UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDO ZAPPAROLI GONÇALVES

Expressão dos receptores de endotelina ET_A e ET_B e dos microRNAs miR-155 e miR-199 em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes *mellitus*

V. 1.

RIBEIRÃO PRETO
2016

FERNANDO ZAPPAROLI GONÇALVES

Expressão dos receptores de endotelina ET_A e ET_B e dos microRNAs miR-155 e miR-199 em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes *mellitus*

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

Orientador: **Prof. Dr. Silvio Tucci Júnior**
Coorientadora: **Prof. Dra. Daniela P. C. Tirapelli**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Gonçalves, Fernando Zapparoli

Expressão dos Receptores de Endotelina ET_A e ET_B e dos microRNAs miR-155 e miR-199 em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes *mellitus*

56 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: Tucci Júnior, Silvio.

1. Alcoolismo. 2. Diabetes. 3. Corpos cavernosos. 4.microRNA. 5. Receptores de endotelina. 6. Disfunção erétil

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Zapparoli Gonçalves

Expressão dos receptores de endotelina ET_A e ET_B e dos microRNAs miR-155 e miR-199 em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes *mellitus*

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:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura: _____

“O Tejo é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia,
Mas o Tejo não é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia
Porque o Tejo não é o rio que corre pela minha aldeia”

(Alberto Caeiro, heterônimo de Fernando Pessoa)

DEDICATÓRIA

Aos **meus queridos pais**, **Miguel e Ruth**, de quem sempre me orgulhei por tê-los como exemplos de boas pessoas e que me ensinaram a fazer o bem, a ser bom filho e a respeitar os bons princípios. Fizeram sempre tudo para que tivéssemos a melhor oportunidade de estudar! Não poderia imaginar, enquanto menino, na fila da sopa do Colégio Estadual Mário Vieira Marcondes de Barretos, que poderia estar dedicando esta etapa a vocês!

Aos **meus irmãos**, sempre parceiros, **Iara e Miguel**.

A **minha melhor amiga e companheira** de mais de 20 anos, a querida e **doce Moniquinha**, além dos **meus dois filhos**, **Mateus e Júlia**. Espero que vocês se orgulhem do pai como eu me orgulho dos meus!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Professor Doutor Silvio Tucci Júnior**, que para mim será sempre uma das referências de mestre, docente e amigo. Admiro sua capacidade de liderar e agregar.

À **Professora Doutora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli**, agradeço por tê-la como coorientadora. Sempre bastante estimada e competente. Passei a admirá-la e respeitá-la cada vez mais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a **Deus pela família abençoada** e estruturada que tenho o que sempre tornou minha caminhada menos árdua.

Aos meus cunhados **Vitor, Marcelo, Jô e Alessandra**, que sempre me apoiaram nas muitas etapas da vida.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos,** que inicialmente incentivou a realização de pós-graduações de seu corpo clínico de médicos titulares.

Ao **amigo Roberto Lodeiro Müller**, que foi solícito sempre que precisei nesta etapa final da confecção da tese.

À **Professora Silvia Elias Bortolo,** que, com muita presteza, sugeriu correções de português na minha tese.

Ao **amigo Fauze José Daher**, que, com serenidade e companheirismo, muito me ajudou neste ano de 2016.

Ao **Professor Luís Fernando Tirapelli** e ao **Doutor Fermino Lizarte Neto**, ambos da FMRP-USP, que sempre estiveram presentes quando precisei, muito competentes e solícitos.

Ao **Professor Augusto Diogo Filho** e **ao médico assistente Paulo Henrique de Sousa Fernandes,** que muito me ensinaram no começo da minha formação cirúrgica durante a Residência de Cirurgia Geral da Universidade Federal de Uberlândia, dando boa base para minha longa caminhada médica.

Ao **Doutor Francisco de Paula da Fonseca**, que foi fundamental na minha acertada “mudança de caminho” da Cancerologia Cirúrgica do Hospital A.C. Camargo-SP, concluída em janeiro de 2008, para a Urologia.

Aos meus quatro **Docentes de Urologia da Universidade Federal de Uberlândia**, nestes 3 anos de residência: os **Professores Lindolfo Dumont Prado, Omar Pacheco Simão, Osvaldo de Freitas e Sebastião Antônio Borba**, que foram fundamentais na minha sólida formação cirúrgica urológica, além de serem “um espelho” para os jovens residentes em formação.

Aos dois principais médicos assistentes do Serviço de Urologia da Universidade Federal de Uberlândia durante meu período de residência 2008-2010: **Danielo Garcia de Freitas e Leandro Alves de Oliveira**, que compartilharam conosco seu tempo e experiência com muito amor, dedicação e satisfação em ensinar urologia, completando este excelente time de professores.

Também não poderia esquecer os inúmeros profissionais do laboratório experimental da FMRP-USP que participaram ativamente na execução deste projeto.

Mais uma etapa de aprendizado se finda. Espero continuar sendo abençoado por Deus nesta continuidade de ensinamentos recebidos dos mestres e compartilhados com meus médicos residentes e pacientes.

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SíMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1 Disfunção Erétil 15
2.2 Anatomia e fisiologia da ereção 17
2.3 Disfunção Erétil Vasculogênica e Fatores de Risco 18
2.4 O Alcoolismo e a ereção peniana 19
2.5 Diabetes *mellittus* 20
2.6 Papel da endotelina na disfunção erétil 21
2.7 MicroRNAs 22
3 JUSTIFICATIVA 24
4 OBJETIVOS 25
5 MATERIAIS E MÉTODOS 26
5.1. Animais 26
5.2.Grupos experimentais 26
5.2.1.Grupo Controle (GC) 26
5.2.2.Grupo Alcoolizado (GA) 26
5.2.3 Grupo Diabético (GD) 26
5.2.4 Grupo Diabético e Alcoolizado (GD+A) 26
5.3. Análise por estudo imunoistoquímico 27
5.4. Detecção da endotelina pela técnica de qT-PCR 27
5.4.1 Detecção dos receptores de endotelina 28
5.5 Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) 29
5.5.1 Extração do RNA 29
5.5.2 Síntese de cDNA 29
5.5.3. Condições da reação de PCR em tempo real (qT-PCR) 29
5.6 Análise estatística 30

6 RESULTADOS.....31
6.1 PCR em tempo real.....31
6.1.1 Genes.....31
6.1.2. MicroRNAs tecido.....32
6.1.3 MicroRNAs sangue.....33
6.2. Resultados: Análise Imunoistoquímica.....34
7 DISCUSSÃO.....42
8 CONCLUSÃO.....47
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....48

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AUA	American Urological Association
Ca2+	Cálcio
cDNA	Ácido desoxidorribonucleico complementar
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CC	Corpo cavernoso
CE	Corpo esponjoso
CT	Ciclo *threshold*
DCV	Doença cardiovascular
DE	Disfunção erétil
DEPC	Dietil pirocarbonato
DM	Diabetes *mellitus*
DNA	Ácido desoxidorribonucléico
EC	Espaços cavernosos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET_A	Receptor de endotelina A
ET_B	Receptor de endotelina B
EV	Espaço vascular
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GA	Grupo alcoolizado
GC	Grupo controle
GD	Grupo diabético
GD+A	Grupo diabético e alcoolizado
GTP	Trifosfato de guanosina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
L	Litro
Lin4	do inglês *lineage-deficient-4*

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
O2	Molécula de oxigênio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE5	Inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5
PhE	Fenilefrina
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

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do gene do receptor ETA entre os grupos estudados..... 31

Gráfico 2. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do gene do receptor ETB entre os grupos estudados..... 31

Gráfico 3. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-155 dos corpos cavernosos entre os grupos estudados..... 32

Gráfico 4. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-199 dos corpos cavernosos entre os grupos estudados..... 32

Gráfico 5. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão gênica no sangue do miRNA-155 dos dois grupos estudados..... 33

Gráfico 6. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão gênica no sangue do miRNA-199 nos dois grupos estudados..... 33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GC. Tricrômico de *Masson,* 50x..... 34

Figura 2. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GC. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 35

Figura 3. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GA. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 36

Figura 4. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GA. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 36

Figura 5. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 37

Figura 6. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 38

Figura 7. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 39

Figura 8 Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x..... 39

Figura 9. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_A no tecido cavernoso de um animal do GD+A. 400x..... 40

Figura 10. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_A no tecido cavernoso de um animal do GD. 400x..... 41

Figura 11. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_B no tecido cavernoso de um animal do GD+A. 400x..... 41

RESUMO

Gonçalves, FZ. **Expressão dos receptores de endotelina ET_A e ET_B e dos microRNAs miR-155 e miR-199 em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes.** 58 p.Tese de (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Introdução: O Alcoolismo e o Diabetes são doenças bastante prevalentes em todos os continentes e seriam fatores de risco relacionados com a Disfunção Erétil. Dentre os muitos mecanismos relacionados com a ereção temos a Endotelina e seus receptores, causando intensa e sustentada contração da musculatura lisa dos corpos cavernosos penianos (CC). Acredita-se que poderia haver regulação das vias dos receptores de endotelina pelos microRNAs, que são RNAs não codificantes, regulam a expressão gênica e poderiam sofrer alteração pelos efeitos do álcool e/ou diabetes.

Objetivos: Avaliar, experimentalmente com utilização de ratos, se há alteração nas vias dos receptores da endotelina devido ao efeito crônico do alcoolismo, do diabetes ou de sua associação e se existiria correlação com os microRNAs miR-155 e miR-199.

Materiais e Métodos: Utilizaram-se 48 Ratos Wistar machos divididos em 4 grupos: Controle (GC), Alcoolizado (GA), Diabético (GD) e Diabético+Alcoolizado (GD+A). Foi utilizado PCR em tempo real e imunoistoquímica para estudar a expressão gênica e proteica dos receptores da endotelina ET_A e ET_B em corpos cavernosos e PCR em tempo real para avaliar a expressão gênica dos miR-155 e miR-199 no sangue e CC.

Resultados: Análise imunohistoquímica encontrou baixa expressão dos receptores de endotelina no GC e elevada nos grupos experimentais, sendo que os receptores ET_A estavam distribuídos de forma difusa e em maior concentração, enquanto os receptores de ET_B localizavam-se na periferia dos CC. Análise por PCR em tempo real dos CC verificou: aumento não significativo de ET_A no GD e de ET_B no GD+A; hipoexpressão significativa do miR-199 no GD+A e hipoexpressão não significativa do miR-199 e miR-155 nos demais grupos experimentais em relação ao GC. Análise no sangue: hipoexpressão significativa do miR-155 no GA+D e não significativa nos demais grupos em relação ao GC, hipoexpressão significativa do miR-199 no GD e GD+A e não significativa no GA, todos em relação ao GC.

Conclusões: Foi encontrado aumento dos receptores de endotelina como efeito do álcool, do diabetes e de sua associação, também identificou-se diminuição, principalmente, da expressão gênica do miR-199 nos corpos cavernosos dos grupos experimentais o que sugere a hipótese de que o aumento da endotelina poderia ser determinado pela diminuição da ação supressora do miR-199 que se encontra hipoexpresso em decorrência dos efeitos deletérios do álcool e diabetes.

A descoberta de alterações em microRNAs associada ao desenvolvimento continuado da genômica pode propiciar novos diagnósticos e marcadores para inúmeras doenças, além de ajudar a identificar possíveis terapêuticas alvo moleculares.

Palavras chave: Alcoolismo, Diabetes, Corpos cavernosos, MicroRNA, Receptores de endotelina, Disfunção erétil

ABSTRACT

Gonçalves, FZ. **Endothelin receptors ET_A and ET_B expression and miR-155 e miR-199 microRNAs expression in rats submitted to experimental chronic alcoholism and to diabetes mellitus***.* 58 p.Tese de (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016

Introduction: Alcoholism and Diabetes are very prevalent diseases in all the continents and are considered risk factors related to erectile dysfunction. Endothelin and its receptor are some of the mechanism related to erection, causing intense and sustained contracture of the penile corpus cavernosum (CC) smooth muscle. It's thought that micro-RNAs could regulate endothelin receptors pathways. Micro-RNAs are not coding RNAs that regulate gene expression and could be affected by alcohol and/or diabetes.
Objectives: To experimentally evaluate, using rats, alterations in receptors pathways due to chronic effects of alcoholism, diabetes, alone or in association, and to correlate this alterations with miR-155 and miR-199 microRNAs.
Materials and Methods: 48 male Wistar rats were used. They were divided in four groups: Control group (GC), Alcoholic group (GA), Diabetic group (GD) and Diabetic+Alcoholic group (GD+A). We used real time PCR and immunohistochemical study to evaluate gene and protein expression of endothelin ET_A and ET_B in corpus cavernosum tissue and real time PCR to evaluate gene expression of miR-155 and miR-199 in blood and CC.
Results: Immunohistochemical analysis showed low expression of endothelin receptors in GC and high expression in experimental groups; ET_A receptors were distributed in diffuse pattern and higher concentration although ET_B receptors had a peripheral pattern in CC. Real time PCR analysis in CC showed: not significant ET_A increase in DG and ET_B increase in GD+A; significant miR-199 hypoexpression in GD+A and not significant miR-199 and miR-155 hypoexpression in other experimental groups compared to GC. Blood analysis showed significant miR-155 hypoexpression in GD+A and not significant in other experimental groups compared to CG, significant miR-199 hypoexpression in GD and GD+A and not significant in GA, compared to GC.
Conclusions: We found endothelin receptors increase as an effect of alcohol abuse, diabetes and its association; we also found decrease, mainly in gene expression, of miR-199 in corpus cavernosum tissue of experimental groups, what suggests the hypothesis that endothelin increase could be determined by a decrease of suppress action of miR-199, that is hypo expressed because of deleterious effect of alcohol and diabetes. Finding microRNAs changes, associated to continuous development in genomics, could propitiates new diagnostic tools and markers to innumerous diseases and even help to identify possible new molecular target therapies.

Keywords: Alcoholism, Diabetes, Corpus cavernosoum, MicroRNA, Endothelin receptors, Erectile dysfunction.

1-INTRODUÇÃO

Disfunção erétil (DE) é definida pelo National Institute of Health (NIH) e pela American Urological Association (AUA) como a incapacidade persistente de alcançar ou manter uma ereção adequada para a satisfação sexual.[1] A DE ocorre em graus variáveis e apresenta-se associada a efeitos adversos sobre a qualidade de vida, particularmente sobre o bem-estar pessoal e inter-relações familiares e sociais.[2,3]

Foi estimado que, em 1995, houve mais de 152 milhões de homens no mundo com algum tipo de disfunção erétil. A projeção para 2025 espera uma prevalência de 322 milhões de homens[4], aumentando com a idade, sendo de 1 a 10% em homens com menos de 40 anos, 2 a 9% entre 40 e 50 anos, 20 a 40% entre 60 e 69 anos e 50 a 100% em homens com idade igual ou superior a 70 anos.[5]

Diabetes *mellitus (*DM) é uma doença crônica bastante prevalente em todos os continentes, com 371 milhões de indivíduos acometidos em 2012.[6] Estima-se, para 2030, a existência de 552 milhões de diabéticos.[7]

O aumento da glicemia presente na DM é o principal determinante das complicações vasculares e microvasculares e teria participação na fisiopatologia da DE em indivíduos diabéticos, que frequentemente possuem outras comorbidades clínicas: hipertensão arterial, sobrepeso, obesidade, síndrome metabólica e aterosclerose, que também seriam fatores de risco para DE. [8]

O consumo de bebidas alcoólicas tem aumentado bastante nas últimas décadas, sendo que a prevalência de dependência alcoólica na população das 107 maiores cidades brasileiras é de 12,3%.[9] Acredita-se que possa haver relação entre alcoolismo e DE.[10]

O estudo dos mecanismos envolvidos na ereção peniana pôde proporcionar o desenvolvimento das atuais medicações utilizadas para o tratamento da disfunção erétil, porém novas medicações poderão ser desenvolvidas com a compreensão dos mecanismos moleculares e com a descoberta da regulação gênica determinada pelos microRNAs, que são RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, sendo responsáveis por diversos processos celulares e estariam relacionados com diversas patologias, inclusive com a DE.

No presente estudo, propusemos avaliar a relação existente entre o Diabetes *mellitus*, Alcoolismo crônico e Disfunção Erétil, indiretamente por meio da expressão dos receptores de endotelina e dos microRNAs miR-155 e miR-199.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Disfunção Erétil

É uma desordem médica comum, com incidência anual em norte-americanos, com idade entre 40 e 69 anos, de 26 casos por 1000 homens. A incidência aumenta com a idade, diabetes, baixa escolaridade, problemas cardíacos e hipertensão arterial.[3]

Estudo brasileiro realizado na cidade de Salvador obteve incidência 2,5 vezes maior, 65 casos anualmente por 1000 homens nesta mesma faixa etária. Esse resultado foi atribuído a maior prevalência de fumantes, hipertensos e portadores de doenças cardiovasculares nesta população.[11]

A DE é classificada após anamnese, história psicossexual, exame clínico e laboratorial em orgânica, psicogênica ou mista. A predominantemente psicogênica possui aparecimento agudo, situacional, de curso intermitente, com ereções noturnas ou não coitais preservadas. As causas orgânicas usualmente têm etiologia vascular, hormonal ou neurogênica de forma isolada ou associadas.[12]

A DE vasculogênica e a doença cardiovascular (DCV) têm comum fisiopatologia: disfunção endotelial e inflamação, que determinam obstrução vascular em estágios mais avançados.[13]

Em relação ao tratamento, a mudança no estilo de vida, diminuindo os fatores de risco, principalmente com perda de peso e prática de exercícios físicos regulares, deve preceder ou acompanhar a terapêutica com medicamentos e tem impacto no controle da disfunção erétil em pacientes obesos ou com sobrepeso.[14]

A DE não orgânica deve ter uma abordagem psicossexual com resultados variáveis.[15]

Na DE resultante de traumas arteriais, em pacientes jovens, a cirurgia de revascularização microcirúrgica tem bons resultados a longo prazo, em torno de 60 a 70%.[16]

A causa hormonal de DE pode ser efetivamente tratada com reposição de testosterona, após exclusão de outras causas endócrinas para falência testicular e adequada investigação para câncer prostático, necessitando seguimento periódico com toque retal, antígeno prostático específico (PSA) e hematócrito.[17] Estudos recentes demonstram que a terapêutica com reposição de testosterona não aumenta a incidência de câncer prostático.[18]

Tratamento medicamentoso oral, considerado como primeira linha, é realizado com um dos tipos de inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5),

não sendo responsável pela iniciação da ereção e requer estímulo sexual para que esta ocorra.[19]

Sildenafila (Viagra®), lançado em 1998, foi o primeiro PDE5 comercializado, com efeito após 30 a 60 minutos da sua ingesta, com bons resultados quando comparados com placebo.[19] Vários estudos demostraram sua eficácia e segurança, mesmo em indivíduos diabéticos, hipertensos e com doenças cardiovasculares,[19-21] possuindo inclusive efeito protetor cardíaco.[22] O vardenafila (Levitra®) possui estrutura e propriedades químicas bastante semelhantes ao sildenafila.[22]

Tadalafila (Cialis®), com meia vida mais longa e efeito mais prolongado que o sildenafil, foi testado em uso diário com doses mais reduzidas (2,5 e 5,0 mg), em relação à posologia habitual de 20 mg, obtendo-se satisfatória tolerância e efetividade.[23,24] Similar resultado ocorreu em pacientes diabéticos.[25]

Pacientes prostatectomizados, pela técnica preservadora de feixe vasculonervoso, obtiveram menor taxa de DE com uso de 5 mg de tadalafila diariamente quando comparado com placebo nos primeiros 9 meses de acompanhamento após a cirurgia. [26]

Ensaios clínicos demonstraram que os inibidores da PDE5 possuem boa segurança e não aumentaram a incidência de Infarto Agudo do Miocárdio, sendo o uso de nitratos para vasodilatação coronariana a única contraindicação formal para seu uso. [27]

Pacientes que não respondem à terapêutica oral com dose plena são candidatos à segunda linha de tratamento, com injeção intracavernosa de alprostadil isoladamente ou associado a papaverina e fentolamina.[28] Possui eficácia entre 70 e 94% na atividade sexual, porém seu uso muitas vezes é descontinuado devido a dores penianas (50%), ereções prolongadas (5%), priapismo (1%) e fibrose do corpo cavernoso (2%).[29,30]

Implante cirúrgico de próteses semirrígidas ou infláveis pode ser considerado quando houver falha com a terapêutica medicamentosa, com índice de satisfação em torno de 70%, sendo a infecção do sítio cirúrgico sua temida complicação.[31]

A compreensão dos mecanismos envolvidos na ereção, associada aos avanços adquiridos pela Ciência Básica, propiciou um novo horizonte no tratamento da DE. A terapêutica gênica com alvo molecular, que é definida como a capacidade de introduzir material genético (RNA ou DNA) em um apropriado tipo celular *in vitro* ou *in vivo* alterando a expressão gênica celular para produção de um efeito terapêutico desejado.[32]

O uso de modelos animais, principalmente com mamíferos de pequeno porte (ratos, camundongos e coelhos) é bastante difundido para estudo da DE.

O rato é o modelo mais utilizado pela facilidade financeira e de espaço, por existir modelos já bem estabelecidos para hipertensão e diabetes, além de seu tamanho ser um pouco maior que o camundongo, o que facilitaria sua instrumentação.[33]

2.2 Anatomia e fisiologia da ereção

A irrigação arterial peniana é realizada, usualmente, pela artéria pudenda interna, proveniente da artéria ilíaca interna. Irrigação acessória pode existir oriunda das artérias ilíaca externa, obturatória, vesical e femoral.

A artéria pudenda interna, após emitir ramos perineais continua como artéria peniana comum, que por sua vez, dá origem aos seus três ramos: artéria dorsal peniana, artéria bulbouretral e artéria cavernosa. A dorsal é responsável pela irrigação e aumento da glande durante ereção. A artéria bulbouretral irriga o bulbo e corpo esponjoso peniano.

A artéria cavernosa fornece a maioria do aporte sanguíneo do corpo cavernoso, através de seus muitos ramos terminais, denominados artérias helicinais, que irrigam o tecido de ereção trabecular e os sinusóides, encontrando-se contraídas e tortuosas na detumescência e dilatadas e retificadas na tumescência.[34]

Anatomicamente, o pênis pode ser dividido em duas partes: a raiz e o corpo peniano. A raiz ou base do pênis, sua porção fixa aos ramos conjuntos do púbis e do ísquio, é constituída de ramo (crus) esquerdo, ramo direito, bulbo e músculo a eles associados (musculatura bulboesponjosa). O bulbo do pênis localiza-se entre os ramos, sendo sua parte posterior aumentada e perfurada superiormente pela uretra.[35]

O corpo do pênis é formado por três estruturas tubulares: os corpos cavernosos pareados e o corpo esponjoso situado na porção inferior dos corpos cavernosos. Distalmente, o corpo esponjoso se expande para formar a glande, dentro da qual os corpos cavernosos terminam.[36]

Cada corpo cavernoso possui uma camada externa, a túnica albugínea, constituída por colágeno e elastina, e uma interna constituída por pequenas cavidades vasculares designadas sinusóides, lacunas ou espaços cavernosos, que são delimitados por endotélio, o que permite considerar o pênis um órgão essencialmente vascular.

Os espaços sinusóides são sustentados por uma rede de trabéculas formadas por tecido muscular liso e conjuntivo, com fibras elásticas e de colágeno, onde existem numerosas arteríolas e terminações nervosas.[34]

O controle do tônus do músculo liso cavernoso é um processo complexo que envolve três tipos de controle neurológico: adrenérgico, colinérgico e não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC).[37]

As artérias, as veias e a musculatura lisa cavernosa peniana recebem uma rica inervação adrenérgica, sendo aceito que o pênis mantenha seu estado flácido principalmente devido a esta atividade simpática, em que a liberação de noradrenalina induz a sua contração,[38] enquanto os nervos parassimpáticos determinam o seu relaxamento.[39]

A contração induzida por noradrenalina e fenilefrina (PhE) em corpos cavernosos é mediada pela ativação dos receptores alfa1-adrenérgicos.[40] Consequentemente, há redução do lúmen arteriolar e dos espaços sinusoidais, restringindo o fluxo sanguíneo com a finalidade de manter uma baixa pressão intracavernosa e o pênis no estado flácido.[38,39,41]

A resposta erétil do pênis está associada ao músculo liso vascular presente na túnica média das artérias e arteríolas, que carregam sangue dentro do corpo cavernoso, e também às células do músculo liso vascular que delineiam os sinusóides. O relaxamento destas células no início da resposta erétil permite que os sinusóides possam expandir e acomodar o aumento do influxo sanguíneo. Ao expandirem-se contra a túnica albugínea, os sinusóides comprimem as veias responsáveis pelo efluxo sanguíneo. A limitação do efluxo dependente da pressão constitui o processo veno-oclusivo. O aumento do influxo devido à dilatação arteriolar e a redução do efluxo determinado pela veno-oclusão são a base da ereção peniana.[42]

2.3 Disfunção Erétil Vasculogênica e Fatores de Risco

Pacientes que apresentam doença vascular estão predispostos a desenvolver disfunção erétil vasculogênica (DEV).[43,44] Fatores de risco como diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia, idade avançada, tabagismo e alcoolismo atuam de maneira sinérgica no desenvolvimento de DEV e aterosclerose. Em ambas as patologias, observam-se a ocorrência de disfunção endotelial, em particular a alteração na liberação e nas ações do óxido nítrico. Foi demonstrado que tanto em pacientes com DEV quanto em animais a liberação de NO de fibras NANC e do endotélio está prejudicada.[45-47]

A DEV e as doenças cardiovasculares podem ser consideradas duas manifestações diferentes do mesmo agravo sistêmico, uma vez que possuem os mesmos fatores de risco e semelhante fisiopatologia, porém a DE normalmente precede de 3 a 5 anos um evento cardiovascular sintomático como infarto agudo do miocárdio e angina, podendo por este motivo ser considerado como um marcador biológico. O urologista deve ficar atento na sua prática clínica aos sintomas de impotência sexual, devendo haver acompanhamento conjunto com um cardiologista no caso de DEV.[48]

2.4 O Alcoolismo e a ereção peniana

O aumento significativo da produção de bebidas alcoólicas nos últimos anos, acompanhado pelo seu grande consumo, tem provocado um aumento dos problemas médicos e psicossociais relacionados com o uso abusivo e dependência alcoólica. As consequências do alcoolismo na saúde do indivíduo e da comunidade vêm sendo uma das causas do aumento da morbidade e da mortalidade.[49]

Estudo brasileiro realizado em 134 cidades, com 2.346 indivíduos por meio de entrevista, traçou o padrão de consumo de álcool da população adulta nas cinco regiões brasileiras e encontrou maior consumo entre os homens, solteiros, mais pobres e com menor nível de escolaridade. O número de abstêmios, indivíduos que não fizeram uso de álcool nos últimos 12 meses, foi considerado alto, em torno de 48%, porém os indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas apresentaram elevado índice de consumo de risco, com 25% relatando algum tipo de problema relacionado ao consumo, 3% preencheram critério para abuso e 9% para dependência.[50]

Considerando que as doenças cardiovasculares e disfunção erétil tenham similares fatores de risco e que o consumo crônico de grandes quantidades de álcool possua efeito citotóxico deletério na saúde global, na função hepática e na imunidade, acredita-se que haja relação entre DE e consumo de álcool.[10]

Porém, estudo prospectivo, com seguimento de 14 anos, realizado com profissionais da saúde americanos, que incluiu 22.086 indivíduos com idade variando entre 40 e 75 anos, que gozavam de boa saúde e satisfatória ereção, não encontrou associação entre consumo de bebidas alcoólicas e DE, inclusive em doses superiores a 30mg por dia.[51]

Estudos de corte transversal realizados no Brasil, Itália, Japão, Malásia e Áustria não encontraram relação entre consumo de bebidas alcoólicas e DE.[52]

Em estudo prospectivo americano com 1.156 indivíduos, realizado entre 1987 e 1989, na área metropolitana de Boston, a modificação no hábito de beber, ou seja, parar de beber, não alterou a taxa de DE.[53]

Ratos submetidos a um modelo de alcoolismo crônico semivoluntário apresentaram menor taxa sérica de testosterona, sendo observado aumento na contração do corpo cavernoso com 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 não alcoolizado.[54]

2.5 Diabetes *mellittus*

O Diabetes *mellitus* é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente ou da falta de insulina, ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, ou das duas, o que produz profundas anormalidades no metabolismo. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As consequências do DM no longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos.[55]

O DM é dividido, principalmente, em dois tipos: diabetes tipo I e diabetes tipo II. Estudos demonstram que o diabetes tipo II, tipo de diabetes mais prevalente na população, é capaz de aumentar de 2 a 4 vezes o risco de doenças cardiovasculares e de complicações microvasculares como retinopatia e nefropatia.[56-58]

O DM está associado a um acelerado processo aterosclerótico dos grandes vasos, doença microvascular arterial, neuropatia autonômica, dislipidemia, hipertensão e disfunção endotelial.

A incidência de DE em indivíduos diabéticos é elevada e dependente do período de exposição desde o diagnóstico, quando comparada à população em geral, na mesma faixa etária, sendo aproximadamente três vezes mais comum.[59]

A causa da disfunção erétil aumentada no DM é multifatorial, sendo principalmente determinada pela disfunção endotelial e neuropatia autonômica dos nervos colinérgicos dos corpos cavernosos penianos dos indivíduos expostos ao diabetes.[60]

Estudo recente em ratos diabéticos, utilizando-se de terapia gênica, conseguiu aumentar a taxa de óxido nítrico sintetase induzida, tal conhecimento

pode ser utilizado para o desenvolvimento de novas terapias para tratamento da DE.[61]

2.6 Papel da endotelina na disfunção erétil

Dados da literatura sugerem que o consumo crônico de etanol acaba modificando as funções vasculares em decorrência de alterações no funcionamento do endotélio que é reconhecido como uma importante unidade funcional envolvida na regulação do tônus muscular. Dentre os diferentes fatores de relaxamento e contração produzidos pelo endotélio temos a endotelina (ET), que é um potente peptídeo vasoconstritor, isolado inicialmente de um meio de cultura de células endoteliais humanas.[62,63]

Três isoformas da ET foram isoladas, a endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3), cada uma constituída por uma cadeia de 21 aminoácidos. Recentemente foram caracterizados e clonados de pulmões bovinos e de ratos dois subtipos distintos de receptores de ET (ET_A e ET_B).

Os receptores ET_A são expressos nas células de músculo liso vascular, no qual medeiam a vasoconstrição. Receptores vasculares ET_B foram, inicialmente, descritos no endotélio, mediando vasodilatação via produção de óxido nítrico e prostaciclina. Porém também foram descritos receptores ET_B localizados no músculo liso vascular que são responsáveis por induzir contração.[62,63]

A endotelina-1 causa intensa e sustentada contração da musculatura lisa dos corpos cavernosos e contribui para a manutenção do tônus peniano. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram contração do corpo cavernoso peniano mediado pelo ET_A, enquanto ET_B desencadearam vasodilatação.[64] Além da vasoconstrição a ET-1 também possui propriedades mitogênicas, inflamatórias, estando seu aumento relacionado com inúmeros processos patológicos como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e insuficiência renal crônica.[65]

A ET-1 teve seu aumento relatado em estudos com alcoolismo crônico e acredita-se que esteja relacionada com a fisiopatologia do aumento na incidência de disfunções sexuais em alcoólatras.[64]

2.7 MicroRNAs

Os microRNAs (miRs) são definidos como sendo RNAs não-codificantes (ncRNAs) constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, clivados no citoplasma a partir de precursores com 60 a 110 nucleotídeos (pré-miRs) pela enzima RNA polimerase III, denominada Dicer.[66-68] Descritos pela primeira vez em 1993, com a descoberta do Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*), sendo nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* [69]

Os microRNAs agem regulando a expressão gênica por reduzir os níveis dos transcritos de mRNA, de proteínas traduzidas, ou dos dois. Muitos miRs são conservados entre organismos relacionados remotamente, o que sugere que estas moléculas são essenciais na regulação de diversos processos celulares tais como na diferenciação, proliferação, apoptose e no metabolismo. Dessa forma, a perda na regulação da expressão de miRs pode determinar uma série de desordens.[70]

Estudos têm demonstrado que um único miR pode controlar centenas de diferentes genes alvo. Acredita-se que cerca de um terço dos genes humanos sejam controlados por miR, o que determinaria grande impacto nos inúmeros processos fisiológicos, imunológicos e patológicos, inclusive na biologia molecular cancerígena.[71]

O miR-155 seria um típico microRNA multifuncional modulando a expressão gênica em nível pós transcricional e estaria relacionado com diversos mecanismos fisiopatológicos, incluindo proliferação celular, angiogênese, carcinogênese, cascata inflamatória e aterosclerose, exercendo em cada tipo celular efeitos distintos.[72]

Estudos utilizando rastreamento de alteração na expressão de microRNAs pelo álcool encontraram cerca de 2% de alteração (aumento ou diminuição). O mecanismo de alteração dos miRs ainda não foi totalmente compreendido. Acredita-se que a redução nos níveis de metilação do DNA tenha relação com tal alteração. Também há associação entre a tolerância alcoólica, que é uma alteração importante para os efeitos deletérios do etilismo, e modificações moleculares baseadas em mecanismos dos miRs.[73]

O consumo de álcool em ratos aumenta a permeabilidade intestinal para endotoxinas que, ao entrarem em contato com os macrófagos e células de Kupffer hepáticas, desencadeariam processo inflamatório local, a esteatohepatite.[74]

A regulação da resposta inflamatória celular hepática ao aumento de endotoxinas via circulação portal, desencadeada pelo álcool, também é regulada por microRNAs, principalmente pelos miR-155, miR-21 e miR-146a.[75]

Consumo de álcool em humanos causaria decréscimo nos miR-199 e miR-155, que influenciaria no aumento da endotelina-1, potente vasoconstritor, e do seu receptor, o que afetaria a microcirculação hepática, piorando o processo inflamatório.[76]

Estudos *in vivo* são necessários para elucidar o real efeito dos microRNAs em cada tipo celular para, no futuro, desenvolver terapêutica alvo molecular capaz de interferir nos mecanismos de inúmeros processos patológicos.

3. JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares, incluindo doenças coronarianas, infarto, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, doenças vasculares periféricas e o diabetes *mellitus* estão estreitamente correlacionados com a presença de disfunção sexual em homens. Acredita-se também que possa haver relação entre alcoolismo e DE.

Visto que o alcoolismo e o diabetes *mellitus* são problemas de saúde, social e econômico em muitas sociedades, tornam-se necessários maiores estudos dos seus efeitos sobre a disfunção erétil.

4. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar, experimentalmente com utilização de ratos, se há alteração nas vias dos receptores da endotelina devido ao efeito crônico do alcoolismo, do diabetes ou de sua associação e se existiria correlação com os microRNAs miR-155 e miR-199.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.Estudos da expressão gênica:

Avaliar o perfil de expressão gênica por meio da técnica de PCR em tempo real:

- Dos receptores de endotelina (ET_A e ET_B) em tecido de corpos cavernosos de ratos.
- Dos miR-155 e miR-199 no sangue e em tecido de corpos cavernosos de ratos.

4.2.Estudos da expressão proteica:

Avaliar o perfil de expressão proteica por meio da técnica de imunoistoquímica dos receptores de endotelina (ET_A e ET_B) em tecido de corpos cavernosos de ratos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. 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, após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

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.

5.2.Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais e tiveram seguimento de 4 semanas após período adaptativo:

5.2.1.Grupo Controle (GC): foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunoistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR. Todos os animais receberam diariamente água *ad libitum*.

5.2.2.Grupo Alcoolizado (GA): foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunoistoquímico 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.

5.2.3.Grupo Diabético (GD): foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunoistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR.

5.2.4.Grupo Diabético e Alcoolizado (GD+A): foi constituído por 12 animais, dos quais 6 foram utilizados para o estudo imunoistoquímico e 6 para expressão gênica por qT-PCR.

Para os animais do grupo etanol (GA, GD+A), foi utilizado o modelo de “alcoolismo semivoluntário”, no qual o fornecimento da solução de etanol a 20% foi o único líquido disponível a estes animais. Assim, a preparação desse grupo experimental ficou condicionada a um breve período de adaptação gradativa ao consumo de etanol. Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10, 20%, tendo início a fase experimental após a terceira semana de tratamento.[77]

Já para os animais do grupo diabético (GD, GD+A), 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-Check Blood glucose monitor (Boehringer Mannheim Corporation, Germany).

5.3. Análise por estudo imunoistoquímico

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 proteica dos receptores ET_A e ET_B, pela técnica de imunoistoquímica, foi utilizado o método de quantificação “em cruzes” da imunorreatividade do tecido muscular liso dos corpos cavernosos marcados (imunorreativas). Os cortes foram avaliados quanto à porcentagem de células marcadas e graduadas de 0 (nenhuma marcação) até 4++++ (mais de 75% das células marcadas), sendo considerado 1+ quando a marcação ocorreu em até 25% das células, 2++ quando a marcação envolveu de 25 a 50% das células e 3+++ quando de 50 a 75% das células estavam marcadas.

A análise das lâminas foi realizada em um microscópio Zeiss®, em aumento de 400x. As imagens foram registradas por uma câmera (Axio Cam Hrc ®) acoplada ao microscópio, que foram arquivadas pelo programa Axiovision 3.1®.

5.4. Detecção da endotelina pela técnica de qT-PCR.

Os animais de todos os grupos (n=24) foram exsanguinados e o pênis retirado na região de inserção da crura. O tecido cavernoso foi dissecado após remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. O corpo cavernoso retirado foi congelado imediatamente com nitrogênio líquido. Os lisados celulares do tecido cavernoso foram processados com o Protein Expression Sample Prep kit (Applied

Biosystems ®) de acordo com as instruções do fabricante, sendo avaliados posteriormente para o perfil de expressão proteica por qT-PCR.

5.4.1 Detecção dos receptores de endotelina

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão proteica diferencial dos receptores de endotelina (ET_A e ET_B), relacionados ao mecanismo de disfunção erétil nos grupos do estudo.

Para a análise quantitativa da expressão das proteínas supracitadas, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Protein Assays, compostos por anticorpos alvo-específicos e oligonucleotídeos (Applied Biosystems).

Ensaios TaqMan de proteína são uma forma adaptada do PLA ™, uma tecnologia de ensaio de ligação de proximidade inventado por Fredriksson e colaboradores em 2002[78], que combina a ligação anticorpo-proteína com a detecção em tempo real baseado no PCR da sequência de ácidos nucléicos repórter. As três etapas básicas do ensaio envolvem num primeiro passo a ligação de uma proteína-alvo a pares de sondas do ensaio. Já na segunda etapa, temos a ligação da DNA ligase aos oligonucleotídeos. O substrato para a ligase é uma estrutura de ponte formada por hibridização de um terceiro oligonucleotídeo complementar às extremidades do par de oligonucleotídeos da sonda. Esta estrutura é formada preferencialmente quando as sondas de ensaio estão em proximidade umas das outras. Subsequente tratamento com proteases inativam a ligase. Na etapa final, tem-se a amplificação e detecção por PCR em tempo real de uma sonda TaqMan.

Os valores de Ct foram determinados das curvas de amplificação usando um limiar de 0.2. Mudanças no “fold” de expressão proteica entre as amostras tratadas e não-tratadas foram determinadas pelo cálculo do ΔCT para cada alvo proteico. Todas as reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) e analisadas no software ProteinAssist TM ®(Applied Biosystems).

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

5.5.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA do tecido, foi adicionado 250 µL de PBS e 750µL 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.

5.5.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do mRNA, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada 0,5µg de RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl de Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™, 0,6 µl de RNase out, completando com água DEPC o volume final de 20µl. Já para a síntese do cDNA do microRNA, a transcrição reversa foi realizada também utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), 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 minutos a 16 º C, 30 minutos a 42 ºC, 5 minutos a 85 º C e em seguida, realizada a 4°C.

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

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial gênica dos receptores de endotelina e dos miR-155 e miR-199, 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 (Applied Biosystems). Para a análise quantitativa da expressão gênica, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems). Considerando-se as diferenças causadas por quantidades

distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normatizados. 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 ΔCT. Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras.

A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT de outra amostra de referência (ΔΔCT), 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 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

5.6 Análise estatística

Na técnica de qT-PCR, foram consideradas para análise as amostras em que a diferença entre as duplicatas não excediam um ciclo e meio. A partir do limiar, foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 Real-Time PCR System os valores de Ct para cada amostra testada. Para análise dos dados, uma amostra foi escolhida como calibrador (p. ex. medula óssea) com o qual cada comparação foi realizada: a) foram realizadas réplicas para calcular o Ct médio; b) Cálculo da diferença entre os Cts do gene de interesse e do gene "housekeeping", cujo resultado é o valor de ΔCt; c) Cálculo da diferença entre o calibrador e a amostra (ΔΔCt); d) O último passo do cálculo foi transformar esses valores em valores absolutos, 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.

6. RESULTADOS

6.1. PCR em tempo real

6.1.1. Genes

3.

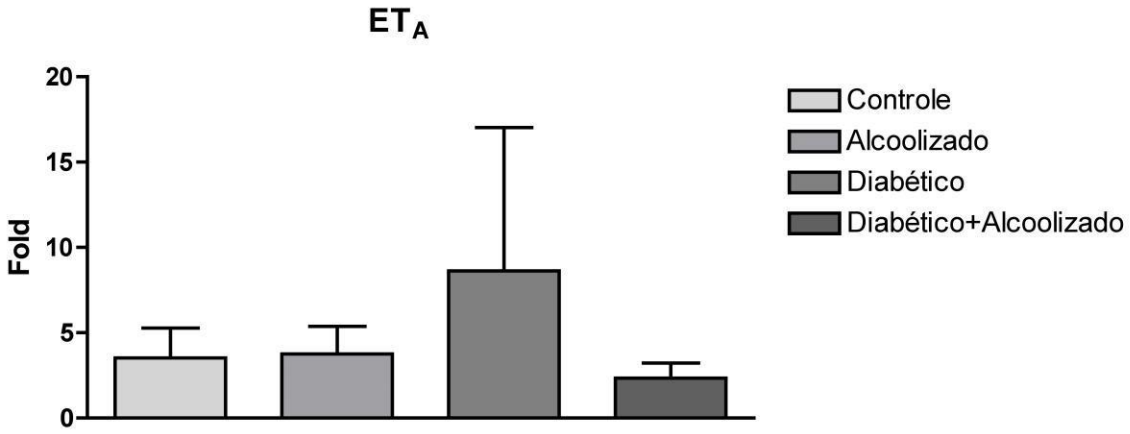

Gráfico 01. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do gene do receptores ET_A entre os grupos estudados. Não houve diferença significante entre os grupos (p = 0,5189, Kruskall Wallis test).

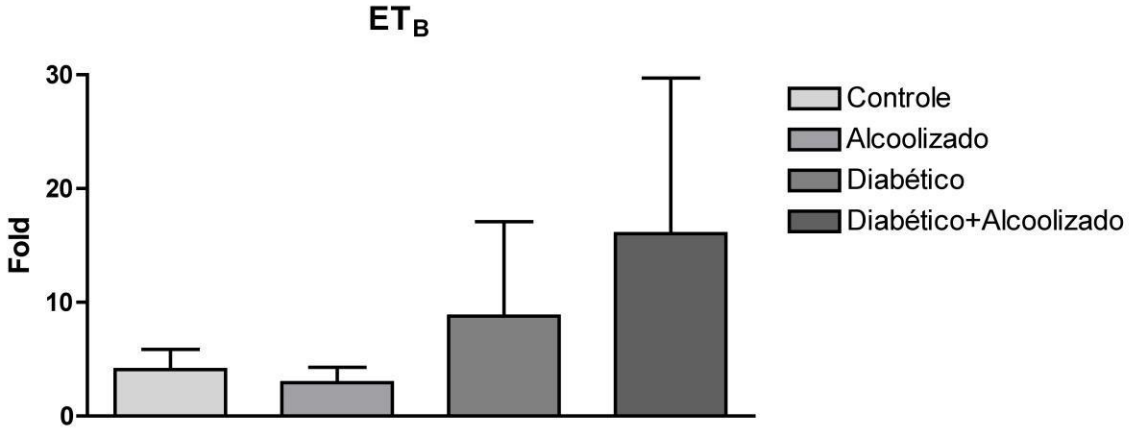

Gráfico 02. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do gene do receptores ET_B entre os grupos estudados. Não houve diferença significante entre os grupos (p = 0,7867, Kruskall Wallis test)

6.1.2. MicroRNAs tecido

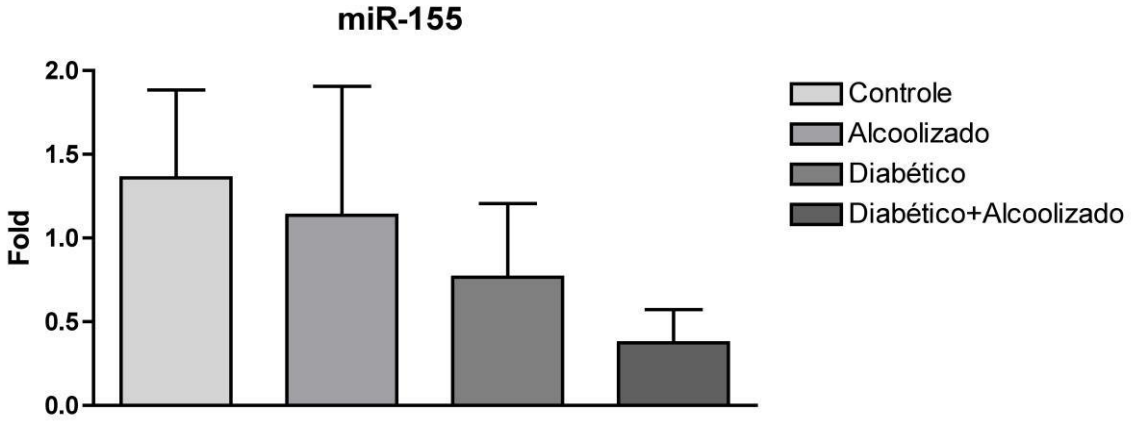

Gráfico 03. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-155 entre os grupos estudados. Não houve diferença significante entre os grupos (p = 0,2553, Kruskall Wallis test).

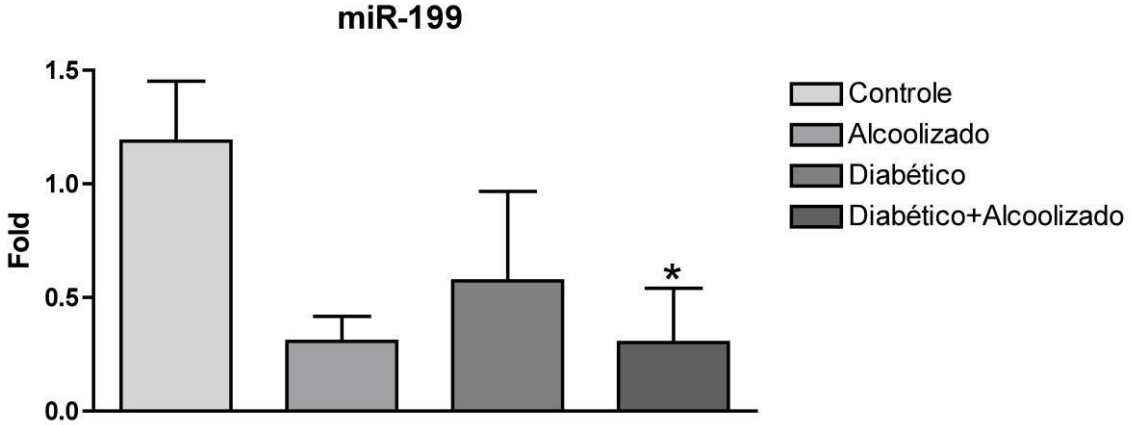

Gráfico 04. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-199 entre os grupos estudados. Houve diferença significante para o grupo controle em relação ao grupo Diabético+Alcoolizado (p = 0,0424, Kruskall Wallis test e p $<$ 0,05, pos-test Dunn`s).

6.1.3 MicroRNAs sangue

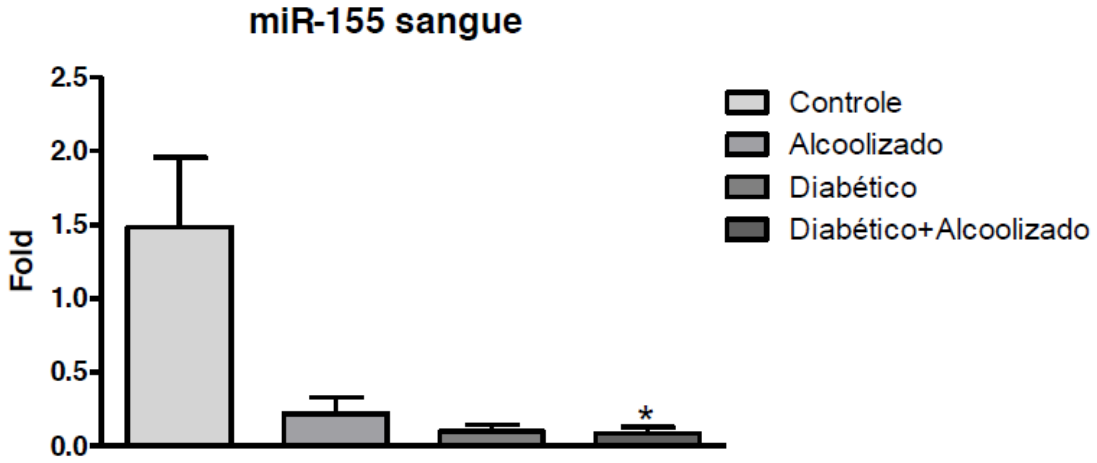

Gráfico 05. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-155 entre os grupos estudados. Houve diferença significante para o grupo controle em relação ao grupo Diabético+Alcoolizado ($p = 0,0364$, Kruskall Wallis test e $p < 0,05$, pos-test Dunn`s).

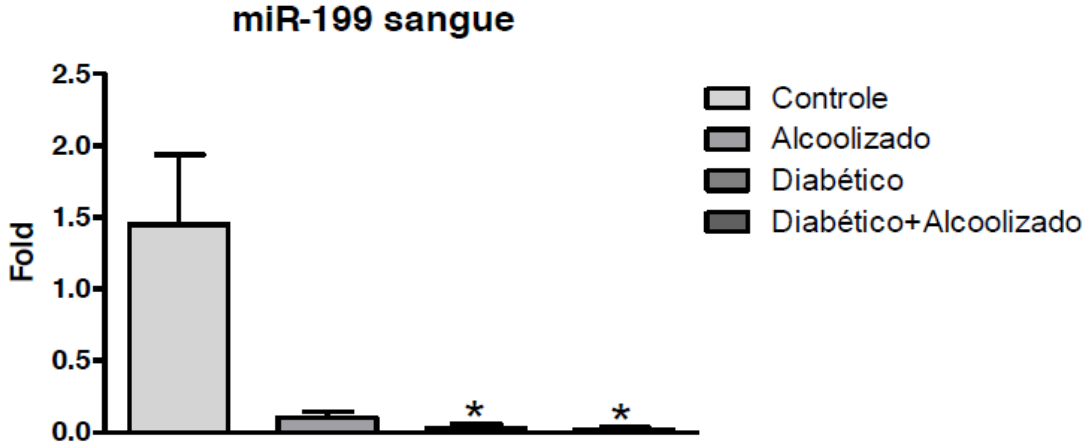

Gráfico 06. Representação da média dos valores (± erro padrão) da expressão do microRNA-199 entre os grupos estudados. Houve diferença significante para o grupo controle em relação aos grupos Diabético e Diabético+Alcoolizado ($p = 0,0057$, Kruskall Wallis test e $p < 0,05$, pos-test Dunn`s).

6.2. Resultados: Análise Imunoistoquímica

Quando se avalia a expressão proteica dos receptores de endotelina A (ET_A) e endotelina B (ET_B) nos animais do GC, observa-se baixa expressão para as duas proteínas (Figuras 1 e 2).

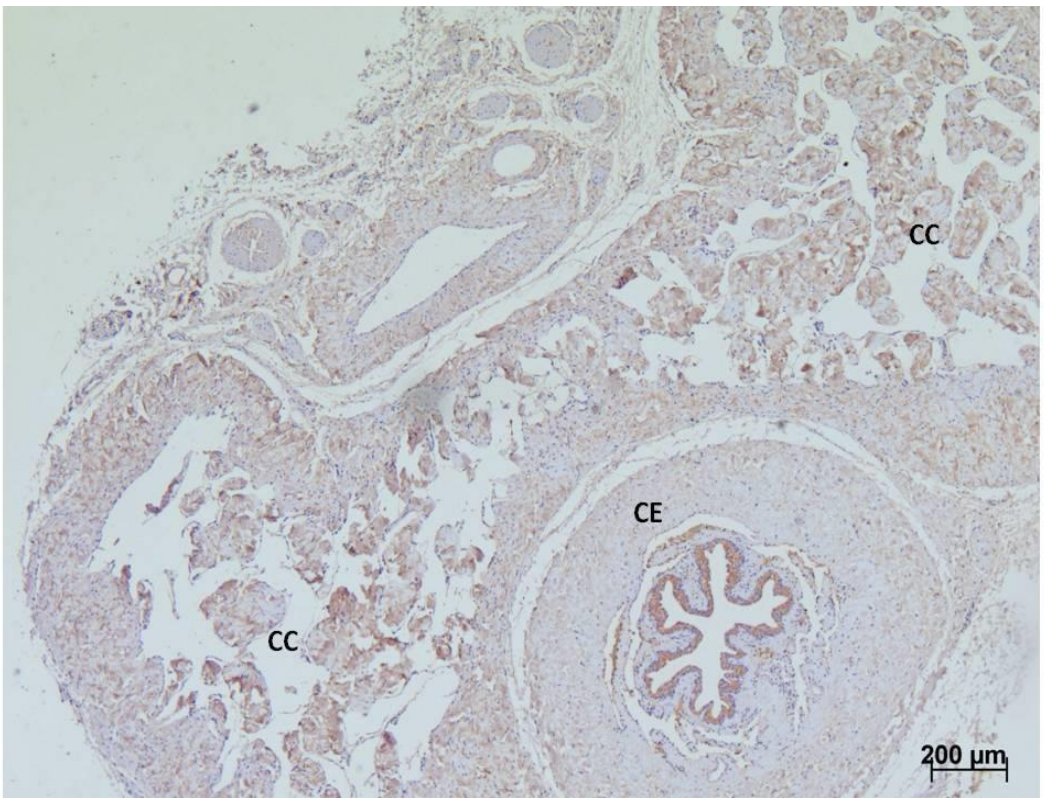

Figura 1. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GC. Observar marcação difusa no tecido erétil (cor caramelo). Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x

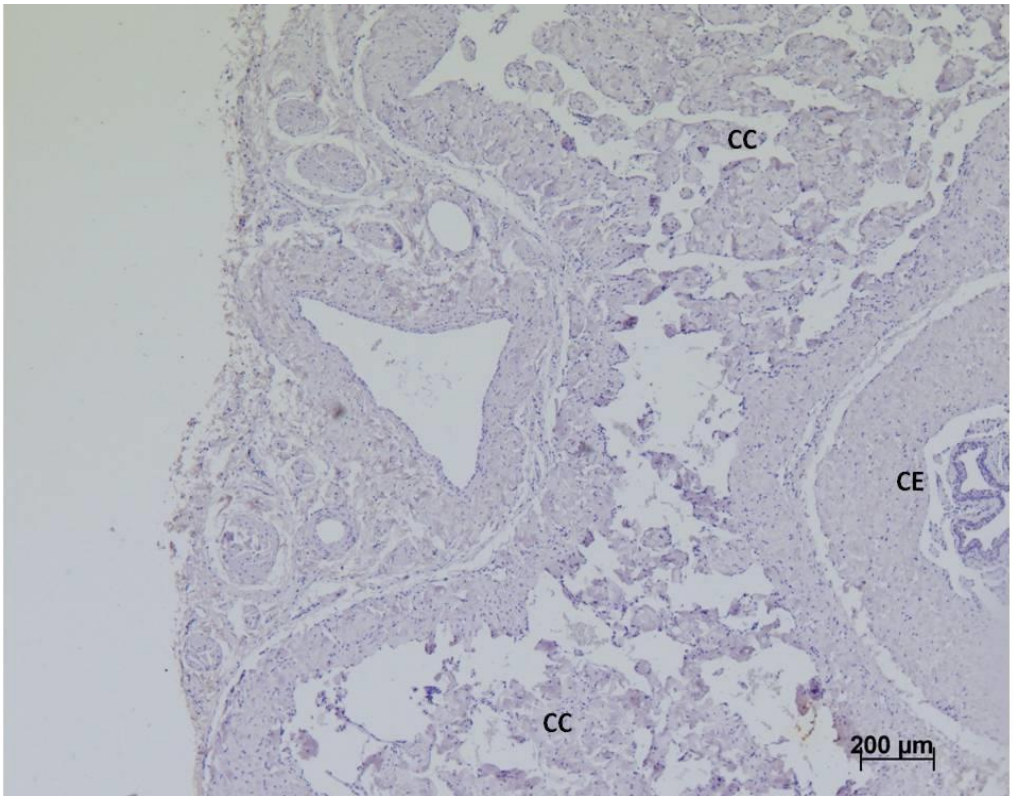

Figura 2. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GC. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

A expressão de ET_A nos animais do grupo alcoolizado (GA), foi bem evidente, com padrão de marcação positiva difusa no tecido erétil que delimita os espaços cavernosos, marcação por cruzes: 2X (Figura 3).

Foi observado que a marcação positiva para ET_B foi maior na região periférica dos corpos cavernosos, principalmente próximo à túnica albugínea e na própria túnica albugínea, marcação por cruzes: 2X (Figura 4).

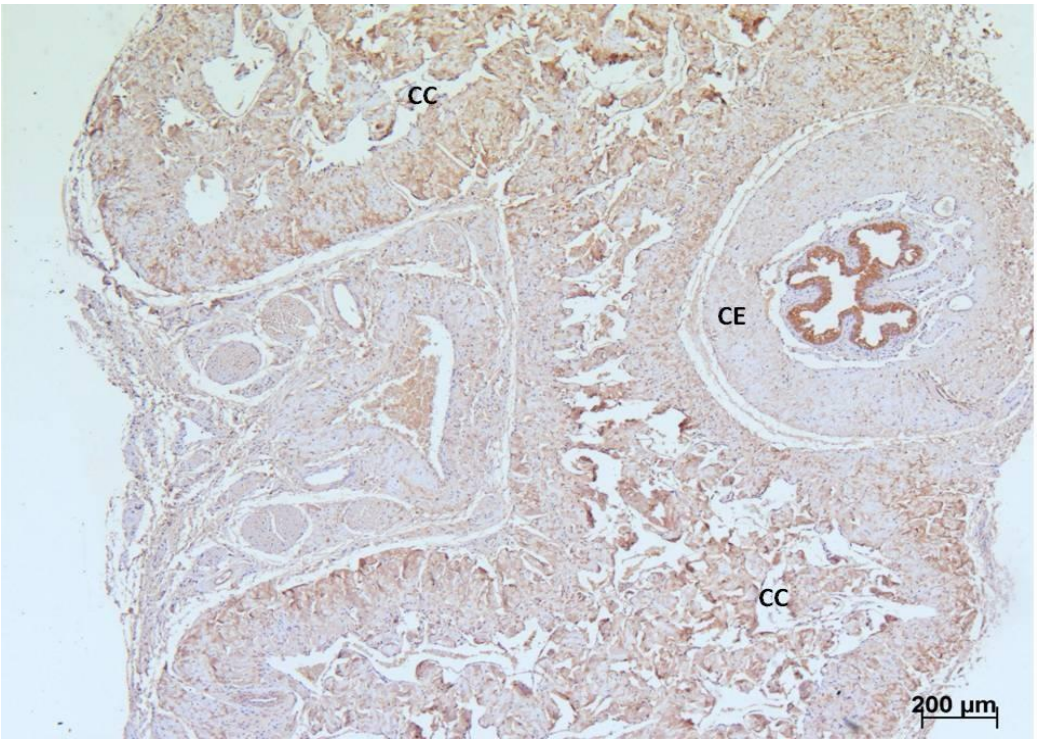

Figura 3. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GA. Observar marcação difusa no tecido erétil. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

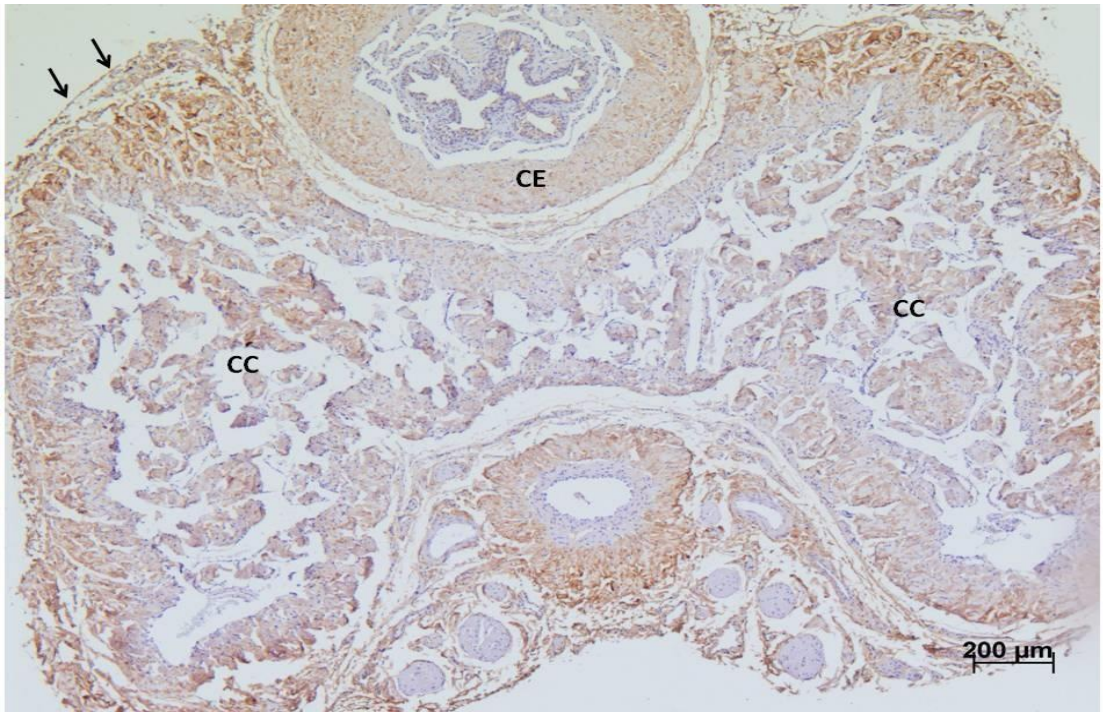

Figura 4. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GA. Observar marcação difusa no tecido erétil (cor caramelo), principalmente próximo à túnica albugínea (setas). Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

A expressão proteica de ET_A e ET_B nos animais do grupo diabético (GD) foi alta, com padrão de marcação para ET_A de forma homogênea e mais intensa no tecido cavernoso, com marcação por cruzes: 3X (Figura 5).

Como descrito para os animais do grupo alcoolizado, foi observado que a marcação positiva para ET_B foi maior na região periférica dos corpos cavernosos, principalmente próximo à túnica albugínea e na própria túnica albugínea, com marcação por cruzes: 2X (Figura 6).

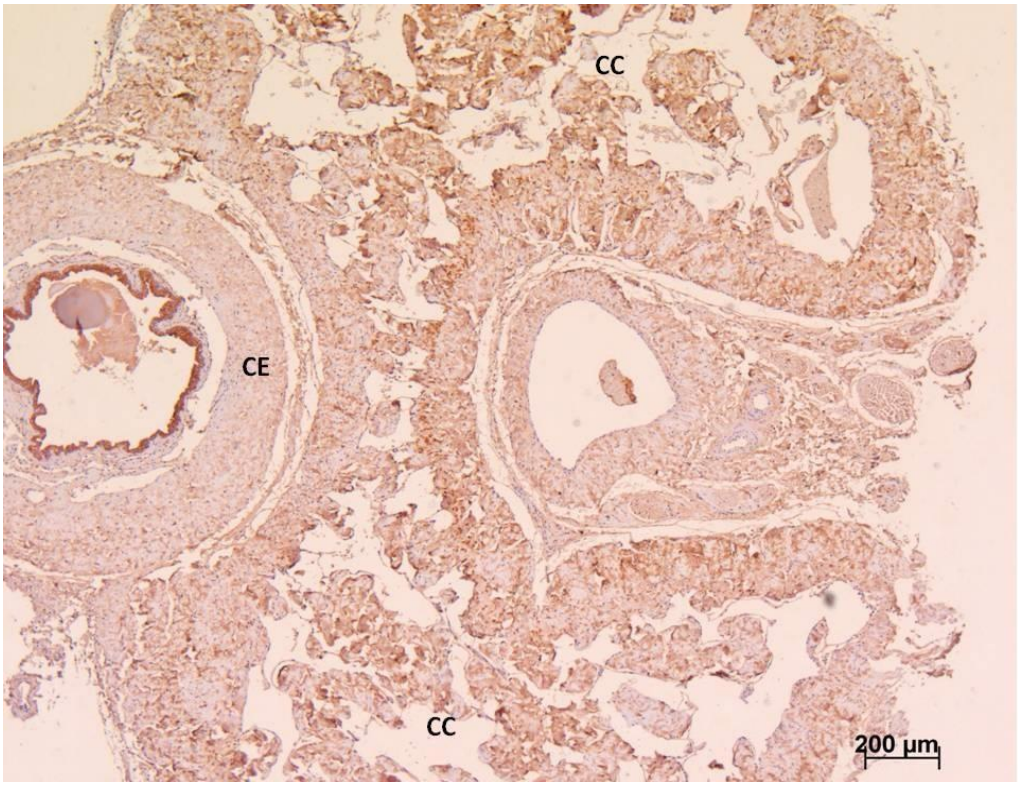

Figura 5. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD. Observar forte e difusa marcação no tecido erétil. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

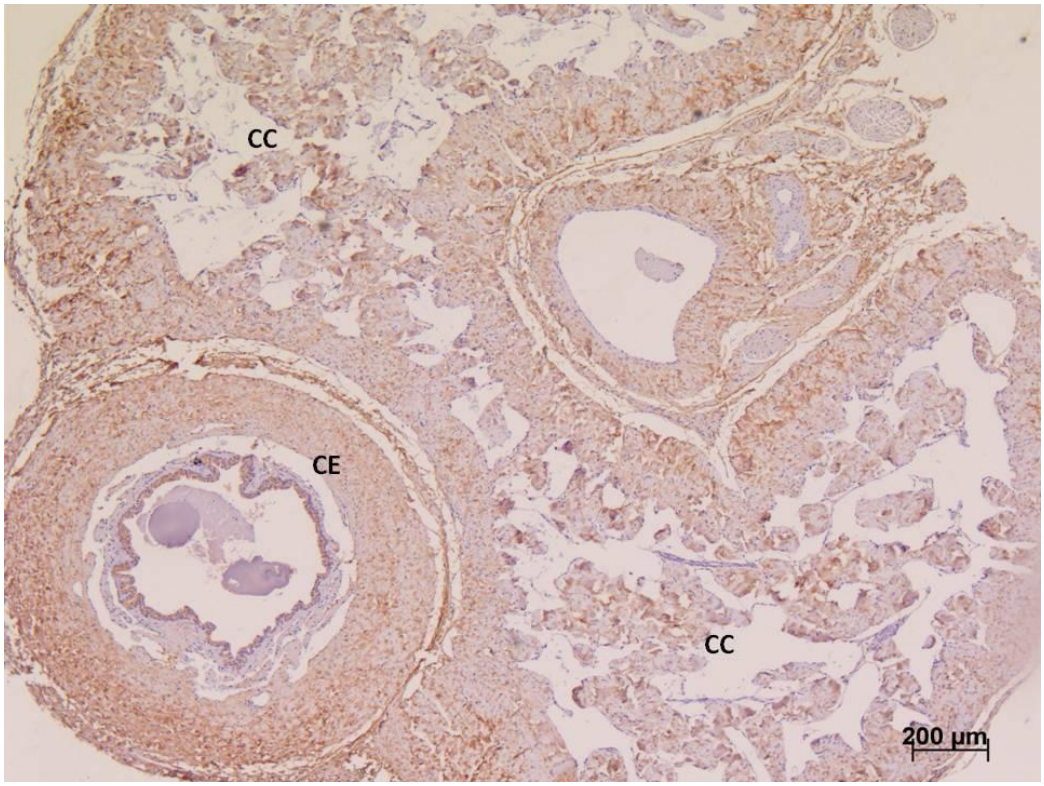

Figura 6. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD. Observar marcação difusa no tecido erétil, principalmente próximo à túnica albugínea. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

Nos animais do grupo diabético + alcoolizado (GD+A), também foi observada alta expressão proteica de ET_A e ET_B com padrão de marcação positiva difusa no tecido erétil dos corpos cavernosos quando comparado ao grupo controle.

Da mesma forma: a marcação positiva para ET_A foi mais intensa e homogênea no tecido erétil, com marcação por cruzes igual a 3x (Figura 7) e a marcação positiva para ET_B foi maior na região periférica dos corpos cavernosos, principalmente próxima à túnica albugínea e na túnica albugínea, com marcação por cruzes igual a 2x (Figura 8).

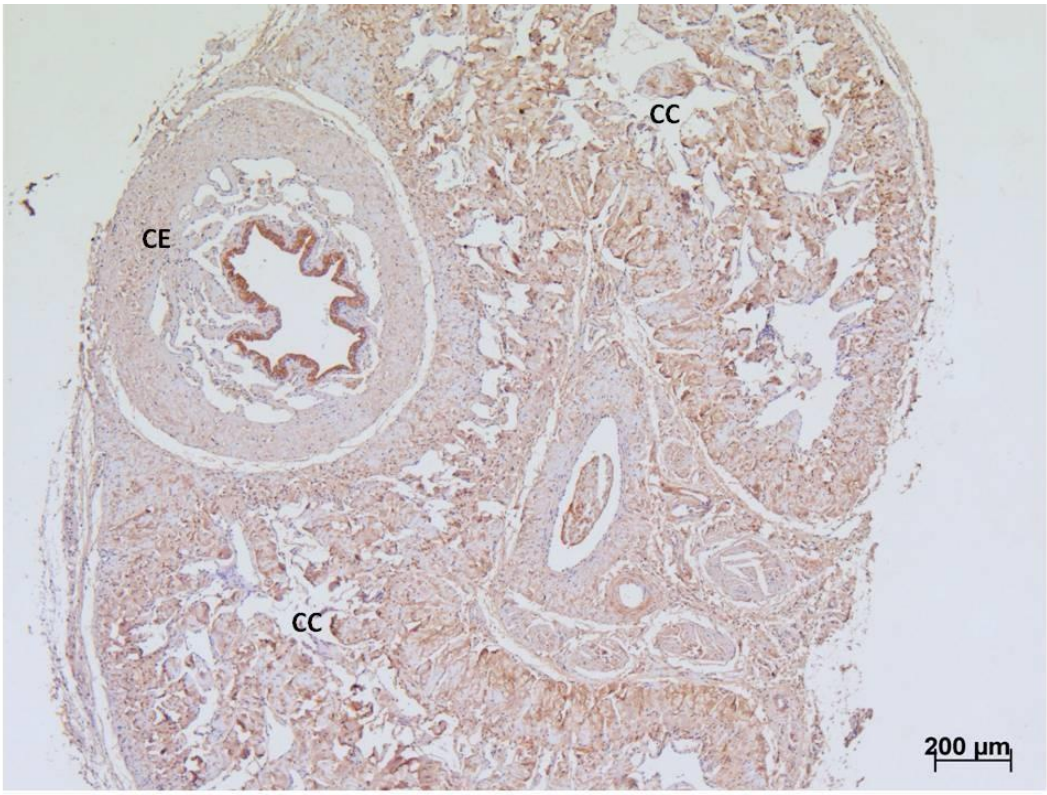

Figura 7. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_A em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Observar forte e difusa marcação no tecido erétil. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50x.

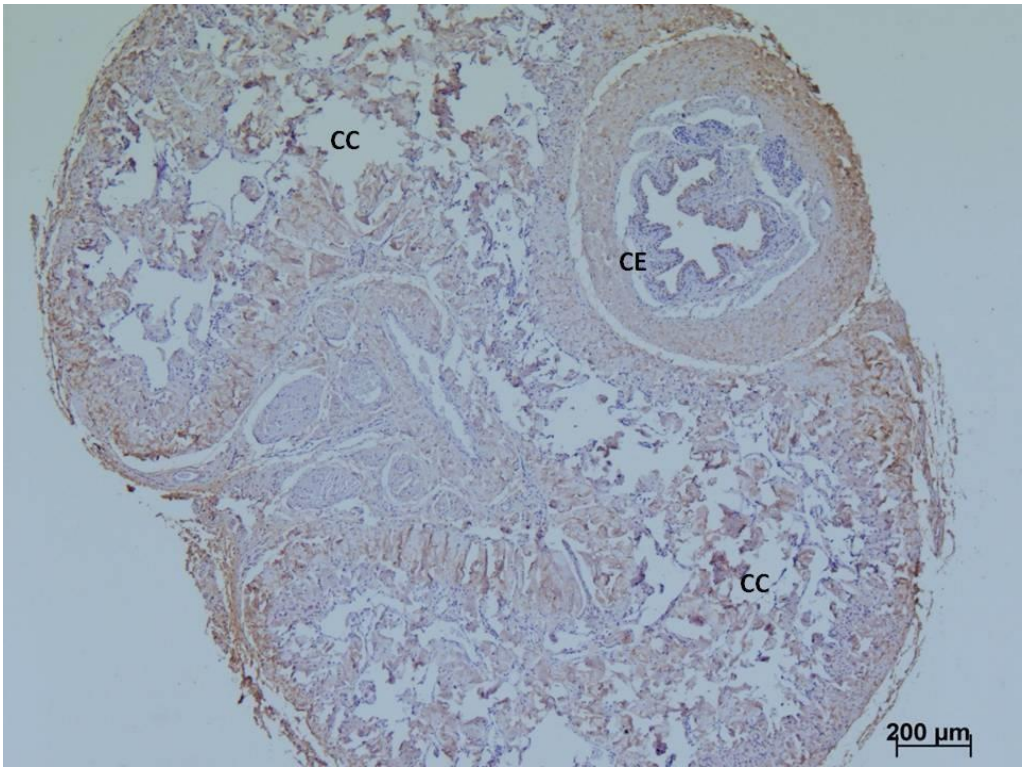

Figura 8. Fotomicrografia da expressão global da proteína ET_B em corte transversal dos corpos cavernosos de rato do GD+A. Notar marcação difusa no tecido erétil, principalmente próximo à túnica albugínea. Corpo cavernoso (CC); corpo esponjoso (CE).50

Chama a atenção para o estudo da expressão de ET_B o fato de sua marcação positiva ter sido mais intensa na periferia dos corpos cavernosos e na sua transição com a túnica albugínea.

A expressão proteica das duas proteínas estudadas foi pouco maior nos corpos cavernosos dos animais do GD quando comparado ao GA e muito semelhante nestes dois grupos quando comparado ao GD+A. Neste último grupo, a expressão de ET_A foi maior (Figura 9).

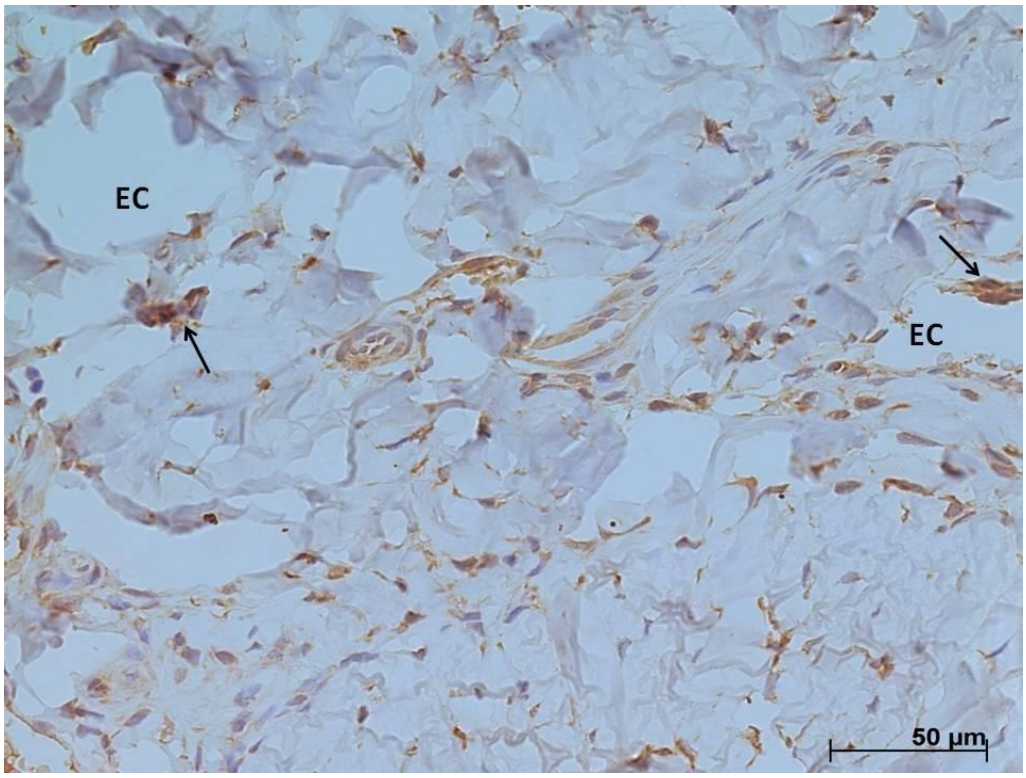

Figura 9. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_A no tecido cavernoso de um animal do GD+A. Observar espaços cavernosos (EC) e marcações positivas (setas). 400x.

As figuras 10 e 11 mostram detalhes da marcação positiva para a expressão de ET_A e ET_B no tecido cavernoso nos grupos GD e GD+A.

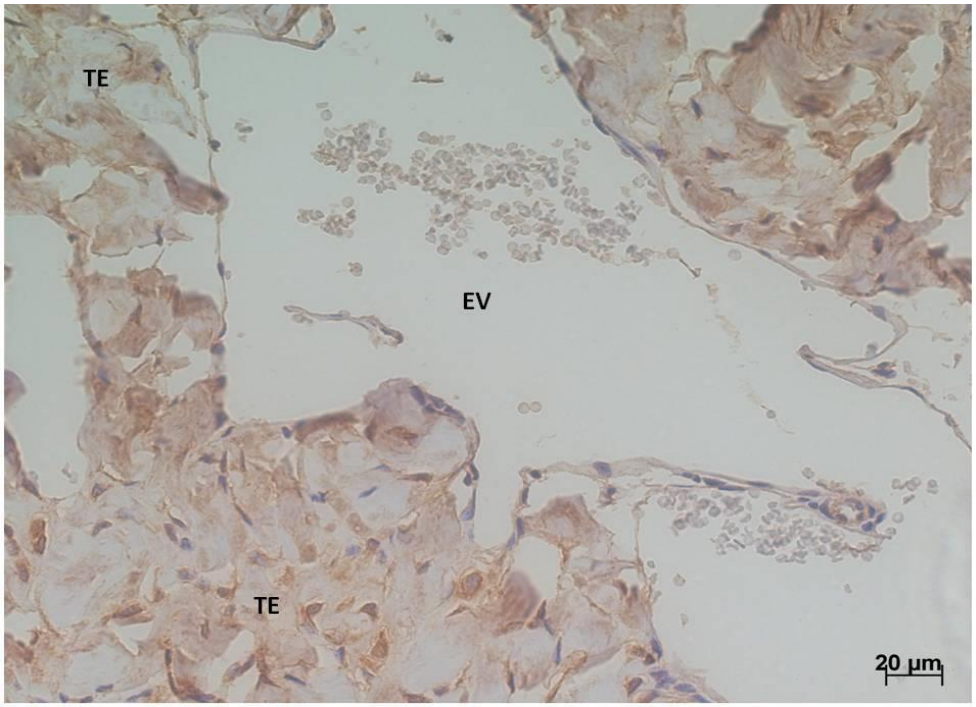

Figura 10. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_A no tecido cavernoso de um animal do GD. Observar um grande espaço vascular (EV) circundado pelo tecido cavernoso erétil (TE) com forte marcação. 400x.

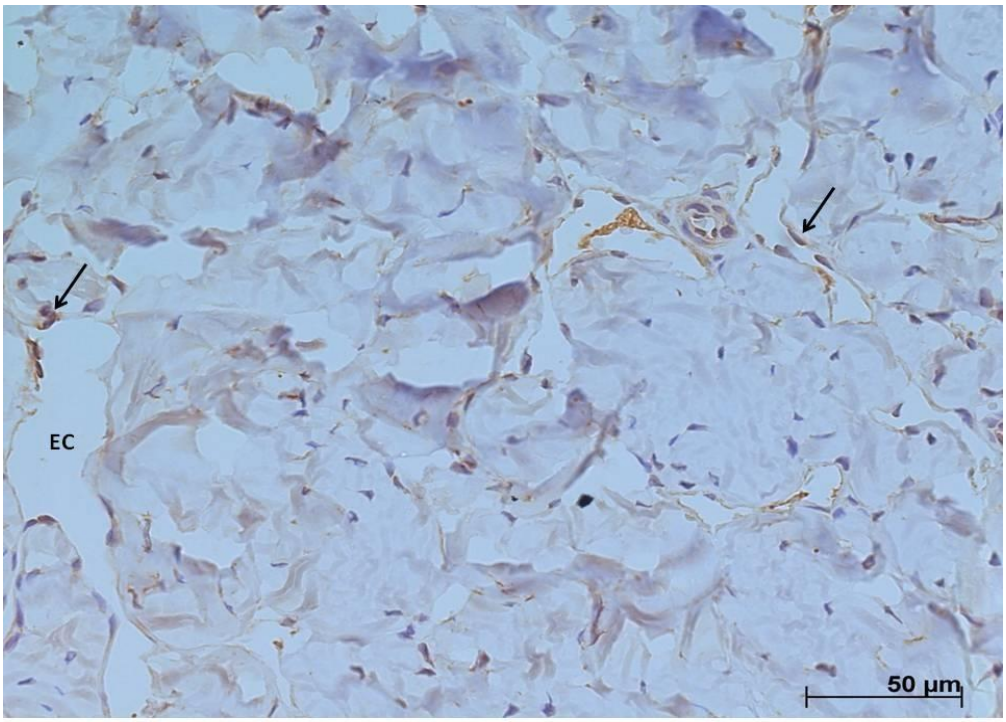

Figura 11. Detalhe da marcação positiva para a expressão de ET_B no tecido cavernoso de um animal do GD+A. Observar espaços cavernosos (EV) e marcações positivas (setas). 400x.

7. DISCUSSÃO

Utilizamos modelo experimental para alcoolismo crônico proposto por Tirapeli et al., 2001.[77] Acreditamos ser adequado o tempo total de sete semanas de seguimento dos quatro grupos, uma vez que, na literatura, existem trabalhos que utilizaram o mesmo período.[54,64,79] Outro aspecto relevante é que o aumento no tempo de seguimento acarretaria expressiva perda por morte dos animais em decorrência dos efeitos deletérios do alcoolismo e diabetes.

Existem poucas publicações utilizando modelo experimental de diabetes e alcoolismo para avaliar alterações no corpo cavernoso que poderiam estar relacionadas com DE, apesar do alcoolismo e do diabetes serem doenças bastante prevalentes em nosso meio.

O uso de modelos animais, principalmente com mamíferos de pequeno porte (ratos, camundongos e coelhos), é bastante útil para estudo da DE. O rato é o modelo mais utilizado pela facilidade financeira e de espaço, devido ao seu tamanho ser pouco maior que do camundongo, facilitando a instrumentação e por existirem modelos já bem estabelecidos para hipertensão, diabetes e alcoolismo crônico.[33,77]

A utilização do rato como modelo experimental associado à disfunção erétil e a ensaios de biologia molecular tem se destacado na literatura nas últimas décadas. Estudos atuais evidenciam as vias dos receptores de endotelina como importantes e promissores alvos para novos estudos relacionados com à DE, ao alcoolismo e ao diabetes.[80-82] Os receptores de ET_A são expressos nas células de músculo liso vascular e estão relacionados à vasoconstrição.[83] Entretanto, a ativação dos receptores ET_B endoteliais promove vasodilatação pela formação de NO[84] e liberação de prostaglandina[85]. A ação vasoconstritora da endotelina também pode estar relacionada com a ativação dos receptores ET_B localizados no musculo liso, que é relevante em certos leitos vasculares e dependente da espécie e tecido estudado.[63] Apesar da alta prevalência do alcoolismo e do diabetes, existem poucos estudos relacionando-os com alterações nos receptores de endotelina em tecido erétil peniano.

Propusemos o estudo para avaliar tais efeitos crônicos sobre os receptores de endotelina no tecido de corpos cavernosos de ratos induzidos experimentalmente ao diabetes e ao alcoolismo crônico. Encontramos por análise imunoistoquímica baixa expressão dos receptores de endotelina no grupo controle (GC) e alta expressão no grupo alcoolizado (GA), no grupo diabetes (GD) e no

grupo diabetes em associação com alcoolismo (GD+A). Não havendo diferença significativa entre estes dois últimos grupos, enquanto a expressão foi mais acentuada no grupo diabetes quando comparado com o grupo alcoolizado.

A distribuição dos receptores ET_A e ET_B não foi homogênea ou proporcional, enquanto os receptores de endotelina B concentravam-se na periferia dos corpos cavernosos e na sua transição com a túnica albugínea, os receptores de endotelina A estavam distribuídos de forma difusa e em maior concentração por todo corpo cavernoso, o que acreditamos que poderia determinar um maior efeito vasoconstritor da endotelina.

Análise imunoistoquímica realizada por Sullivan et al., em 1997, em coelhos diabéticos induzido por aloxano teve como resultado o aumento significativo de ET_B após 6 meses de diabetes e o aumento não significativo de ET_A difusamente pelos corpos cavernosos, na microvasculatura localizada na borda dos corpos cavernosos e na túnica albugínea.[62] Bell et al., em 1995 ao estudarem o efeito do diabetes induzido por *estreptozotocin* em corpos cavernosos de ratos, através de autoradiografia de alta resolução, demonstraram aumento de ET_A e ET-1 após 2 meses do início do diabetes.[86]

Existem estudos já bem estabelecidos que demonstraram aumento de concentração de endotelina-1 no sangue de homens impotentes,[80] bem como seu aumento em pacientes diabéticos[81] e em ratos submetidos ao consumo crônico de álcool,[82] o que demonstra, portanto, o envolvimento da via dos receptores de endotelina com as referidas doenças.

Leite et al., em 2013 realizaram estudo experimental utilizando ratos submetidos ao alcoolismo com modelo e tempo de exposição similares à nossa pesquisa.[64] Estes autores utilizaram a técnica de PCR em tempo real e não encontraram aumento na expressão gênica de ET_A ou ET_B, resultados estes semelhantes aos nossos. Também não encontramos alterações na expressão gênica nos GD e GD+A por esta técnica. Ainda sobre o estudo de Leite., em 2013, foi analisada a expressão proteica por *Western immunoblotting,* demonstrando aumento apenas de ET_A no grupo alcoolizado em relação ao grupo controle. Achados semelhantes entre nossos estudos demostram um maior aumento de ET_A em relação ao ET_B, pela análise imunoistoquímica, o que teria relevância para a fisiopatologia da DE associada ao alcoolismo, uma vez que ET_A possui ação vasoconstritora mais potente.

Não existem estudos prévios sobre os receptores de endotelina em indivíduos expostos aos efeitos associados do diabetes e alcoolismo crônico.

Lizarte et al. (2009 e 2010) investigaram o efeito do diabetes e do consumo crônico de etanol durante quatro semanas no relaxamento mediado pelo NO, na musculatura lisa dos corpos cavernosos de ratos. Pela análise imunoistoquímica e da expressão gênica por PCR em tempo real, foi observada alta expressão de eNOS e iNOS nas fibras musculares lisas dos ratos diabéticos e diabéticos associado ao consumo crônico de etanol, quando comparados aos animais controle. Isso demonstrou diminuição na capacidade de relaxamento induzido pela acetilcolina, na musculatura dos corpos cavernosos destes animais, via mecanismo endotélio dependente, sugerindo que o consumo crônico de etanol também induza disfunção endotelial.[54,79]

Outros fatores conhecidos de DE, como obesidade e hipertensão arterial, também possuem modelos bem estabelecidos, como por exemplo estudo realizado por Carneiro et al., 2008 em ratos submetidos à hipertensão arterial induzida por mineralocorticóides, que demonstrou que a resposta contrátil a ET-1 foi abolida por um antagonista do receptor ET_A, a administração de um antagonista ET_B não produziu nenhum efeito significante na ação vasoconstritora do ET-1, enquanto o uso de agonista ET_B provocou relaxamento e não vasoconstrição em microtiras de corpos cavernosos. Análise por *Western immunoblotting* encontrou aumento não significativo de ET_A e diminuição significativa de ET_B e eNOS.[87] Portanto, podemos sugerir que a fisiopatologia da DE na hipertensão arterial, como fator de risco, tem em relação aos receptores da endotelina ET_A, um perfil de expressão semelhante ao alcoolismo, uma vez que em ambos fatores de risco para disfunção erétil houve um aumento dos receptores ET_A que possuem maior efeito vasoconstritor.

Entretanto, em nossas análises por PCR em tempo real, apesar de não observarmos diferença estatística, o receptor de endotelina ET_B apresentou níveis de expressão maior. Podemos sugerir uma possível regulação de ET_B pelo miR-199 principalmente no GD+A, visto que o miR-199 apresentou diferença significativa neste grupo e padrão de expressão inverso de ET_B.

Os miRs são conhecidos por desempenhar um papel importante em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo carcinogênese, proliferação celular, hematopoiese, metabolismo, função imune e doenças epigenéticas e neurodegenerativas.[88]

Estudos utilizando rastreamento de alteração na expressão de microRNAs pelo álcool encontraram cerca de 2% de alteração (aumento ou diminuição). O mecanismo de alteração dos miRs ainda não foi totalmente compreendido.

Acredita-se que a redução nos níveis de metilação do DNA tenha relação com tal alteração.[73] Não encontramos na literatura trabalhos que relacionassem a expressão de miRs no tecido cavernoso peniano associado ao alcoolismo e diabetes.

Nossos principais resultados foram a hipoexpressão dos microRNAs miR-199 e miR-155, apesar de que apenas o miR-199 apresentou diferença estatística significativa no tecido cavernoso quando foram comparados os grupos experimentais com o grupo controle. Também encontramos, ao analisarmos amostras de sangue, hipoexpressão do miR-155 nos 3 grupos experimentais em relação ao grupo controle, sendo estatisticamente significativa apenas a do grupo diabetes em associação com alcoolismo. Análise do miR-199 demonstrou hipoexpressão significativa no grupo diabetes e no grupo diabetes em associação com alcoolismo, além de hipoexpressão não significativa no grupo alcoolizado, quando comparados ao grupo controle.

Yeligar et al. (2009) realizaram estudo, utilizando PCR em tempo real e *Western immunoblotting,* em cultura celular endotelial humana e endotelial hepática de ratos. Grupo controle foi comparado com grupo submetido ao alcoolismo por 9 semanas, enquanto as células da microvasculatura dérmica humana foram expostas durante 24 horas aos efeitos do álcool. Encontraram aumento de endotelina-1 e de seus receptores do tipo B como efeito à exposição alcoólica, correlacionaram que o controle da expressão da endotelina-1 é suprimida pelo miR-199 nas células endoteliais hepáticas de ratos e pelos miR-199 e miR-155 nas células endoteliais humanas, indicando assim que estes miRs podem funcionar como reguladores negativos do controle de transcrição da endotelina.[76] Comparando com os nossos resultados, também encontramos aumento dos receptores de endotelina à imunoistoquímica como efeito do álcool, do diabetes e de sua associação. Semelhantes resultados foram encontrados com a diminuição da expressão dos miR-199 nos corpos cavernosos dos ratos nos grupos alcoolizado e alcoolizado em associação com diabetes, dados estes que corroboram a hipótese de que o aumento da endotelina poderia ser determinado pela diminuição da ação supressora do miR-199 que se encontra hipoexpresso em decorrência dos efeitos deletérios do álcool.

Fichtlscherer et al. (2013) estudaram a expressão gênica plasmática de alguns microRNAs, sabidamente relacionados com endotélio e inflamação, utilizando-se PCR quantitativo em pacientes com doença coronariana estável, comparando-os a de voluntários saudáveis e encontrando hipoexpressão

significativa dos miR-199a e miR-155, sendo mais significativa nos indivíduos diabéticos e do sexo masculino. Comparando com nossos resultados, apesar de serem espécies diferentes, em ambos os estudos, o diabetes pôde ser relacionado com o decréscimo na expressão gênica destes microRNAs.[89]

O desenvolvimento continuado da genômica oferece novos diagnósticos e marcadores para doenças complexas como diabetes e alcoolismo, bem como para suas complicações. Estudos futuros *in vivo* poderão identificar e testar terapêuticas alvo moleculares para inúmeros agravos, entre eles a DE assim como suas possíveis associações com outras condições como, por exemplo, o alcoolismo e o diabetes. Estudos em larga escala também favorecerão uma identificação de novos microRNAs como alvos para serem abordados em estudos futuros.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos após análise do sangue e dos corpos cavernosos de ratos do grupo controle (GC), grupo alcoolizado (GA), grupo diabético (GD) e grupo diabético e alcoolizado (GD+A) permitiram as seguintes conclusões:

1. A expressão proteica de ET_A e ET_B por imunoistoquímica foi baixa no grupo controle e alta no grupo alcoolizado, no grupo diabetes e no grupo diabético e alcoolizado, não havendo diferença entre os GD e GD+A, enquanto a expressão foi mais acentuada no GD quando comparado ao GA;
2. A expressão proteica de ET_A e ET_B por imunoistoquímica não foi homogênea ou proporcional. Enquanto os receptores de endotelina B concentravam-se na periferia dos corpos cavernosos e na sua transição com a túnica albugínea, os receptores de endotelina A estavam distribuídos de forma difusa e em maior concentração por todo corpo cavernoso;
3. Não foi observada alteração estatisticamente significativa na expressão gênica de ET_A e ET_B entre os grupos estudados. Houve aumento não significativo de ET_A no GD e ET_B no GD+A em relação ao GC;
4. Foi observada no tecido cavernoso hipoexpressão gênica significativa do miR-199 no grupo GD+ A e hipoexpressão não significativa no GA e GD em relação ao GC; análise do miR-155 demonstrou hipoexpressão gênica não significativa dos grupos experimentais, quando comparados ao GC;
5. Foi observada no sangue hipoexpressão gênica significativa do miR-155 no GD+A e hipoexpressão não significativa nos demais grupos experimentais quando comparados ao GC. Análise do miR-199 demonstrou hipoexpressão significativa no GD e no GD+A, quando comparados ao GC, além de hipoexpressão não significativa no GA;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* Jul 7 1993;270(1):83-90.
2. Montorsi F, McDermott TE, Morgan R, et al. Efficacy and safety of fixed-dose oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction of various etiologies. *Urology.* May 1999;53(5):1011-1018.
3. Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *The Journal of urology.* Feb 2000;163(2):460-463.
4. Wespes E, Amar E, Hatzichristou D, Montorsi F, Pryor J, Vardi Y. Guidelines on erectile dysfunction. *European urology.* Jan 2002;41(1):1-5.
5. Lewis RW, Fugl-Meyer KS, Corona G, et al. Definitions/epidemiology/risk factors for sexual dysfunction. *J Sex Med.* Apr 2010;7(4 Pt 2):1598-1607.
6. IDF Diabetes Atlas, 5th. Update. *International Diabetes Federation*. Brussels, Belgium2012.
7. Wild S, Roglic G, Green A. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. May 2004;27(5):1047-1053.
8. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Diabetes and sexual dysfunction: current perspectives. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy.* 2014;7:95-105.
9. Galduroz JC, Carlini EA. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil--2001. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.].* Mar 2007;40(3):367-375.
10. Cheng JY, Ng EM, Chen RY, Ko JS. Alcohol consumption and erectile dysfunction: meta-analysis of population-based studies. *International journal of impotence research.* Jul-Aug 2007;19(4):343-352.
11. Moreira ED, Jr., Lbo CF, Diament A, Nicolosi A, Glasser DB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: results from a

population-based cohort study in Brazil. *Urology.* Feb 2003;61(2):431-436.

12. **Persu C, Cauni V, Gutue S, Albu ES, Jinga V, Geavlete P. Diagnosis and treatment of erectile dysfunction--a practical update. *Journal of medicine and life.* Oct-Dec 2009;2(4):394-400.**
13. **Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Terentes-Printzios D, Stefanadis C. The triad: erectile dysfunction--endothelial dysfunction--cardiovascular disease. *Current pharmaceutical design.* 2008;14(35):3700-3714.**
14. **Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, et al. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* Jun 23 2004;291(24):2978-2984.**
15. **Lue TF, Giuliano F, Montorsi F, et al. Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in men. *The journal of sexual medicine.* Jul 2004;1(1):6-23.**
16. **Wespes E, Wildschutz T, Roumeguere T, Schulman CC. The place of surgery for vascular impotence in the third millennium. *The Journal of urology.* Oct 2003;170(4 Pt 1):1284-1286.**
17. **Morales A, Heaton JP. Hormonal erectile dysfunction. Evaluation and management. *The Urologic clinics of North America.* May 2001;28(2):279-288.**
18. **Khera M, Crawford D, Morales A, Salonia A, Morgentaler A. A new era of testosterone and prostate cancer: from physiology to clinical implications. *European urology.* Jan 2014;65(1):115-123.**
19. **Hatzimouratidis K, Amar E, Eardley I, et al. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. *European urology.* May 2010;57(5):804-814.**
20. **Rendell MS, Rajfer J, Wicker PA, Smith MD. Sildenafil for treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: a randomized controlled trial. Sildenafil Diabetes Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* Feb 3 1999;281(5):421-426.**
21. **Kloner RA, Brown M, Prisant LM, Collins M. Effect of sildenafil in patients with erectile dysfunction taking antihypertensive therapy. Sildenafil Study Group. *American journal of hypertension.* Jan 2001;14(1):70-73.**

22. Chrysant SG, Chrysant GS. The pleiotropic effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on function and safety in patients with cardiovascular disease and hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.).* Sep 2012;14(9):644-649.
23. Porst H, Giuliano F, Glina S, et al. Evaluation of the efficacy and safety of once-a-day dosing of tadalafil 5mg and 10mg in the treatment of erectile dysfunction: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *European urology.* Aug 2006;50(2):351-359.
24. Rajfer J, Aliotta PJ, Steidle CP, Fitch WP, 3rd, Zhao Y, Yu A. Tadalafil dosed once a day in men with erectile dysfunction: a randomized, double-blind, placebo-controlled study in the US. *International journal of impotence research.* Jan-Feb 2007;19(1):95-103.
25. Hatzichristou D, Gambla M, Rubio-Aurioles E, et al. Efficacy of tadalafil once daily in men with diabetes mellitus and erectile dysfunction. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* Feb 2008;25(2):138-146.
26. Montorsi F, Brock G, Stolzenburg JU, et al. Effects of tadalafil treatment on erectile function recovery following bilateral nerve-sparing radical prostatectomy: a randomised placebo-controlled study (REACTT). *European urology.* Mar 2014;65(3):587-596.
27. Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Rokkas K, Stefanadis C. Cardiovascular effects of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *The journal of sexual medicine.* Mar 2009;6(3):658-674.
28. Vardi Y, Sprecher E, Gruenwald I. Logistic regression and survival analysis of 450 impotent patients treated with injection therapy: long-term dropout parameters. *The Journal of urology.* Feb 2000;163(2):467-470.
29. Hatzimouratidis K, Hatzichristou DG. A comparative review of the options for treatment of erectile dysfunction: which treatment for which patient? *Drugs.* 2005;65(12):1621-1650.
30. Porst H. The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience. *The Journal of urology.* Mar 1996;155(3):802-815.
31. Montague DK, Angermeier KW. Penile prosthesis implantation. *The Urologic clinics of North America.* May 2001;28(2):355-361

32. Kendirci M, Teloken PE, Champion HC, Hellstrom WJ, Bivalacqua TJ. Gene therapy for erectile dysfunction: fact or fiction? *European urology.* Dec 2006;50(6):1208-1222.
33. Williams JK, Andersson KE, Christ G. Animal models of erectile dysfunction (ED): potential utility of non-human primates as a model of atherosclerosis-induced vascular ED. *International journal of impotence research.* May-Jun 2012;24(3):91-100.
34. Lue TF. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. In: Wein AJ, ed. *Campbell-Walsh Urology.* Vol volume 1. 9th ed. Philadelphia2007:718-748.
35. Moore Kl. Pelve e o períneo. In: Lumpkin K, ed. *Anatomia Orientada para a Clínica.* Vol 1. Terceira Edição ed. Rio de Janeiro1994:216-287.
36. Eardley I. *Erectile dysfunction: current investigation and management.* 2nd ed. London 2003.
37. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Krane RJ. Local control of penile erection. Nerves, smooth muscle, and endothelium. *The Urologic clinics of North America.* Feb 1988;15(1):9-15.
38. Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacological reviews.* Sep 2001;53(3):417-450.
39. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science (New York, N.Y.).* Jul 17 1992;257(5068):401-403.
40. Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A. Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *British journal of pharmacology.* Oct 1990;101(2):375-381.
41. Andersson KE, Stief CG. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. *World journal of urology.* 1997;15(1):14-20.
42. Mills TM, Lewis RW, Stopper VS. Androgenic maintenance of inflow and veno-occlusion during erection in the rat. *Biology of reproduction.* Dec 1998;59(6):1413-1418.
43. Bortolotti A, Parazzini F, Colli E, Landoni M. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. *International journal of andrology.* Dec 1997;20(6):323-334.

44. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, et al. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovascular research.* Aug 15 1999;43(3):658-665.

45. Blanco R, Saenz de Tejada I, Goldstein I, Krane RJ, Wotiz HH, Cohen RA. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II. Acetylcholine synthesis. *The American journal of physiology.* Mar 1988;254(3 Pt 2):H468-472.

46. Azadzoi KM, Vlachiotis J, Pontari M, Siroky MB. Hemodynamics of penile erection: III. Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. *The Journal of urology.* Feb 1995;153(2):521-526.

47. Saenz de Tejada I, Moroukian P, Tessier J, Kim JJ, Goldstein I, Frohrib D. Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *The American journal of physiology.* May 1991;260(5 Pt 2):H1590-1595.

48. Gandaglia G, Briganti A, Jackson G, et al. A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *European urology.* May 2014;65(5):968-978.

49. Lima D. Da necessidade de uma nova abordagem-Parte II. *JBM.* 1997;Ver. Bras, Neurol.,33:171-172.

50. Pinsky I, Zaleski M, Laranjeira R, Caetano R. [First national survey on patterns of alcohol consumption in the Brazilian population]. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999).* Sep 2010;32(3):214-215.

51. Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB. A prospective study of risk factors for erectile dysfunction. *The Journal of urology.* Jul 2006;176(1):217-221.

52. Nicolosi A, Moreira ED, Jr., Shirai M, Bin Mohd Tambi MI, Glasser DB. Epidemiology of erectile dysfunction in four countries: cross-national study of the prevalence and correlates of erectile dysfunction. *Urology.* Jan 2003;61(1):201-206.

53. Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB. Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology.* Aug 1 2000;56(2):302-306.

54. Lizarte FS, Claudino MA, Tirapelli CR, et al. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. *Urology.* Dec 2009;74(6):1250-1256.

55. Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. In: Consultation W, ed1999.

56. Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *Journal of diabetes and its complications.* Mar-Apr 2000;14(2):108-115.

57. Morgan CL, Currie CJ, Stott NC, Smithers M, Butler CC, Peters JR. The prevalence of multiple diabetes-related complications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* Feb 2000;17(2):146-151.

58. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ (Clinical research ed.).* Aug 12 2000;321(7258):405-412.

59. Cirino G, Fusco F, Imbimbo C, Mirone V. Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacology & therapeutics.* Aug 2006;111(2):400-423.

60. Blanco R, Saenz de Tejada I, Goldstein I, Krane RJ, Wotiz HH, Cohen RA. Dysfunctional penile cholinergic nerves in diabetic impotent men. *The Journal of urology.* Aug 1990;144(2 Pt 1):278-280.

61. Wang T, Li M, Yuan H, et al. saRNA guided iNOS up-regulation improves erectile function of diabetic rats. *The Journal of urology.* Aug 2013;190(2):790-798.

62. Sullivan ME, Dashwood MR, Thompson CS, Muddle JR, Mikhailidis DP, Morgan RJ. Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetic rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *The Journal of urology.* Nov 1997;158(5):1966-1972.

63. Tirapelli CR. *Tese Doutorado: Consequências celulares e funcionais do consumo crônico do etanol sobre o sistema endotelial vascular*. Ribeirão Preto-SP: Departamento de Anatomia e Cirurgia, FMRP-USP; 2005.

64. Leite LN, Lacchini R, Carnio EC, et al. Ethanol consumption increases endothelin-1 expression and reactivity in the rat cavernosal smooth muscle. *Alcohol and alcoholism.* Nov-Dec 2013;48(6):657-666.

65. Kohan DE, Barton M. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. *Kidney international.* Nov 2014;86(5):896-904.
66. Nass D, Rosenwald S, Meiri E, et al. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. *Brain Pathol.* Jul 2009;19(3):375-383.
67. Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* Jan 2008;18(1):122-129.
68. Hammond SM. MicroRNAs as oncogenes. *Current opinion in genetics & development.* Feb 2006;16(1):4-9.
69. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* Dec 3 1993;75(5):843-854.
70. Kulshreshtha R, Ferracin M, Negrini M, Calin GA, Davuluri RV, Ivan M. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell cycle (Georgetown, Tex.).* Jun 15 2007;6(12):1426-1431.
71. Reis LO, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Ferreira U. MicroRNAs: a new paradigm on molecular urological oncology. *Urology.* Sep 2010;76(3):521-527.
72. Ma X, Ma C, Zheng X. MicroRNA-155 in the pathogenesis of atherosclerosis: a conflicting role?. *Heart, lung & circulation.* Oct 2013;22(10):811-818.
73. Miranda RC, Pietrzykowski AZ, Tang Y, et al. MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcoholism, clinical and experimental research.* Apr 2010;34(4):575-587.
74. Keshavarzian A, Farhadi A, Forsyth CB, et al. Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *Journal of hepatology.* Mar 2009;50(3):538-547.
75. McDaniel K, Herrera L, Zhou T, et al. The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *Journal of cellular and molecular medicine.* Feb 2014;18(2):197-207.
76. Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199.

Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950). Oct 15 2009;183(8):5232-5243.

77. Tirapeli LF. Morfometric analysis of seromucous acini and granular ducts of submandibular glands from rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev. Chil. Anat.* 2001 2001;19:263-269.

78. Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nature biotechnology.* May 2002;20(5):473-477.

79. Lizarte FS, Morgueti M, Tirapelli CR, et al. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. *BJU international.* Jun 2010;105(11):1592-1597.

80. El Melegy NT, Ali ME, Awad EM. Plasma levels of endothelin-1, angiotensin II, nitric oxide and prostaglandin E in the venous and cavernosal blood of patients with erectile dysfunction. *BJU international.* Nov 2005;96(7):1079-1086.

81. Schneider JG, Tilly N, Hierl T, et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *American journal of hypertension.* Nov 2002;15(11):967-972.

82. Tirapelli CR, Casolari DA, Montezano AC, et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* Aug 2006;318(2):819-827.

83. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochemical and biophysical research communications.* Apr 15 1992;184(1):100-106.

84. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *The Journal of clinical investigation.* Apr 1993;91(4):1367-1373.

85. Matsuda H, Beppu S, Ohmori F, Yamada M, Miyatake K. Involvement of cyclo-oxygenase-generated vasodilating eicosanoid(s) in addition to nitric oxide in endothelin-1-induced endothelium-dependent vasorelaxation in guinea pig aorta. *Heart and vessels.* 1993;8(3):121-127.

86. Bell CR, Sullivan ME, Dashwood MR, Muddle JR, Morgan RJ. The density and distribution of endothelin 1 and endothelin receptor

subtypes in normal and diabetic rat corpus cavernosum. *British journal of urology.* Aug 1995;76(2):203-207.

87. Carneiro FS, Nunes KP, Giachini FR, et al. Activation of the ET-1/ETA pathway contributes to erectile dysfunction associated with mineralocorticoid hypertension. *The journal of sexual medicine.* Dec 2008;5(12):2793-2807.

88. Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* Apr 2009;29(4):675-687.

89. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research.* Sep 3 2010;107(5):677-684.