. Transfer of microRNA-486-5p from human

endothelial colony forming cell-derived exosomes reduces ischemic kidney injury. *Kidney International*.v.12.,14,2016.

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., 42-49, 2002.

WANG XJ, XU TY, XIA LL, ZHONG S, ZHANG XH, ZHU ZW, CHEN DR, LIU Y, FAN Y, XU C, ZHANG MG, SHEN ZJ. Castration impairs erectile organ structure and function by inhibiting autophagy and promoting apoptosis of corpus cavernosum smooth muscle cells in rats. *Urology*. v., 1105-15, 2015.

WESPES E, AMAR E, HATZICHRISTOU D, MONTORAL F, PRYOR J, VANDI Y. Guidelines on erectile dysfunction. *European Urology*.v.41.,5, 2002.

XIU-JU LUO, BIN LIU, ZHONG DAI, TING-BO LI, NIAN-SHENG LI , XIAO-JIE ZHANG, ZHI-CHUN YANG, YUAN-JIAN LI, JUN PENG. Expression of apoptosis-associated microRNAs in ethanol-induced acute gastric mucosal injury via JNK. *Elsevier*.v.47.,12,2013

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Molecular Cell*.v.39.,133-44, 2010.

ZHANG, W; DAHLBERG, J. E; TAM, W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *American Journal Pathology*. v.171.,728-38, 2007.