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

RICARDO BRIANEZI TIRABOSCHI

Estudo da expressão dos MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em corpos cavernosos e sangue de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes mellitus

**Ribeirão Preto
2020**

RICARDO BRIANEZI TIRABOSCHI

Estudo da expressão dos MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em corpos cavernosos e sangue de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes mellitus

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

Área de Concentração: Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes Molina

Ribeirão Preto

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Tiraboschi, Ricardo Brianezi

Estudo da expressão dos MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em corpos cavernosos e sangue de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes mellitus. / Ricardo Brianezi Tiraboschi; Orientador, Carlos Augusto Fernandes Molina. Ribeirão Preto - 2020.

91p.: 16il., 30cm.

Tese (Doutorado) - Programa de Clínica Cirúrgica. Área de Concentração: Cirurgia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

1. MicroRNAs. 2. Diabetes Mellitus. 3. Experimental.
4. Alcoolismo. 5. Endotélio. 6. Disfunção Erétil. 7. Biomarcadores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Tiraboschi, Ricardo Brianezi

Título: Estudo da expressão dos MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em corpos cavernosos e sangue de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes mellitus.

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

Área de Concentração: Cirurgia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Dedicatória

*À Taciana
Aos nossos filhos Enzo e Henrique
Aos nossos pais e familiares*

Agradecimentos

À minha mãe, Zaida Batista Brianezi, pela vida dedicada à educação infantil, seu entusiasmo com o saber sempre me motivou, desde a mais tenra idade, à busca do conhecimento.

Ao meu pai, Roberto Tiraboschi, egresso da FMRP-USP, pelos fundamentos humanísticos e éticos muito além do exercício da medicina, fonte de inspiração constante.

Ao Prof. Dr. Silvio Tucci Júnior, pela oportunidade concedida em retornar a FMRP-USP para a realização da pós-graduação, pelos ensinamentos e pela referência contínua durante toda minha carreira urológica.

Ao Prof Dr Carlos Augusto Fernandes Molina pela orientação segura e assertiva, por todo apoio e disponibilidade, pelos laços de amizade e respeito de longa data, certamente fortalecidos por este convívio.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira Martins, Prof. Dr. Adauto José Cologna e Prof. Dr. Haylton Jorge Suaid, mestres no ensinamento da urologia, minha eterna gratidão.

Ao Prof Dr Rodolfo Borges dos Reis, pela receptividade na Divisão de Urologia durante a pós-graduação e pela valorosa contribuição durante minha formação urológica.

À Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, pelo acolhimento e pelos ensinamentos no Laboratório de Biologia Molecular durante toda esta jornada.

Ao Dr. Fermino Sanches Lizarte Neto, pela ajuda e auxílio técnico no laboratório, sempre solícito em responder às numerosas dúvidas durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José de Bessa Júnior, pelo incentivo e auxílio permanentes, por sempre acreditar e propagar o pensamento científico, pela amizade e confiança em todos os momentos.

Aos Dr Edson Luiz Paschoalin, Dr Sylvio Quadros Mercês Junior, Dr Victor Pereira Paschoalin e Dr Lucas Borba Ferreira de Souza, pelo apoio e convívio, por compartilhar a carreira pautada no exercício ético e profissional da medicina.

Ao Dr. Andre Luis Alonso Domingos, parceiro e amigo de residência urológica, pelo contínuo encorajamento. Nossos laços de amizade e fraternidade seguem fortes ao longo de todos esses anos.

À Dra. Fernanda Leonel Nunes, companheira de pós-graduação, além dos laços familiares, a oportunidade do convívio foi um bálsamo durante nossa jornada.

Ao Dr. João Paulo da Cunha, pelo apoio e estímulo constantes, pela afinidade profissional e amizade sincera fortalecida ainda mais durante esse trabalho.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia.

A Sra. Maria Cecília Onofre, pelo valoroso suporte e auxílio com a editoração deste trabalho.

À Sra. Juliana Pischiottin da Silva Moraes e a todos os funcionários da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, pela atenção dispensada nos momentos necessários.

Apoio Financeiro

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta
pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização
desta pesquisa.

Resumo

Tiraboschi, RB. **Estudo da expressão dos MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em corpos cavernosos e sangue de ratos submetidos ao alcoolismo e diabetes mellitus.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2020.

Introdução: Os microRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenos RNAs não codificadores, envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos. A desregulação de sua expressão pode estar ligada a diversas doenças, inclusive disfunção erétil (DE). A DE é considerada forte preditor de eventos vasculares cardíacos e cerebrais, possivelmente pelo vínculo endotelial presente na patogênese dessas doenças. O diabetes mellitus (DM) representa ameaça para o endotélio vascular e forte associação com doenças cardiovasculares. O alcoolismo é também doença de alta prevalência, exerce possível ação deletéria ao endotélio vascular e impacta negativamente na evolução do DM. A importância epigenética dos MiRNA associada à estabilidade plasmática vem sendo explorada como terapia alvo molecular e potenciais biomarcadores. **Objetivos:** Avaliar a expressão de cinco miRNA (miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222) no corpo cavernoso e no sangue periférico na busca de um potencial biomarcador para lesão endotelial vascular. **Materiais e Métodos:** Modelo animal de ratos diabéticos e/ou alcoolizados randomizados em quatro grupos: Controle (C), Alcoolizado (A), Diabético (D) e Diabético/Alcoolizado (D+A). Após sete semanas, a expressão gênica dos miRNAs isolados do corpo cavernoso e o sangue foram avaliados por PCR em tempo real. A presença de lesão funcional dos corpos cavernosos foi validada por meio de estudo farmacológico de relaxamento endotélio-dependente pela acetilcolina. **Resultados:** Observou-se hipoexpressão dos miRNAs no corpo cavernoso, sendo três (miR-16, miR-221 e miR-222) com significância estatística no grupo DA em relação ao C. No sangue foi encontrada hipoexpressão dos cinco miRNAs, estatisticamente significativa nos grupos D e DA em relação ao C. O relaxamento endotélio-dependente dos corpo cavernoso induzido pela acetilcolina foi significativamente reduzido nos grupos A, D e AD em relação ao grupo C. A curva ROC demonstrou acurácia diagnóstica para o sangue em discriminar os grupos A, D e DA com área sob a curva >0,9 para todos os miRNAs. **Conclusões:** A hipoexpressão dos miRNAs, apresentada no corpo cavernoso, foi confirmada no sangue. Os grupos de ratos D e D+A, com maior potencial para lesão endotelial, apresentaram hipoexpressão com significância estatística, que foi mais acentuada no grupo DA, talvez por efeito aditivo do álcool ao diabetes. Elevada acurácia diagnóstica demonstrada pelos miRNAs no sangue pode ser um indício do caminho para um biomarcador de lesão endotelial em doenças com este potencial.

Palavras Chaves: MicroRNAs. Diabetes mellitus. Alcoolismo. Endotélio. Disfunção erétil. Biomarcadores.

Abstract

Tiraboschi, RB. **Expression of MicroRNAs miR-15 b, miR-16, miR-138, miR-221 and miR-222 in corpus cavernosum and blood of rats submitted to alcoholism and diabetes mellitus.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2020.

Introduction: MicroRNAs (miRNAs) are a group of small, non-coding RNAs involved in the regulation of a variety of physiological processes. The deregulation of its expression can be linked to several diseases, including Erectile Dysfunction (ED). ED is considered a strong predictor of cardiac and brain vascular events, possibly due to the endothelial link in the pathogenesis of these diseases. Diabetes mellitus (DM) is a threat to vascular endothelium and strongly associated with cardiovascular diseases. Alcoholism is also a highly prevalent disease, possibly deleterious to vascular endothelium and it negatively impacts the evolution of DM. The epigenetic importance of MiRNA associated with plasma stability has been explored as a target molecular therapy and potential biomarkers. **Objectives:** To evaluate the expression of 5 miRNA (miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 and miR-222) in the corpora cavernosa and in peripheral blood searching for a potential biomarker for vascular endothelial injury. **Materials and Methods:** Animal models of diabetic and / or alcoholic rats randomized into 4 groups: Control (C), Alcoholic (A), Diabetic (D) and Diabetic / Alcoholic (D+A). After 7 weeks the miRNAs gene expression from the corpora cavernosa and blood were evaluated by real-time PCR. The cavernous body functional's lesion was validated through an acetylcholine endothelium-dependent relaxation pharmacological study. **Results:** Three miRNAs (miR-16, miR-221 and miR-222) downregulation in the corpora cavernosa in AD group. All 5 miRNAs downregulation in blood, in D and D+A groups. Proper diagnostic accuracy in ROC curve for discriminating groups A, D and AD from blood samples, area under the curve >0.9 for all miRNAs. **Conclusions:** miRNAs downregulation shown in corpora cavernosa was confirmed in blood samples. D and D+A groups, the ones with greater endothelial injury potentials showed noteworthy downregulation. It was more notable in the AD group, perhaps due to the additive alcohol effect on diabetes. High diagnostic accuracy demonstrated by miRNAs in the blood may be a clue on the way to find an endothelial injury biomarker.

Keywords: MicroRNAs. Diabetes mellitus. Alcoholism. Endothelium. Erectile dysfunction. Biomarkers.

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Representação da mediana [intervalo interquartil] dos pesos em gramas dos animais entre os grupos: Controle (C), Alcoolizado (A), Diabético (D) e Diabético alcoolizado (D+A). Houve diferença significativa nos grupos A, D e D+A comparados ao C ($p < 0,001$). (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn)	50
Gráfico 2 -	Representação da mediana [intervalo interquartil] dos valores(g/dl) das glicemias séricas dos animais entre os grupos: C, A, D e D+A. Houve diferença significativa nos grupos D e D+A comparados com C ($p < 0,001$). (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn)	51
Gráfico 3 -	Relaxamento induzido pela Acetilcolina (0.01-1000 $\mu\text{mol/L}$) em tiras de musculatura lisa do corpo cavernoso pré-contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$). As respostas máximas foram significativamente reduzidas nos grupos A, D e D+A, em comparação aos ratos do grupo C ($p < 0,01$ - teste de Kruskal-Wallis e $*p < 0,05$ - pós-teste de Dunn)	52
Gráfico 4 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-15b no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,051$ - teste de Kruskal-Wallis)	53
Gráfico 5 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-16 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p = 0,045$ - teste de Kruskal-Wallis e $p < 0,05$ pós-teste de Dunn), destacado com estrela	54
Gráfico 6 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-138 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,158$ - teste de Kruskal-Wallis)	55
Gráfico 7 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-221 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p = 0,044$ - teste de Kruskal-Wallis e $p < 0,05$ - pós-teste de Dunn), destacado com estrela	56
Gráfico 8 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-222 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p = 0,035$ - teste de Kruskal-Wallis e $p < 0,05$ - pós-teste de Dunn), destacado com estrela	57

Gráfico 9 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-15b no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,037$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela.....	58
Gráfico 10 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-16 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,021$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela.....	59
Gráfico 11 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-138 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,002$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela.....	60
Gráfico 12 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-221 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,001$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela.....	61
Gráfico 13 -	Valores relativos da expressão gênica do microRNA-222 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,001$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela.....	62
Gráfico 14 -	Valores relativos da expressão gênica dos microRNAs no corpo cavernoso . As barras representam a expressão mediana relativa do microRNA. Destacados com estrela, grupos com diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p<0,05$)	63
Gráfico 15 -	Valores relativos da expressão gênica dos microRNAs no sangue . As barras representam a expressão mediana relativa do microRNA. Destacados com estrela, grupos com diferença significativa em relação ao grupo C (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p<0,05$)	64
Gráfico 16 -	Curvas ROC e AUC (área abaixo da curva) para os miRNA miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 ($p<0.001$)	65

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACh-	Acetilcolina
AKT3-	Proteína quinase serina/treonina 3
AUA-	<i>American Urological Association</i>
AUC-	<i>Area Under the Curve</i>
bFGF-	Fator de crescimento fibroblástico básico
Ca²⁺-	Cálcio
cDNA-	Ácido desoxidorribonucleico complementar
cGMP-	Monofosfato cíclico de guanosina
CO₂-	Dióxido de carbono
CT-	Ciclo <i>threshold</i>
DE-	Disfunção erétil
DEPC-	Dietil pirocarbonato
DM-	Diabetes mellitus
DNA-	Ácido desoxidorribonucléico
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS-	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ET-1-	Endotelina-1
ET-2-	Endotelina-2
ETA-	Receptor de endotelina A
ETB-	Receptor de endotelina B
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Grupo A-	Grupo alcoolizado
Grupo C-	Grupo controle
Grupo D-	Grupo diabético

Grupo D+A-	Grupo diabético e alcoolizado
GnRH-	Hormônio liberador de gonadotrofina
HAS-	Hipertensão arterial sistêmica
IGF-1-	Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo I
iNOS-	Enzima óxido nítrico sintase induzível
Kg-	Quilograma
L-	Litro
LH-	Hormônio luteizante
mRNA-	RNA mensageiro
miR-	MicroRNA
miRNA-	MicroRNA
n-	Tamanho da amostra
NA-	Noradrenalina
NANC-	Não adrenérgico e não colinérgico
ncRNAs-	Ácido ribonucleico não codificante
ng-	Nanograma
NIH-	<i>National Institute of Health</i>
NOS-	Óxido nítrico sintase
nNOS-	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
MG-	Miligrama
ug-	Micrograma
uL-	Microlitro
ml -	Mililitro
NADPH-	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>

NO-	Óxido nítrico
NOS-	Óxido nítrico sintase
O2-	Molécula de oxigênio
PCR-	Reação em cadeia polimerase
PDE5-	Inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5
PhE-	Fenilefrina
PIK3CA-	Fosfatidilinositol 3 quinases catalítica
qRT-PCR-	Reação em Cadeia Polimerase quantitativa em tempo real
ROC-	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RNA-	Ácido ribonucleico
RPM-	Rotações por minuto
S100A-1-	Proteína ligadora de cálcio
TNF-	Fator de necrose tumoral
USP-	Universidade de São Paulo
VEGF-	Fator de crescimento endotelial vascular
°C-	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Mecanismos fisiológicos e anatomia da ereção peniana	24
2.2. Disfunção erétil	26
2.3. Disfunção erétil vasculogênica e fatores de risco cardiovasculares	29
2.4. Disfunção erétil e alcoolismo.....	30
2.5. Disfunção erétil e diabetes mellitus	31
2.6. MicroRNAs na disfunção erétil	31
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. OBJETIVOS.....	38
4.1. Objetivo geral	39
4.2. Objetivos específicos.....	39
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	40
5.1. Aspectos éticos	41
5.2. Características da amostra.....	41
5.3. Grupos experimentais	41
5.4. Seleção dos alvos	43
5.5. Estudo <i>in vitro</i> (Curva concentração-efeito do corpo cavernoso)	43
5.6. Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR)	44
5.6.1. Extração do RNA.....	45
5.6.2. Síntese de cDNA.....	46
5.6.3. Condições da reação de PCR em tempo real (qT-PCR).....	47
5.7. Análise estatística	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1. Curva concentração-efeito acetilcolina no corpo cavernoso	51
6.2. MicroRNAs no corpo cavernoso	52
6.3. MicroRNAs no sangue.....	57
6.4. Representações gráficas conjuntas dos MicroRNAs no corpo cavernoso e sangue	62
6.5. Curva ROC miRNA no sangue	64
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÕES	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10. ANEXO.....	87
11. APÊNDICES	89

1. *Introdução*

A ereção peniana envolve integração e coordenação de múltiplos sistemas regulatórios, incluindo psicológico, neurológico, endocrinológico, vascular e fatores do corpo cavernoso com destaque para o endotélio.^{1,2} A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter uma ereção adequada e satisfatória para o ato sexual³, que pode exercer impacto na qualidade de vida física e mental dos homens, especialmente, sendo doença comum acima de 40 anos.⁴ Atualmente, a DE também tem sido considerada como potencial sinalizador de doença cardiovascular, antecedendo o aparecimento de doença arterial coronariana e vascular periférica.^{5,6}

O diabetes mellitus (DM) é um dos maiores problemas de saúde no mundo, podendo levar a complicações devastadoras, entre elas a DE. Está associado a ampla variedade de condições cardiovasculares, representando a maior causa de morbimortalidade nesses pacientes. Em 2019, estimou-se mais de 400 milhões de adultos com a doença, com projeção de 700 milhões para 2045.⁷ Paralelamente, é conhecido que o risco relativo do diabético apresentar DE é três vezes maior que na população geral, aumenta com a idade e é mais elevado em diabéticos de difícil controle.⁸

O alcoolismo, semelhantemente ao DM, também é problema de alta prevalência mundial, e traz frequentes prejuízos para a saúde física e mental. Estudos sugerem que o consumo crônico de altas doses de etanol está associado a maior risco de DE.⁹ Interessantemente, outros estudos associam o alcoolismo à disfunção endotelial, alteração da capacidade de relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos, estresse oxidativo e liberação de mediadores inflamatórios.^{10,11}

Os miRNAs são cadeias curtas e não codificantes de RNA de 19 a 25 nucleotídeos, que emergiram nas últimas décadas como importantes reguladores da expressão gênica, podendo um único miRNA modular a expressão de centenas de genes.¹² Assim, a desregulação de sua expressão pode afetar múltiplos processos celulares e estar associada com diferentes doenças como câncer, diabetes, eventos cardiovasculares, inclusive, a DE.^{13,14} Estudos promissores chamam a atenção para seu potencial uso como biomarcador, podendo ser úteis para o diagnóstico e tratamento de doenças.¹⁵

Pesquisas prévias do grupo mostraram o possível envolvimento da expressão do miRNA 27 com a via óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) nos corpos cavernosos¹⁶; e a relação entre a expressão do miRNA-155 e miRNA-199 com apresentação dos receptores de endotelinas (ET) no modelo experimental de ratos submetidos ao alcoolismo, diabetes e sua associação.¹⁷ Os miRNA 15b, 16, 138, 221 e 222 apresentam conhecida expressão relacionada às células endoteliais e demonstrada importância na fisiologia vascular, angiogênese e remodelação vascular.¹⁸⁻²⁰ Assim, conhecendo a relevância da integridade estrutural para a fisiologia dos corpos cavernosos e consequente função erétil, a importância do diabetes e alcoolismo e sua possível associação com a lesão no corpo cavernoso, o potencial dos miRNAs atuarem como biomarcador de lesão estrutural/fisiológica, e aproveitando a experiência do grupo no modelo animal, foi proposto estudar o comportamento da expressão dos miRNAs 15b, 16, 138, 221 e 222 nos corpos cavernosos e sangue periférico, utilizando o modelo animal de ratos diabéticos e/ou alcoolizados, objetivando avaliar o potencial biomarcador em sangue periférico para lesão endotelial nos corpos cavernosos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Mecanismos fisiológicos e anatomia da ereção peniana

O pênis é constituído por dois corpos cavernosos pareados e o corpo esponjoso que envolve a uretra e se expande no sentido distal para formar a glândula, e no sentido proximal, os corpos cavernosos se divergem para formar a crura, a cada lado, ligada firmemente ao ramo ipsilateral do segmento isquiopúbico. Essas ligações, juntamente com o ligamento suspensor do pênis, que é fixado ao púbis, formam uma base, como um tripé, importante para o suporte do pênis ereto.²¹ Cada corpo cavernoso é envolvido por um tecido fibroso e compacto denominado túnica albugínea, constituída por fibras de colágeno e elastina, que confere grande flexibilidade, rigidez e resistência ao tecido peniano.^{21,22} O tecido erétil no interior dos corpos cavernosos consiste em múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por endotélio, além de trabéculas, compostas por bandas espessas de músculo liso, fibroblastos, colágeno e elastina, formando as paredes dos espaços sinusoides que são maiores no centro e menores na periferia.^{21,23}

O principal suprimento arterial para o pênis é através da artéria pudenda interna, uma ramificação da artéria ilíaca interna; que se divide em artéria bulbouretral, dorsal e cavernosa. A artéria bulbouretral irriga a uretra e glândula, já a artéria cavernosa penetra a túnica albugínea e adentra o corpo cavernoso dando origem a múltiplos ramos tortuosos, chamados de artérias helicinais, que se abrem diretamente no interior dos corpos cavernosos, nos espaços sinusoides. A artéria dorsal do pênis irriga estruturas superficiais no pênis e também emite ramos para o corpo cavernoso via artérias circunflexas ao longo do corpo peniano.^{24,25}

A drenagem venosa do pênis ocorre por três sistemas de veias: superficial, intermediário e profundo. O sistema superficial drena a pele e as estruturas externas, a fáscia de Buck. O sistema intermediário é constituído pela veia dorsal profunda e veias circunflexas, que drenam a glândula, parte distal dos corpos esponjosos e cavernosos. O sistema profundo drena a parte proximal dos corpos esponjosos e cavernosos. Todos esses sistemas se comunicam, formando o plexo retro púbico que drena para a veia pudenda interna.²¹

O pênis possui ampla inervação de fibras periféricas: simpáticas, parassimpáticas, sensoriais e motoras. As fibras simpáticas têm origem nos

segmentos T11 a L2 da medula espinhal, seguem através dos nervos lombares esplâncnicos, para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior, através do nervo hipogástrico, em direção ao plexo pélvico.²⁶ A via parassimpática tem origem em neurônios da medula espinhal nas porções intermediolateral da substância cinzenta nos níveis de S2 a S4. As fibras pré-ganglionares passam pelos nervos pélvicos para o plexo pélvico. As fibras simpáticas e parassimpáticas reúnem-se no plexo ganglionar pélvico de onde partem os nervos cavernosos.^{27,28} Após deixar o plexo pélvico, o nervo cavernoso segue entre o reto e a próstata, passa pelo diafragma urogenital, acompanhando a artéria pudenda interna e artéria cavernosa, atravessa a túnica albugínea e entra no corpo cavernoso.²⁹ O entendimento claro do trajeto do nervo cavernoso é importante para evitar a DE iatrogênica durante as cirurgias radicais de próstata, bexiga e reto.³⁰ A estimulação do parassimpático, ao longo dos nervos do corpo cavernoso, induz o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso levando à ereção. Por outro lado, a estimulação do nervo hipogástrico ou do tronco simpático induz a contração do corpo cavernoso levando à detumescência peniana. Portanto, a via parassimpática sacral está relacionada com a tumescência peniana, já a via simpática lombosacral relaciona-se com a detumescência peniana.³¹

A inervação somática do pênis é feita pelo nervo pudendo, que contém aferentes sensoriais e eferentes motores. O nervo dorsal do pênis é o ramo sensorial do nervo pudendo. As fibras sensoriais conduzem os impulsos sensitivos táteis, vibratórios, de pressão, térmicos e dolorosos. As fibras motoras inervam os músculos estriados do pênis, bulbo cavernoso e isqueocavernoso.³²

A musculatura lisa do pênis recebe uma rica inervação simpática, sendo as fibras adrenérgicas responsáveis pela detumescência do pênis ereto e contribuição para manutenção do estado flácido.³³ O estímulo adrenérgico causa contração da musculatura lisa do corpo cavernoso e vasoconstrição arterial, que leva à redução do influxo arterial e ao colapso dos espaços lacunares, permitindo a descompressão das vênulas subtúnicas e drenagem venosa do corpo peniano.^{24,34}

A ereção ocorre como resultado do aumento da pressão nos corpos cavernosos, atingindo pressão equivalente à pressão arterial média. A expansão limitada da túnica albugínea é crucial para o desenvolvimento de uma pressão

intracavernosa aumentada. A alta pressão intracavernosa traduz-se em rigidez peniana.²¹

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).³⁵

O óxido nítrico (NO), que é liberado pelo endotélio e durante a neurotransmissão NANC, é o neurotransmissor primordial envolvido na ereção, embora outros neurotransmissores também possam estar envolvidos.³⁶ O NO ativa a guanilil ciclase no músculo liso, que aumenta a concentração celular do monofosfato cíclico de guanosina (GMP cíclico). O GMP cíclico, por sua vez, ativa uma proteína quinase específica, que fosforila certas proteínas e canais iônicos, resultando em abertura de canais de potássio e hiperpolarização da membrana da célula muscular, sequestro do cálcio intracelular pelo retículo endoplasmático e bloqueio do influxo de cálcio pela inibição dos canais de cálcio. A consequência desta cascata é uma queda nas concentrações do cálcio citosólico e relaxamento do músculo liso. Durante o retorno ao estado flácido, o GMP cíclico é hidrolisado em GMP pela fosfodiesterase tipo 5. Outras fosfodiesterases também são encontradas nos corpos cavernosos, mas elas parecem não ter papel importante na ereção.³⁶ O relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso permite a expansão dos espaços lacunares em resposta ao aumento do fluxo arterial. Esta expansão leva à compressão das veias subtúnicas e diminuição do retorno venoso. Assim, a pressão aumenta no interior dos corpos cavernosos levando à ereção.

2.2 Disfunção erétil

A DE, de acordo com a definição do NIH e da AUA, é a incapacidade de alcançar ou manter uma ereção adequada para a satisfação sexual.^{3,37}

Desde tempos remotos a DE aflige o homem causando transtornos, tanto na esfera física como emocional. Os registros mais antigos datam de 2000 AC, pelos egípcios, que a creditavam a duas possibilidades: natural, na qual o homem era incapaz de realizar o ato sexual ou sobrenatural, atribuindo sua etiologia a feitiços e encantos. Ainda na perspectiva histórica, Hipócrates referiu que a DE poderia estar

ligada ao excesso de cavalgadas e, segundo Aristóteles, a ereção seria produzida pelo influxo de ar. Leonardo da Vinci descreveu em seus estudos uma grande quantidade de sangue no pênis ereto de homens enforcados, mas seus escritos foram mantidos em segredo até o início do século 20. No século 16, Ambroise Paré trouxe importantes conhecimentos em relação à anatomia peniana e o conceito de ereção; em sua precisa descrição, o pênis era composto de nervos, veias, artérias, dois ligamentos (corpos cavernosos), quatro músculos e um trato urinário. Ainda segundo Paré, o fluxo sanguíneo causaria a ereção. A importância do sangue retido no pênis para a ereção foi destacada por Dionis em 1718 e por Hunter em 1787 que formulou que o espasmo venoso impedia a saída do sangue peniano.³⁸

A DE está entre as doenças crônicas mais comuns em homens acima dos 40 anos.⁴ A prevalência e gravidade desta patologia aumentam com a idade, afetando 25%, 55% e 65% dos homens na faixa dos 65, 75 e 80 anos, respectivamente.³⁹ A probabilidade de homens na faixa dos 50 anos enfrentarem problemas de ereção é três vezes maior que na faixa dos 20 anos.⁴⁰ Existe projeção para 2025 de prevalência de 322 milhões de homens com DE.⁴¹ Claramente, a DE é, atualmente, considerada um grande problema de saúde, com impacto crescente na qualidade de vida para uma população masculina que se encontra em franco processo de envelhecimento no planeta.

Muitos estudos, longitudinais e transversais, sugerem alta prevalência de DE na população geral. Estudo multicêntrico envolvendo mais de 20 mil homens, com idade entre 20 e 75 anos, realizado em oito países, incluindo o Brasil, relatou prevalência geral de DE de 16%. Entre os mais jovens, faixa etária de 20 a 30 anos, encontrou-se prevalência de 8%, que chegou a 37% entre os mais idosos, faixa etária de 70 a 75 anos.⁴²

A DE pode ser classificada em psicogênica, orgânica ou mista (psicogênica e orgânica), sendo esta última considerada a mais comum.

Fatores psicológicos estão envolvidos em número significativo de casos de DE, tanto de forma isolada como combinada a causas orgânicas. Um fator psicogênico importante relacionado com a DE é a ansiedade na performance e o medo de “falha” durante o intercursos sexual.⁴³ Teorias sobre a origem psicológica têm relacionado a DE a múltiplos fatores, incluindo cognitivos, afetivos,

interpessoais, que podem predispor o homem à disfunção sexual, assim como diferenças sexuais e religiosas. A DE psicogênica relaciona-se a fatores predisponentes como: experiências traumáticas do passado, educação sexual inadequada, problemas de saúde mental (depressão, esquizofrenia e fatores precipitantes: problemas agudos de relacionamento, pressão social ou familiar, grandes eventos da vida (gravidez, nascimento de filhos, perda emprego).³⁶ Estudos mostram forte relação entre depressão e DE.^{44,45}

A etiologia orgânica de DE incluem as causas neurogênicas, hormonais, vasculogênicas e ainda induzidas por drogas como antidepressivos, certos anti-hipertensivos, antiandrogênicos e drogas ilícitas.⁴⁶

As doenças neurológicas estão frequentemente associadas à DE incluindo, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, lesões medulares, esclerose múltipla, epilepsia do lobo temporal. Pacientes submetidos a cirurgias pélvicas radicais tem especial risco de lesão do nervo cavernoso e, conseqüentemente, desenvolver DE neurogênica no pós-operatório, embora o avanço recente das técnicas cirúrgicas tenha, significativamente, contribuído para redução desta complicação.⁴⁷

Em relação às causas hormonais, os androgênios têm função importante relacionada com o desejo sexual, mas têm efeito limitado na ereção induzida pelo estímulo visual. A testosterona é importante na regulação das vias óxido nítrico sintase (NOS) e PDE5 (Inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5) nos corpos cavernosos. A deficiência de testosterona tem sido associada com morbidade e mortalidade cardiovascular⁴⁸ por causas multifatoriais, envolvendo não somente fatores hormonais como também metabólicos e imunológicos.⁴⁹ A obesidade tem sido apontada como a principal responsável, é a principal preditora isolada de hipogonadismo. A obesidade e especialmente o acúmulo de gordura visceral, age como fonte de inflamação e resistência à insulina, liberando citocinas inflamatórias e aterogênicas⁴⁹ que promovem disfunção secundária do eixo hipotálamo-hipófise e baixos níveis de testosterona.⁵⁰ A hiperprolactinemia leva à disfunção sexual, relacionada a baixos níveis de testosterona. Altos níveis de prolactina levam à inibição do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que, por sua vez, induz diminuição dos níveis de hormônio luteizante (LH), responsável pela secreção de

testosterona. Essa disfunção do GnRH está relacionada a várias outras doenças crônicas, como o próprio diabetes e a obesidade, que também cursam com diminuição da testosterona.⁵¹ Existem estudos na literatura mostrando que o DM tipo 2 e a obesidade podem ser fatores de risco independentes para baixos níveis de testosterona e, ainda, a presença das duas condições pode ter efeito aditivo no desenvolvimento do hipogonadismo.⁵²

Finalizando as causas orgânicas, tem-se a etiologia vascular com suas particularidades inerentes e objeto deste estudo.

2.3 Disfunção erétil vasculogênica e fatores de risco cardiovasculares

O pênis pode ser considerado um grande vaso sanguíneo, portanto qualquer condição que aumente o risco de doença vascular pode aumentar o risco de DE. A perda da integridade funcional do endotélio e subsequente disfunção endotelial desempenha papel integral na ocorrência da DE.⁵³ A disfunção endotelial é o denominador comum para muitos fatores de risco cardiovascular que podem levar a DE.⁵⁴ A disfunção endotelial e a baixa disponibilidade de óxido nítrico frequentemente subjazem doenças vasculares.⁵⁵ Destaca-se dentre esses fatores de risco: idade, DM, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia e obesidade. Estudos sugerem que a incidência e prevalência de DE em pacientes com HAS pode chegar a 68%.^{54,56} Existe melhora da DE associada com o tratamento da dislipidemia, seja por medidas dietéticas ou uso de estatinas.⁵⁷ Em homens obesos, a mudança de hábitos de vida, o engajamento em atividade física e perda de peso estão associados à melhora da DE em aproximadamente 1/3 dos pacientes. Este progresso está relacionado com melhora da função endotelial e dos marcadores sistêmicos de inflamação vascular.⁵⁸

A doença cardiovascular é a principal causa de mortalidade em todo mundo e 75% das mortes devido a doença cardiovascular ocorrem nos países de baixa e média renda.⁴⁸ É mais frequente e tem maior taxa de mortalidade em homens do que em mulheres. Neste cenário, a DE é, atualmente, reconhecida como forte preditor de doença cardiovascular e, em particular, doença arterial coronariana, podendo anteceder o aparecimento de doença cardiovascular em 2-3 anos.^{6,59}

Segundo a atual diretriz em DE da Associação Americana de Urologia de 2018 (American Urological Association) os homens devem ser orientados que a DE é um marcador de risco cardiovascular, e por esta forte correlação recomenda-se que todo paciente com DE submeta-se a ampla avaliação cardiovascular.³⁷

2.4 Disfunção erétil e alcoolismo

Um importante estudo realizado no Brasil, com participação de 2346 adultos, maiores de 18 anos, em todas as regiões do país, com a finalidade de mostrar o padrão de consumo de álcool, mostrou maior consumo nos últimos 12 meses que antecederam a pesquisa entre os homens comparados às mulheres, 65% e 41%, respectivamente. Entre os homens, 38% relataram uso de quantidades potencialmente prejudiciais, de cinco ou mais doses. O consumo em homens, solteiros e mais jovens, é usualmente mais frequente, em maior quantidade e associado a maior número de problemas. Em relação ao abuso e dependência, 19% dos homens entrevistados preencheram critérios considerados altos comparados a outros países.⁶⁰ Outro importante estudo, que avaliou a prevalência do uso de substâncias psicoativas e drogas, incluindo o álcool, na população brasileira, foi realizado em 2001 e 2005. A prevalência do consumo de álcool foi de 68,7% e 74,6%, em 2001 e 2005, respectivamente. A prevalência de dependência do álcool foi de 11,2% e 12,3%, em 2001 e 2005, respectivamente.^{61,62}

O uso crônico e de longo prazo de álcool afeta direta e indiretamente vários órgãos e sistemas no corpo humano. Não seria surpresa se esperar que também tenha potencial em impactar negativamente a função erétil. Estudos prévios correlacionaram etilismo crônico e DE.^{9,63} Porém, outros estudos com indivíduos com boa saúde não encontraram associação entre consumo de bebidas alcoólicas e DE.^{64,65} A associação direta entre consumo de álcool e DE permanece controversa visto que, muitos consumidores crônicos de grande quantidade de álcool tendem a ter outros problemas de saúde e comportamento conhecidos, que podem comprometer a função sexual, tornando difícil a tarefa de isolar a influência direta do álcool.⁹ No entanto, estudos experimentais com modelos animais submetidos

cronicamente ao álcool mostraram disfunção na contração e do relaxamento dos corpos cavernoso, sugerindo possível disfunção endotelial neste modelo.¹¹

2.5 Disfunção erétil e diabetes mellitus

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, produzindo profundas anormalidades no metabolismo, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As consequências do DM em longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos.⁶⁶

O DM é dividido em dois tipos: DM tipo I ou insulino-dependente e DM tipo II ou insulino-independente. Estudos demonstram que o DM tipo II, mais prevalente na população, é capaz de aumentar de duas a quatro vezes o risco de doenças cardiovasculares e complicações microvasculares como retinopatia e nefropatia.⁶⁷⁻⁶⁹

A incidência de DE em pacientes diabéticos é elevada quando comparada à população geral; isso parece estar relacionado ao fato do DM causar complicações vasculares e neurogênicas. Todavia, de acordo com alguns estudos, essas alterações podem ocorrer mesmo quando os níveis glicêmicos estão normais. Assim, os mecanismos pelos quais o DM causa DE vêm sendo intensamente estudados, sugerindo alguns autores que o NO e o estresse oxidativo desempenhem papel importante nesta doença.^{70,71}

2.6 MicroRNAs na disfunção erétil

Os microRNAs (miRNA) são RNAs não-codificantes (ncRNAs), constituídos por 19 a 25 nucleotídeos, que inicialmente são sintetizados como longas moléculas precursoras que passam por um processo de clivagem catalisado por enzimas ribonucleases, como Drosha e Dicer, antes de atingir suas formas maduras.⁷² A descoberta de miRNAs revelou um lado desconhecido da regulação gênica que é capaz de integrar múltiplos genes em redes biologicamente significativas.⁷³

Os miRNAs agem regulando a expressão gênica por reduzir os níveis transcritos de mRNA e/ou de proteínas traduzidas, e o espectro de alvos apenas

começaram a ser identificados. Muitos miRNAs são conservados entre organismos relacionados remotamente, o que sugere que estas moléculas são essenciais na regulação de diversos processos celulares, tais como: diferenciação, proliferação, apoptose e metabolismo. Dessa forma, a desregulação da expressão de miRNAs pode conduzir a uma série de desordens celulares.⁷⁴

Os miRNAs apresentam diferentes níveis de expressão e atuam de maneira específica nos diferentes tecidos. As ferramentas da bioinformática predizem centenas de RNAs mensageiros alvos para cada miRNA, sugerindo que muitos genes estão sujeitos à regulação mediada pelos miRNAs.⁷³ Coletivamente, os miRNAs que foram descobertos até agora têm o potencial de regular mais de 60% dos genes em nosso genoma.⁷³ Após sua identificação em décadas recentes, os miRNAs assumiram rapidamente o protagonismo como reguladores principais da expressão gênica. Sabe-se que os miRNAs atuam regulando uma grande diversidade de funções biológicas, desde desenvolvimento embriológico, células troncos, reprodução, metabolismo, passando pela morte celular programada e apoptose. Por outro lado, a expressão aumentada ou diminuída dos miRNA tem sido associada à grande diversidade de patologias: doenças cardiovasculares, autoimunes, neurológicas, diabetes, com grande destaque e participação em várias doenças oncológicas.⁷⁵⁻⁷⁷

Atualmente, ferramentas de bioinformática são utilizadas para identificar possíveis alvos dos miRNAs para um estudo a partir dos processos biológicos que estão envolvidos foram fundamentados na literatura. Os algoritmos de previsão de alvos de miRNAs, utilizados pelas ferramentas de bioinformática, com sofisticados programas de simulação computacional, são comprovadamente de grande valor para a elucidação das funções dos miRNAs. No entanto, mesmo os métodos computacionais mais avançados ainda exigem validação experimental, pois exibem alto número de falsos positivos.⁷⁸ Os miRNAs miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222, objetos deste estudo, foram fundamentados na literatura, nos processos biológicos que estão envolvidos e também na previsão de alvos de bioinformática.

Dada a amplitude de processos que os miRNAs são conhecidos por regular, é razoável esperar que eles desempenhem papel importante na mediação dos efeitos do etanol. Estudos utilizando screenings de larga escala de miRNAs revelaram que o

etanol alterou a expressão de 2-3% dos miRNAs em modelos murinos de etanol-induzindo esteatohepatite e lesão cerebral fetal.^{79,80} As mudanças observadas nos miRNAs foram igualmente divididas entre ser hiperegulados e hiporegulados. Embora o número absoluto de miRNAs sensíveis ao etanol seja aparentemente pequena, a capacidade de miRNAs individuais para controlar grande número de genes sugere que as mudanças de expressão de miRNAs serão ampliadas em nível celular e de sistemas.⁸¹ Curiosamente, apenas um miRNA, o miR-200a, foi identificado em ambos os estudos, sugerindo que o etanol gera respostas miRNA-tecido específicas.^{79,80}

Existe número crescente de estudos mostrando correlação entre DM e miRNAs, no que diz respeito à participação na patogênese da doença, na secreção de insulina e resistência insulínica periférica e até mesmo como potencial terapêutico. Futuramente, miRNAs poderão se tornar marcadores sanguíneos para o desenvolvimento do DM, e também, possivelmente, serem utilizados como ferramenta na terapia gênica da doença.^{76,82,83} Estudo recente em filhos de mãe com diabetes gestacional mostrou expressão alterada dos miR-15a e miR-15b no músculo esquelético desses indivíduos, sugerindo associação com o desenvolvimento da doença metabólica.⁸⁴

Pesquisas indicam que os miRNAs desempenham papel na regulação do desenvolvimento vascular normal e funções do endotélio. A funcionalidade das células endoteliais é primordial para a homeostasia do sistema vascular. Disfunção endotelial é um termo amplo que implica a desregulação das funções normais das células endoteliais, incluindo comprometimento da barreira, controle do tônus vascular, distúrbio da proliferação e capacidade migratória, bem como controle do tráfico de leucócitos.^{18,85}

Os miR-15b e miR-16 estão entre os mais expressos nas células musculares lisas vasculares e, recentemente, foi realizado estudo avaliando esses miRNAs no sistema vascular por meio de modelo experimental de lesão induzida por cateter tipo Fogarty insuflado na artéria carótida de rato, demonstrando alteração do padrão de sua expressão após a angioplastia, e relação da expressão dos mesmos com alteração da formação da camada neointima dos vasos, contribuindo para diminuição do lúmen do vaso sanguíneo.⁸⁶

Os miR-16 e miR-424 foram descritos como miRNAs anti-angiogênicos devido a sua capacidade de reprimir fatores de crescimento vascular (VEGFR2, FGFR1 e VEGF) nas células endoteliais. Especificamente, a superexpressão dos miR-16 e miR-424 reduz a proliferação e migração das células endoteliais *in vitro*. Inversamente, a inibição endógena dos miR-16 e miR-424 tem efeito oposto. Curiosamente, os miR-16 e miR-424 são exemplos intrigantes de miRNAs em que a expressão é regulada por fatores pró-angiogênicos como VEGF e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) em nível transcricional. Em virtude de seus efeitos negativos na angiogênese, sua regulação transcricional, por meio de estímulo angiogênico, fornece controle de *feedback* negativo na angiogênese.¹⁸

Os miR-221 e miR-222 parecem modular negativamente a remodelação vascular. Sabe-se que o bFGF e a interleucina 3, liberados na placa aterosclerótica por linfócitos T infiltrados, promovem a neovascularização.^{87,88} Um estudo conduzido por Dentelli et al.¹⁹ mostrou que a expressão do miR-21 e miR-222 em células endoteliais é modulada negativamente pelo bFGF e pela interleucina 3. Os autores também identificaram um novo alvo do miR-222, o fator de transcrição STAT5A (signal transducers and activators of transcription), que regula a expressão de genes envolvidos na proliferação e migração celular. Reforçando esses achados, outro estudo mostra que os miR-221 e miR-222 estão envolvidos na regulação da proliferação e migração das células endoteliais.⁸⁹ Estes miRNAs também já foram associados com regulação de genes envolvidos na angiogênese, inflamação e remodelação vascular por meio do controle do fator de transcrição do domínio Ets-1(E twenty-six).⁹⁰ Estudo conduzido em pacientes portadores de doença arterial coronariana mostrou níveis sanguíneos elevados miR-221 e miR-222 comparados com controles. Além disso, houve redução significativa desses níveis após introdução de terapia medicamentosa com atorvastatina.⁹¹

Em relação ao miR-138, estudo experimental em ratos mostra o envolvimento deste miRNA na regulação da proteína ligadora de cálcio (S100A-1) em células endoteliais. A S100A-1 é uma importante proteína ligadora de cálcio, está presente em grande variedade de tipos celulares, particularmente no miocárdio e na musculatura esquelética, onde participa da regulação da contração destes tecidos. Nas células endoteliais, a proteína S100A1 é essencial para ativação da eNOS. Os

autores observaram, ainda, papel significativo do miR-138 suprimindo a expressão da S100A1 nas células endoteliais submetidas à hipóxia.⁹² Seguindo a linha de pesquisa, esse mesmo grupo estudou o miR-138 em relação à exposição a citocinas pró-inflamatórias como angiotensina 2, endotelina 1 e TNF (fator de necrose tumoral), demonstrando que estas citocinas promovem inibição da expressão da S100A1 em células endoteliais humanas via indução do miR-138. Interessante ressaltar que, nesse estudo a inibição do miR-138 restaurou a expressão da S100A1 e reverteu a disfunção das células endoteliais, permitindo aos pesquisadores a sugestão futura de novas pesquisas centradas no miR-138 como potencial tratamento de patologias cardiovasculares ligadas à disfunção endotelial.²⁰

3. Justificativa

A função erétil é dependente da integridade anátomo-fisiológica dos corpos cavernosos do pênis, intimamente relacionada à integridade neurovascular, especialmente, endotelial. É conhecida e notória a alta prevalência e o grande impacto na qualidade de vida, pessoal, familiar e social de doenças como o DM e o alcoolismo, assim como sua estabelecida relação com a DE pela sua possível interferência no mecanismo neurovascular peniano.

Justifica-se este estudo na experiência do grupo e os resultados de estudos prévios utilizando o mesmo modelo animal para demonstrar a presença de lesão nos corpos cavernosos, com a possibilidade de se identificarem possíveis marcadores em sangue periférico da presença desta lesão estrutural e fisiológica nos corpos cavernosos, utilizando miRNAs relacionados com endotélio, angiogênese e apoptose expressos nos corpos cavernosos e sangue dos animais diabéticos e/ou sob efeito do alcoolismo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento da expressão dos miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 em modelo animal de ratos diabéticos, alcoolizados e diabéticos associados ao alcoolismo.

4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão dos miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 nos corpos cavernosos do pênis de ratos em modelos para diabetes, alcoolismo e diabetes associado ao alcoolismo.
2. Avaliar a expressão dos miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 no sangue periférico de ratos em modelos para diabetes, alcoolismo e diabetes associado ao alcoolismo.

5. Materiais e Métodos

5.1. Aspectos éticos

No presente estudo, os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob protocolo número 112/2007 (Anexo). As condições de armazenamento e protocolos experimentais dos animais estavam em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP (CEUA-FMRP), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Também foram seguidas, durante todo o período de experimentação animal, as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), desenvolvida como parte de uma iniciativa do NC3Rs (The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) para melhorar o desenho, a análise e o relato de investigação com animais, maximizando a informação publicada, minimizando assim estudos desnecessários.⁹³

5.2 Características da amostra

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 200 a 230 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (38x23x15cm - três ratos por gaiola), com tampa metálica tipo grade, forradas com maravalha. A temperatura ambiente foi mantida próxima a 25°C com exaustão do ar ambiente contínuo e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) e água, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP.

5.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo Controle (C): constituído por oito animais, dos quais cinco foram utilizados para a avaliação do perfil de expressão gênica dos miRNAs por

qRT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real) e três foram submetidos ao estudo do relaxamento da musculatura dos corpos cavernosos. Todos os animais receberam diariamente água “ad libitum”.

Grupo Alcoolizado (A): formado por oito animais, dos quais cinco foram utilizados para a avaliação do perfil de expressão gênica dos miRNAs por qT-PCR e três foram submetidos ao estudo do relaxamento da musculatura dos corpos cavernosos. Após o período de adaptação gradativa ao alcoolismo, descrito abaixo, todos os animais receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água por quatro semanas.

Grupo Diabético (D): constituído por oito animais, dos quais cinco foram utilizados para a avaliação do perfil de expressão gênica dos miRNAs por qT-PCR e três foram submetidos ao estudo do relaxamento da musculatura dos corpos cavernosos. Todos os animais receberam diariamente água “ad libitum”.

Grupo Diabético e Alcoolizado (D+A): composto por oito animais, dos quais cinco foram utilizados para a avaliação do perfil de expressão gênica dos miRNAs por qT-PCR e três foram submetidos ao estudo do relaxamento da musculatura dos corpos cavernosos. Após o período de adaptação gradativa descrito abaixo, todos os animais receberam diariamente álcool etílico absoluto diluído a 20% em água por quatro semanas.

Para os animais do Grupo Etanol (A, D+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 deste grupo experimental ficou condicionada a um breve período de adaptação gradativa ao consumo de etanol. Essa adaptação consistiu no fornecimento de etanol em concentrações crescentes semanais de 5, 10 e 20%, tendo início a fase experimental após a terceira semana de tratamento.⁹⁴ Já para os animais do grupo diabético (D, D+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 quatro 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 *Accu-Check Blood* glucose monitor (Boehringer Mannheim Corporation, Germany).

Todos os animais dos quatro grupos experimentais (C, A, D, D+A) foram mantidos por um período de tratamento de quatro semanas após três semanas de adaptação gradativa ao etanol, totalizando um período de tratamento de sete semanas. No final da sétima semana, os animais foram sacrificados, sendo coletadas amostras dos corpos cavernosos e sangue, conforme descrição abaixo.

5.4 Seleção dos alvos

Os miRNAs selecionados foram analisados pela ferramenta mirPath V.3, disponível online no Diana Tools (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Esta ferramenta identifica as vias de sinalização da base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), que potencialmente são reguladas pela expressão dos miRNAs.⁹⁵ Foram identificados na análise cinco miRNAs: miR-15b; miR-16; miR-138; miR-221 e miR-222, que apresentavam como alvos as vias reguladoras da atividade das NOS e do mecanismo de morte celular por apoptose e angiogênese. Os alvos foram confirmados baseados no banco de dados do miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/download.php>).

5.5 Estudo *in vitro* (Curva concentração-efeito do corpo cavernoso)

Após anestesia com pentobarbital sódico (Thiopental; 40 mg/kg i.p.) 12 animais (três pertencentes a cada grupo experimental) foram exsanguinados e o pênis retirado na região de inserção da crura, sendo imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer. Após remoção dos tecidos conectivos e da túnica

albugínea, o tecido cavernoso foi dissecado e isolado. Cada pênis forneceu dois segmentos de corpo cavernoso dissecado (1.0 x 0.3 x 0.2 cm) que foram montados em cubas para órgão isolado de 10 ml contendo solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl, 118; NaHCO₃, 25; glicose, 5.6; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄. 7H₂O, 1.17 e CaCl₂. 2H₂O, 2.5), aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Os tecidos foram suspensos entre dois ganchos de metal e um deles conectado a um transdutor de força, enquanto o outro foi fixado a uma unidade móvel; permitindo, assim, o ajuste preciso da tensão. A tensão aplicada aos tecidos (2 g) foi periodicamente ajustada até se obter a estabilização e a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos durante o período. As alterações de tensão foram medidas utilizando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema *PowerLab* de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA). Após 60 minutos de estabilização, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (PhE) (100 µM). Foram obtidas curvas concentração-resposta para agente relaxante, a acetilcolina (ACh) (relaxamento dependente do endotélio). Os relaxamentos de corpo cavernoso foram calculados como percentual da contração induzida pela PhE (10 µM), que foi dada como 100%. Os valores de concentração foram obtidos pelo percentual de resposta dada pelo KCl (118 mM), e os valores experimentais foram expressos como mediana.

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

Após anestesia com pentobarbital sódico (Thiopental; 40 mg/kg) intraperitoneal os 20 animais (cinco pertencentes a cada grupo experimental) 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, sendo congelado imediatamente com nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da sua utilização.

5.6.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA do tecido, foram adicionados 250 µL de PBS + 750µL de TRIZOL® às amostras de corpos cavernosos, as quais foram lisadas em homogeneizador do tipo “Polytron” por aproximadamente três minutos e, posteriormente, transferidas para um tubo do tipo *Eppendorf*® de 1,5 mL. Após, foram acrescentados 200 µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 13.200 rpm, e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500 µl de álcool isopropílico 100%, permanecendo a -80°C por, pelo menos, 12 horas. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Foram acrescentados 1000 µl de etanol 70% seguido de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se, novamente, o sobrenadante. O *pellet* foi seco por inversão, permanecendo em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir, a amostra foi ressuspensa com água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a -80°C.

Já para a extração do RNA do sangue, as amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal dos animais anestesiados, utilizando-se seringas heparinizadas, acondicionadas em tubos BD Vacutainer® com EDTA e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo o plasma transferido para um tubo *Eppendorf*® de 2,0 mL. A extração do RNA total das amostras de plasma foi realizada utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN®), com protocolo adaptado a partir das orientações do fabricante. Em um tubo *falcon* estéril e livre de RNase de 15 mL, foram adicionados 4 mL de Trizol® LS Reagent® (Invitrogen®, EUA) a 400 µL de plasma. Em seguida, o material foi deixado em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente, sendo adicionados 800 µl de clorofórmio (proporção 1:5 da quantidade inicial de Trizol®), agitando-se vigorosamente por 30 segundos. Após deixar o material em repouso por três minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se a 4°C por 15 minutos a 12.000 g. Ao final da centrifugação havia um sistema de três fases: incolor=RNA, branco=DNA, vermelho=proteína. A fase incolor

foi transferida para outro tubo falcon de 15 ml, adicionando-se 1,5 vezes o volume conseguido da fase incolor de etanol 100%, agitando-se vigorosamente a amostra. Em seguida, foram adicionados 700 µl dessa solução na coluna *RNeasy MinElute Spin*®, centrifugando as amostras por 15 segundos a 8000 g. O líquido resultante foi descartado, sendo repetido o passo anterior com o resto da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. Posteriormente, foram adicionados 700 µl de Buffer RWT do Kit em cada coluna, centrifugando novamente a amostra por 15 segundos a 8000 g, sempre descartando o líquido resultante. Na sequência, foram adicionados 500 µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também em rotação >8000 g por 15 segundos, descartando o líquido resultante. Adicionaram-se 500 µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também em rotação >8000 g, desta vez por dois minutos, descartando o líquido resultante. Centrifugou-se com o máximo da centrífuga por um minuto, descartando o líquido resultante. Após a troca do tubo coletor da coluna por um tubo *Eppendorf*® de 1,5 mL, foram adicionados 30 µl de água RNA-free. Centrifugou-se em rotação >8000 g por um minuto. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a -80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido das amostras (tecido de corpo cavernoso e plasma dos animais dos grupos experimentais) foi utilizado o equipamento Thermo Scientific NanoDrop® 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2 µl. Além da concentração, este aparelho fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

5.6.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do microRNA, 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 5 ng de RNA, foram adicionados 0,75 µl de RT Buffer; seguido de 0,075 µl de dNTP's; 1,5 µl de *primers* específicos (miRNAs ou controles endógenos) e 0,5 µl da enzima MultiScribe™, 0,094 µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC

o volume final de 7,5 µl, sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, cinco minutos a 85°C e, em seguida, a 4°C.

5.6.3 Condições da reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)

O método de qRT-PCR foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos miRNAs miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222, possivelmente relacionados à lesão anatômica e fisiológica/endotelial nos corpos cavernosos em ratos nos grupos de estudo, conforme demonstrado em estudos prévios do grupo.^{16,17,96}

A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por qRT-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 do *Cycle Threshold* (CT), determinados para as diferentes amostras, foram normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado miRNA) é subtraído do CT determinado para um *house-keeping* (neste caso o U6) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo miRNA, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste miRNA em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT), reflete a diferença existente entre as amostras. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As reações de amplificação por qRT-PCR foram realizadas em duplicata numa placa de 96 poços, utilizando o reagente *TaqMan Master Mix* (Applied Biosystems, EUA). A reação obteve volume final de 10 µl, utilizando 5 µl do reagente específico *TaqMan Master Mix*, 0,5 µl de cada sonda específica e 4,5 µl de cDNA diluído. Um aparelho de detecção de RT-PCR 7500 *Fasta Real Time PCR System*

(Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o *software 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) para a obtenção dos valores de CT.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto (apeloamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel®* para cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi estabelecido um *threshold* de 0,1 para o endógeno e também para os miRNAs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5 ciclo.

5.7 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por medianas e intervalos interquartis, e as variáveis qualitativas ou categóricas por seus valores absolutos ou proporções.

Na comparação das variáveis contínuas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguida de pós-teste de Dunn's para múltiplas comparações.

Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) foram construídas para comparar e calcular a acurácia global dos miRNA séricos. A área sob a curva ROC foi empregada como medida de acurácia global dos testes.

Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Na análise estatística foram utilizados os programas estatísticos computacionais (GraphPad Prism, versão 8.0.3, GraphPad Software, San Diego-CA, USA).

6. Resultados

Foram avaliados vinte ratos adultos divididos em quatro grupos: controle (C), alcoolizado (A), diabético (D) e diabético alcoolizado (D+A). O peso mediano dos ratos foi de 515 g [495-525 g] nos controles, 430 g [417-454g] no grupo alcoolizado, 320 g [306-332g] no grupo D e 360 g [355-371g] no grupo D+A. A diminuição foi significativamente maior nos grupos D e D+A ($p < 0,001$) (teste de Kruskal-Wallis) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Representação da mediana [intervalo interquartil] dos pesos em gramas dos animais entre os grupos: Controle (C), Alcoolizado (A), Diabético (D) e Diabético alcoolizado (D+A). Houve diferença significativa nos grupos A, D e D+A comparados ao C ($p < 0,001$). (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn)

Os valores da glicemia sérica foram significativamente maiores nos ratos diabéticos e diabéticos alcoolizados, quando comparados aos controles e alcoolizados ($p < 0,001$) (teste de Kruskal-Wallis) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação da mediana [intervalo interquartil] dos valores(g/dl) das glicemias séricas dos animais entre os grupos: C, A, D e D+A. Houve diferença significativa nos grupos D e D+A comparados com C ($p < 0,001$). (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn)

6.1 Curva concentração-efeito acetilcolina no corpo cavernoso

Em tiras de musculatura lisa de corpo cavernoso pré-contraídas com PhE (10 $\mu\text{mol/L}$), a ACh (0.01-1000 $\mu\text{mol/L}$) causou relaxamento progressivo e concentração-dependente. As respostas máximas das tiras de musculatura lisa de corpo cavernoso para ACh foram significativamente reduzidas em todos os grupos experimentais (A, D e D+A), em comparação ao grupo C (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Relaxamento induzido pela Acetilcolina (0.01-1000 $\mu\text{mol/L}$) em tiras de musculatura lisa do corpo cavernoso pré-contraídas com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$). As respostas máximas foram significativamente reduzidas nos grupos A, D e D+A, em comparação aos ratos do grupo C ($p < 0,01$ - teste de Kruskal-Wallis e $*p < 0,05$ - pós-teste de Dunn)

6.2 MicroRNAs no corpo cavernoso

Encontrou-se padrão recorrente na expressão dos cinco miRNA nos corpos cavernosos nos quatro grupos. Observou-se expressão heterogênea no grupo A e hipoexpressão nos grupos D e D+A. A análise pelo teste de Kruskal-Wallis pode demonstrar, além desse padrão descrito nos gráficos abaixo, diferenças estatisticamente significativas na expressão dos miR-221, miR-222 e miR-16. Na análise pós-teste, que comparou a expressão de cada grupo com os controles, concluiu-se que as diferenças foram significativas no grupo (D+A). Tais achados e a magnitude dessas diferenças estão demonstradas nos Gráficos 4 a 8. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. A estrela destaca os grupos cujas diferenças de expressão diferiram significativamente

dos controles na avaliação pós-teste. A tabela suplementar descreve as diferenças dessas comparações (Apêndice A).

Gráfico 4 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-15b no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,051$ - teste de Kruskal-Wallis)

Gráfico 5 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-16 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p=0,045$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ pós-teste de Dunn), destacado com estrela

Gráfico 6 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-138 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,158$ - teste de Kruskal-Wallis)

Gráfico 7 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-221 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p=0,044$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacado com estrela

Gráfico 8 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-222 no corpo cavernoso. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para o grupo D+A em relação ao grupo C ($p=0,035$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacado com estrela

6.3 MicroRNAs no sangue

De modo semelhante ao observado no corpo cavernoso, notou-se padrão recorrente na expressão dos cinco miRNA no plasma dos quatro grupos. Observou-se hipoexpressão dos miRNAs nos três grupos experimentais e ainda mais acentuada nos grupos D e D+A.

A análise pelo teste de Kruskal-Wallis pode demonstrar, além do aparente descrito pelos gráficos, diferenças estatisticamente significativas na expressão de todos os miRNA testados. Na análise pós-teste, que comparou a expressão de cada grupo com os controles, concluiu-se que as diferenças foram mais significativas nos grupos D e D+A.

Não foi possível demonstrar as diferenças do grupo A com os controles. Tais achados e a magnitude dessas diferenças estão apresentadas nos Gráficos 9 a 13. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do

microRNA. A estrela destaca os grupos cujas diferenças de expressão diferiram significativamente dos controles na avaliação pós-teste. A tabela suplementar descreve as diferenças destas comparações (Apêndice B).

Gráfico 9 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-15b no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,037$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela

Gráfico 10 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-16 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,021$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela

Gráfico 11 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-138 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,002$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela

Gráfico 12 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-221 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,001$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela

Gráfico 13 - Valores relativos da expressão gênica do microRNA-222 no sangue. Cada círculo representa um animal, e as barras a expressão mediana relativa do microRNA. Houve diferença significativa para os grupos D e D+A em relação ao grupo C ($p=0,001$ - teste de Kruskal-Wallis e $p<0,05$ - pós-teste de Dunn), destacados com estrela

6.4 Representações gráficas conjuntas dos MicroRNAs no corpo cavernoso e sangue

Os Gráficos 14 e 15 sintetizam a expressão dos miRNA no corpo cavernoso e sangue, respectivamente.

Gráfico 14 - Valores relativos da expressão gênica dos microRNAs **no corpo cavernoso**. As barras representam a expressão mediana relativa do microRNA. Destacados com estrela, grupos com diferença significativa em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p < 0,05$)

Gráfico 15 - Valores relativos da expressão gênica dos microRNAs **no sangue**. As barras representam a expressão mediana relativa do microRNA. Destacados com estrela, grupos com diferença significativa em relação ao grupo C (teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, $p < 0,05$)

6.5 Curva ROC miRNA no sangue

A análise da curva ROC demonstra a acurácia diagnóstica dos miRNAs séricos em discriminar os grupos experimentais (A, D e D+A) e C. As respectivas curvas e as medidas de acurácia estão detalhadas no Gráfico 16.

Gráfico 16 - Curvas ROC e AUC (área abaixo da curva) para os miRNA miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 ($p < 0.001$)

7. Discussão

No grupo de ratos submetidos apenas ao alcoolismo (A), a expressão dos miRNAs no corpo cavernoso foi errática, parte dos animais mostrou aumento da expressão gênica dos miRNAs e outros hipoexpressão. Neste mesmo grupo (A), a análise do sangue mostrou hipoexpressão de todos miRNAs, porém sem significância estatística. No grupo de ratos diabéticos (D), todos os miRNAs se mostraram com expressão gênica diminuída, tanto no corpo cavernoso quanto no sangue, mas essa diferença teve significância estatística apenas no sangue, para todos os miRNAs estudados. Encontrou-se expressão gênica ainda menor de todos os miRNAs estudados no grupo de ratos diabéticos alcoolizados (D+A), tanto no corpo cavernoso como no sangue, sugerindo possível efeito aditivo do alcoolismo ao DM. No corpo cavernoso, os miRNA 16, 221 e 222 apresentaram hipoexpressão significativa e no sangue todos os miRNA estudados no grupo D+A demonstraram hipoexpressão significativa.

No presente estudo utilizou-se o experimento farmacológico com a ACh induzindo o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso para confirmar a presença de lesão funcional dependente do endotélio nos corpos cavernosos dos animais, com achados similares aos previamente publicados pelo grupo do laboratório.^{11,96} Está bem estabelecido que a ACh atua como vasodilatador dependente do endotélio⁹⁷, portanto a falta de relaxamento evidencia dano endotelial, o que fundamenta este estudo da expressão dos miRNAs na busca de um marcador sanguíneo da lesão do corpo cavernoso.

A expressão variável no grupo A talvez possa ser explicada pela resposta individual heterogênea ao álcool em relação ao endotélio; reflexo, talvez da controversa e conflitante relação, ainda vigente na literatura, entre álcool e disfunção endotelial.^{98,99} Já no grupo D, a hipoexpressão significativa de todos os miRNA estudados, que tem sabida relação com endotélio, sugere relação do DM com a lesão endotelial dos corpos cavernosos. O grupo D+A foi o que apresentou expressão mais alterada dos miRNAs, todos apresentaram expressão diminuída, mostrando provável adição de dano endotelial resultante da associação DM e alcoolismo.

O rato é o modelo animal mais comumente utilizado para o estudo da DE. Os estudos em ratos têm sido de grande importância para a identificação de

mecanismos fisiopatológicos que contribuem para a DE, e as modalidades de tratamento foram desenvolvidas com base em pesquisas desenvolvidas nesta espécie. As vantagens da utilização dos ratos incluem: tamanho conveniente (100-600 g), baixo custo, quando comparados a outras espécies de animais, disponibilidade de instalações para abrigo e manejo na maioria das instituições, metodologia e protocolos de estudos de DE bem definidos no modelo.¹⁰⁰ O modelo experimental de ratos submetidos ao alcoolismo crônico e DM encontra-se consolidado em nosso grupo há mais de uma década, sendo alvo de estudo em biologia molecular, farmacologia, imuno-histoquímica em diferentes vertentes envolvendo os corpos cavernosos e, possivelmente, a função erétil.^{16,17,96,101}

A ereção peniana é um processo complexo que envolve múltiplas vias moleculares. A mais importante e amplamente reconhecida é a via do NO/GMP cíclico. O NO é sintetizado a partir da L-arginina por três diferentes isoformas da NOS: NOS neuronal, NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). A NOS neuronal produz NO neural, responsável pela vasodilatação inicial, e a eNOS produz NO endotelial, que contribui para a manutenção da ereção.¹⁰² Estudo prévio do grupo relacionou a hipoexpressão do miR-27b com aumento da expressão da eNOS no mesmo modelo experimental deste estudo.¹⁶ Em adição a esses achados, a redução da expressão do miR-221 e miR-222 em células endoteliais humanas aumentou os níveis de RNA mensageiro da eNOS.¹⁰³

Outra via molecular relacionada com DE é a das endotelinas, peptídeos vasoconstritores potentes que podem causar contração sustentada na musculatura lisa dos vasos cavernosos. Ritchie e Sullivan demonstraram níveis elevados de endotelinas em pacientes com DM.¹⁰⁴ No entanto, existe dúvida quanto à exata relação entre endotelinas e DE, sendo possível que a via da endotelina represente maior relevância na condição de disfunção endotelial global, com frequência presente no DM e na doença vascular. Pesquisa deste grupo demonstrou a relação entre a hipoexpressão do miR-155 e miR-199 e o aumento da expressão de receptores das endotelinas, utilizando o mesmo modelo de ratos diabéticos e submetidos ao alcoolismo crônico.¹⁷

Em estudo recente do grupo, utilizando o modelo de ratos alcoolizados, encontrou-se expressão aumentada da CASPASE 3, importante enzima ligada à

morte celular programada, além da diminuição da área da musculatura lisa dos corpos cavernosos, sugerindo a importância dos mecanismos envolvidos com a apoptose nesse modelo. Porém, não foi encontrada alteração da expressão do miR-21 analisado.¹⁰¹ Estudo realizado em biópsias de corpos cavernosos de pacientes diabéticos com DE grave, no momento da cirurgia de implante de pênis mostrou aumento da apoptose nas células endoteliais.¹⁰⁵ Em modelo experimental de DE em ratos idosos, os miR-1 e miR-203 foram sugeridos como reguladores da apoptose pela inibição da vias da AKT3 (Proteína quinase serina/treonina 3) e PIK3CA (Fosfatidilinositol 3 quinases catalítica).¹⁰⁶

Avaliando a DE em modelo experimental de ratos com DM tipo 2 (C57BL/KsJ-db-/db -), com base em análises de bioinformática para prever genes alvo e vias de sinalização reguladas por miRNA nos corpos cavernosos, foram selecionados quatro miRNAs com potencial papel nos mecanismos da DM tipo 2, e por meio da técnica qRT-PCR observou-se diminuição na expressão dos miR-122 e miR-133 associada ao aumento da expressão dos miR-18a e miR-206.¹⁰⁷ Além disso, com técnicas sofisticadas envolvendo luciferase, por meio da modulação da expressão dos miR-18a e miR 206 em culturas de células, foi demonstrado papel inibitório destes miRNAs na expressão da IGF-1 (Fator de Crescimento Similar à Insulina Tipo I) nos corpos cavernosos; sendo, portanto, prováveis reguladores da IGF-1.¹⁰⁷ Correlacionando com o presente estudo, apesar de o modelo de DM induzido por aloxana ser considerado do tipo 1 e, provavelmente, possuir outros alvos moleculares e genes envolvidos na lesão dos corpos cavernosos, observou-se no grupo D expressão diminuída de todos os miRNAs avaliados nos corpos cavernosos e efeito adicional na diminuição da expressão no grupo D+A.

Em modelo experimental de DE com ratos obesos e DM tipo 2, induzido por dieta com alto teor de gordura, foram analisados mais de 600 miRNAs nos corpos cavernosos, por meio de análise em larga escala (microarray NanoString), evidenciando que 65 miRNAs demonstraram expressão diminuída e seis miRNAs expressão aumentada, comparados com ratos com dieta controle¹⁰⁸, portanto a maioria dos miRNAs alterados com expressão diminuída. Comparando com este estudo, também foi encontrada a alteração mais comum nos animais diabéticos e diabéticos alcoolizados, a hipoeexpressão dos miRNAs avaliados.

Liu et al.¹⁰⁹ analisaram a expressão dos miRNAs em corpos cavernosos de ratos submetidos à cirurgia de lesão dos nervos cavernosos, que simula DE pós-prostatectomia radical. Foi avaliado o perfil de expressão dos miRNAs por sequenciamento total do RNA, identificando 124 miRNAs com expressão alterada, sendo 122 hiperexpressos. Entre os 122 miRNAs hiperexpressos foram selecionados quatro com hiperexpressão acentuada para validação por RT-PCR: miR-101a, miR-138, miR-142 e miR-338. Contrariando os achados de Liu et al., no presente estudo foi possível identificar a hipoexpressão do miR-138. Vislumbrou-se que, por serem modelos experimentais distintos, o modelo utilizado por Liu et al. de lesão neurogênica e o do presente estudo vasculogênico, talvez explique a disparidade da expressão do miRNA-138. São exposições a fatores externos distintos e com prováveis respostas celulares e situações diferentes de expressão gênica do microRNAs.

O endotélio, em condições fisiológicas, promove um ambiente de equilíbrio entre fatores relaxantes e constritores, que é alterado pelo DM.¹¹⁰ A disfunção endotelial causada pelo DM é multifatorial, envolvendo a formação de moléculas bioquímicas anormais como: produtos de glicação avançada, diacilglicerol (DAG), ativação da proteína quinase C (PKC), que são altamente reativos e possuem a capacidade de gerar eventos oxidantes e pró-inflamatórios.¹¹¹

Estudos clínicos sobre o risco/benefício do consumo leve a moderado de álcool, em relação ao endotélio e doenças cardiovasculares, são permeados por controvérsias e lacunas ainda não preenchidas.^{99,112} Recente metanálise epidemiológica demonstrou redução no risco cardiovascular entre consumidores de bebidas alcoólicas.¹¹³ Porém, este tema está associado a muita discussão na literatura médica relacionada ao nível e padrão de consumo, assim como o tipo de bebida.¹¹² Outra dúvida pertinente é se o aparente efeito cardioprotetor do álcool não seria reflexo de viés de seleção que se acumula ao longo de toda vida.¹¹³ No Japão, em estudo sobre alcoolismo, envolvendo 404 homens com idade variando entre 30 a 79 anos, foi estimada a função endotelial por meio da avaliação da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial pela ultrassonografia.⁹⁸ Indivíduos com padrão de etilismo pesado, mais de 46 g por dia, apresentaram performance pior no fluxo,

permitindo concluir que o consumo pesado de álcool pode ser um fator de risco independente para disfunção endotelial.

Estudos experimentais mostram associação deletéria entre o alcoolismo e a integridade do endotélio. Nos corpos cavernosos de ratos, o alcoolismo foi associado a efeito vasoconstritor e disfunção endotelial pelas vias do *stress* oxidativo, NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) e aumento de expressão de mediadores inflamatórios.¹⁰ Em estudo farmacológico neste modelo de alcoolismo, envolvendo contração e relaxamento dos corpos cavernosos com diferentes drogas, incluindo o nitroprussiato de sódio, fonte de NO e um potente vasodilatador, houve efeito de relaxamento semelhante ao dos controles. Sugeriu-se que a disfunção endotelial, neste modelo, não fosse relacionada pela via do NO que envolve a ativação da enzima guanilato ciclase e a produção de GMPc. Considerando este achado, talvez esta possa ser uma explicação plausível para o fato de não ter sido encontrada alteração na expressão dos miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222, pois sua expressão tem como um dos prováveis alvos a NOS no grupo alcoolizado.

A associação entre DM e alcoolismo é frequente na prática clínica.¹¹⁴ Em estudo clínico, Fleming e Mundt observaram que 28% dos pacientes diabéticos, selecionados aleatoriamente, preenchiem critérios diagnósticos de abuso e 13% de dependência para ingestão de álcool.¹¹⁵ Embora haja debate contínuo sobre a quantidade nociva de ingestão alcoólica para o diabético, evidências consistentes demonstram o efeito prejudicial com o uso de altas doses.¹¹⁶ A literatura mostra que o controle glicêmico e a produção de glicose foram afetados pelo álcool¹¹⁷, e o controle do DM pode ser afetado mesmo por pequenas quantidades de álcool.¹¹⁸ Paralelamente, sabe-se que o alcoolismo crônico também impacta negativamente o curso do DM pela redução na aderência ao tratamento, que corrobora com pior evolução da doença e consequente aumento na morbidade e mortalidade. Assim, intervenções para reduzir o consumo alcoólico oferecem potencial para melhorar a adesão e os resultados do tratamento do diabetes.¹¹⁹

O entendimento do papel dos miRNAs e suas funções tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. O papel dos miRNAs no contexto das doenças urológicas não oncológicas e, especialmente, na DE permanece limitado.

Os miRNAs foram apontados como reguladores de importantes funções nas células do endotélio.¹⁸ Muitos miRNAs são estáveis no plasma sanguíneo e foram sugeridos como potenciais biomarcadores de várias doenças, incluindo DM, doenças cardiovasculares e câncer.¹²⁰ Estudos revelaram que os miRNAs provenientes de células e tecidos lesados por isquemia podem ser liberados na corrente sanguínea, permanecendo estáveis e possivelmente identificáveis.^{121,122}

A escolha dos miRNAs utilizados neste estudo foi fundamentada na consideração em avaliar a expressão de miRNAs que sabidamente têm expressão relacionada com endotélio vascular e angiogênese.^{18,20,89,116} Análise por meio de ferramenta de bioinformática sinalizou como potenciais alvos dos miR-15b, miR-16, miR-138, miR-221 e miR-222 as vias reguladoras da atividade da NOS e do mecanismo de morte celular por apoptose, além da angiogênese.⁹⁵ Assim, foram utilizados os miRNAs 15b e 16 por sua demonstrada relação com a modulação da angiogênese e controle da expressão do importante VEGF.¹⁸ Paralelamente, os miRNAs 221 e 222, por sua também conhecida ação em bloquear a migração, proliferação e angiogênese de células endoteliais, regulando indiretamente a expressão da eNOS.^{19,89}

Estudo com cultura de células nervosas mostrou expressão diminuída do miRNA 138 em ambiente induzido de *stress* oxidativo e apoptose, e que o aumento experimental da expressão deste miRNA pode proteger essas células, diminuindo a apoptose celular.¹²³ Outra pesquisa envolvendo cultura de células do miocárdio, obtidas durante cirurgia cardíaca de pacientes com cardiopatias congênita, revelou expressão do miRNA 138 diminuída em ambiente de hipóxia.¹²⁴ No presente estudo também foi encontrada expressão diminuída do miRNA nos grupos experimentais, marcadamente no grupo D+A, talvez refletindo as condições mais intensas de lesão tecidual; devido, provavelmente, ao maior envolvimento da via da apoptose celular.

Entende-se que miRNAs envolvidos nos processos biológicos da apoptose, angiogênese e endotélio vascular possam fornecer pistas com a análise da sua expressão e tornarem-se, assim, possíveis biomarcadores em sangue periférico de lesão instalada, ou em andamento, nos corpos cavernosos. Esta lesão pode ser a representação morfológica da presença de disfunção dos corpos cavernosos e, portanto, estabeleça provável relação com identificação subclínica ou subnotificada

de DE. Acredita-se com este fato, no futuro vislumbrar um marcador ligado à ereção, com toda importância e impacto psicossocial da DE, mas também relacionado à saúde global do endotélio e à importância orgânica que ele carrega. Especialmente ao se considerar a DE, no espectro das doenças cardiovasculares, à luz das evidências atuais, como fator de risco isolado e um forte preditor de eventos cardiovasculares e vasculares cerebrais.^{5,6} Assim, possivelmente, um biomarcador periférico de lesão dos corpos cavernosos instalado e/ou em andamento, seria um provável “selo” de alteração morfológica em curso com eventual impacto funcional da ereção peniana e disfunção endotelial global.

Dentre as limitações do presente estudo, é importante ressaltar que, apesar da experiência deste grupo com o modelo experimental de ratos diabéticos e alcoolizados, existe pouca validação externa do modelo. Paralelamente, na falta de completa elucidação dos mecanismos envolvidos entre a expressão gênica e a síntese da proteína alvo, o efeito epigenético dos miRNAs, além da possibilidade de um único miRNA poder estar envolvido em múltiplos eventos biológicos, limitam-se conclusões quanto à definição sobre o alvo do miRNA estudado e consequente estabelecimento de relação causa-consequência. Dessa forma, acredita-se que se deve entender e considerar as variáveis e dificuldades mencionadas, sem menosprezar o possível potencial e a importância na prática clínica de um possível biomarcador. A estabilidade dos miRNAs no sangue periférico associado ao seu corrente uso na prática clínica como biomarcador de doenças oncológicas e não oncológicas justificam este estudo como um passo inicial necessário. O aparente pequeno número de animais utilizados no experimento, em atendimento à iniciativa do NC3Rs das diretrizes ARRIVE®; ficou evidente com a curva ROC, da expressão gênica no sangue dos miRNAs estudados, mas não foi impeditivo para a mesma demonstrar seu grande poder discriminatório e a alta acurácia do ensaio. Portanto, considerando as limitações e o poder do estudo, acredita-se nos sinais positivos que estimulam a persistir na caminhada iniciada para o desenvolvimento da pesquisa de potenciais futuros biomarcadores de lesão estrutural dos corpos cavernosos penianos em sangue periférico de pacientes diabéticos e diabéticos alcoolizados. Novos estudos serão necessários e projeta-se realizá-los em futuro próximo.

Vislumbra-se que pesquisas em futuro próximo possam validar alvos moleculares e ajudar a descobrir e consolidar mecanismos epigenéticos e rede de miRNAs envolvidos na disfunção endotelial relacionada com DE e doenças cardiovasculares, estabelecendo biomarcadores no sangue periférico e, talvez, novos alvos terapêuticos.

8. *Conclusões*

1. No grupo A foram encontradas expressões variáveis no corpo cavernoso, hipoexpressão e hiperexpressão quando comparadas com o grupo C em todos os miRNAs estudados. No sangue, foi encontrada hipoexpressão no grupo A em relação ao grupo C em todos os miRNAs estudados, porém sem significância estatística.
2. No grupo D foi observada hipoexpressão no corpo cavernoso em todos os miRNAs avaliados, no entanto sem significância estatística. No sangue, foi verificada hipoexpressão estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo C para todos os miRNAs estudados (15b, 16, 138, 221 e 222).
3. No grupo D+A foi evidenciada hipoexpressão no corpo cavernoso em todos os miRNAs analisados, sendo essa diferença estatisticamente significativa para os miRNAs 16, 221 e 222 comparados ao grupo C. No sangue, foi encontrada hipoexpressão acentuada no grupo D+A, estatisticamente significativa para todos os miRNAs estudados (15b, 16, 138, 221 e 222), quando comparados com o grupo C.
4. A análise pela curva ROC demonstrou excelente acurácia diagnóstica para todos os miRNAs estudados no sangue dos grupos experimentais, área abaixo da curva >90% em relação ao controle, permitindo sugerir esses miRNAs como potenciais marcadores sanguíneos de dano estrutural/funcional dos corpos cavernosos em grupos de risco.

9. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

1. Allen MS, Walter EE. Erectile dysfunction: an umbrella review of meta-analyses of risk-factors, treatment, and prevalence outcomes. *J Sex Med.* 2019;16(4):531-541.
2. Gratzke C et al. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2010;7(1 Part 2):445-475.
3. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA J Am Med Assoc.* 1993;270(1):83-90.
4. Morgentaler A. Male impotence. *Lancet.* 1999;354(9191):1713-1718.
5. Zhao B et al. Erectile Dysfunction Predicts Cardiovascular Events as an Independent Risk Factor: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Sex Med.* 2019;16(7):1005-1017.
6. Böhm M et al. Erectile dysfunction predicts cardiovascular events in high-risk patients receiving telmisartan, ramipril, or both: The ongoing telmisartan alone and in combination with ramipril global endpoint trial/telmisartan randomized assessment study in ace intolerant subjects with cardiovascular disease (ontarget/transcend) Trials. *Circulation.* 2010;121(12):1439-1446.
7. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019. IDF Diabetes Atlas 9th Ed. 2019. 2019. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org/en/>. Accessed May 3, 2020.
8. U.S. Department of Health and Human Services. Sexual and Urologic Problems of Diabetes. *Natl Inst Diabetes Dig kidney Dis.* 2008;9:1-8.
9. Peugh J, Belenko S. Alcohol, drugs and sexual function: A review. *J Psychoactive Drugs.* 2001;33(3):223-232.
10. Leite LN et al. Ethanol-induced erectile dysfunction and increased expression of pro-inflammatory proteins in the rat cavernosal smooth muscle are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol.* 2017;804:82-93.
11. Lizarte FS et al. Chronic ethanol consumption induces cavernosal smooth muscle dysfunction in rats. *Urology.* 2009;74(6):1250-1256.
12. Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.
13. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):25-30.
14. Liu C, Wang R. The Role of MicroRNA in Erectile Dysfunction. *J Integr Nephrol Androl.* 2017;4(3):81-86.

15. Huang W. MicroRNAs: Biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Methods Mol Biol.* 2017;1617:57-67.
16. da Cunha JP et al. Expression profiles of eNOS, iNOS and microRNA-27b in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. *Acta Cir Bras.* 2017;32(1):38-45.
17. Gonçalves FZ et al. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol.* 2018;51(3):e6329.
18. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Suárez Y. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacol Res.* 2013;75:15-27.
19. Dentelli P et al. MicroRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1562-1568.
20. Sen A, Most P, Peppel K. Induction of microRNA-138 by pro-inflammatory cytokines causes endothelial cell dysfunction. *FEBS Lett.* 2014;588(6):906-914.
21. Awad A et al. Evolution in the concept of erection anatomy. *Surg Radiol Anat.* 2011;33(4):301-312.
22. Brock G et al. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. *J Urol.* 1997;157(1):276-281.
23. Goldstein AMB et al. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology.* 1982;20(3):259-266.
24. Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev.* 1995;75(1):191-236.
25. Simonsen U, García-Sacristán A, Prieto D. Penile arteries and erection. *J Vasc Res.* 2002;39(4):283-303.
26. De Groat W, Booth A. Neural control of penile erection. In: Maggi CA (Ed) *The Autonomic Nervous System. Nervous Control Of The Urogenital System.* London: Taylor & Francis, 1993. p. 465-513.
27. Lue TF et al. Neuroanatomy of penile erection: Its relevance to iatrogenic impotence. *J Urol.* 1984;131(2):273-280.
28. Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: Insight into etiology and prevention. *J Urol.* 1982;128(3):492-497.

29. Melman A. Neural and vascular control of erection. In: R. C. Rosen & S. R. Leiblum (Eds.). *Erectile Disorders: Assessment and Treatment*. 1st Ed. New York: The Guilford Press, 1992. p. 55-71.
30. Walsh P et al. Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. *Md Med J*. 1990;39(4):389-393.
31. Dean RC, Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2005;32(4):379-395.
32. El-Sakka AI, Lue TF. Physiology of penile erection. *Sci World J*. 2004;4(Suppl 1):128-134.
33. Giuliano F et al. Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J Urol*. 1993;150(2):519-524.
34. Saenz de Tejada I et al. Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J Urol*. 1989;142(4):1117-1121.
35. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Krane R. Local control of penile erection. Nerves, smooth muscle, and endothelium. *Urol Clin North Am*. 1988;15(1):9-15.
36. Lue TF. Erectile dysfunction. *N Engl J Med*. 2000;342(24):1802-1813.
37. Burnett AL et al. Erectile Dysfunction: AUA Guideline. *J Urol*. 2018;200(3):633-641.
38. Brenot P. *Male Impotence: A Historical Perspective*. Paris: L'esprit du temps; 1994.
39. Morley JE. Impotence in older men. *Hosp Pract*. 1988;23(4):139-158.
40. Laumann EO, Paik A, Rosen RC. Sexual dysfunction in the United States: Prevalence and predictors. *J Am Med Assoc*. 1999;281(6):537-544.
41. Aytia IA, McKinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int*. 1999;84(1):50-56.
42. Rosen RO et al. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. *Curr Med Res Opin*. 2004;20(5):607-617.
43. Bacon CG et al. Sexual function in men older than 50 years of age: Results from the health professionals follow-up study. *Ann Intern Med*. 2003;139(3):161-168.
44. Nelson CJ, Mulhall JP, Roth AJ. The Association Between Erectile Dysfunction and Depressive Symptoms in Men Treated for Prostate Cancer. *J Sex Med*.

2011;8(2):560-566.

45. Seidman SN, Roose SP. The relationship between depression and erectile dysfunction. *Curr Psychiatry Rep.* 2000;2(3):201-205.
46. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet.* 2013;381(9861):153-165.
47. Mulhall JP. Penile rehabilitation following radical prostatectomy. *Curr Opin Urol.* 2008;18(6):613-620.
48. Corona G et al. Testosterone, cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):337-353.
49. Zitzmann M. Testosterone deficiency, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(12):673-681.
50. Tajar A et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: Evidence from the European male ageing study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1810-1818.
51. Tamler R, Deveney T. Hypogonadism, erectile dysfunction, and type 2 diabetes mellitus: What the clinician needs to know. *Postgrad Med.* 2010;122(6):165-175.
52. Dhindsa S et al. Testosterone concentrations in diabetic and nondiabetic obese men. *Diabetes Care.* 2010;33(6):1186-1192.
53. Bivalacqua TJ et al. Endothelial Dysfunction in Erectile Dysfunction: Role of the Endothelium in Erectile Physiology and Disease. *J Androl.* 2003;24(Suppl. 6):S17-37.
54. Virag R, Bouilly P, Frydman D. Is impotence an arterial disorder? A Study of arterial risk factors in 440 impotent men. *Lancet.* 1985;325(8422):181-184.
55. Prieto D. Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int J Impot Res.* 2008;20(1):17-29.
56. Burchardt M et al. Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol.* 2000;164(4):1188-1191.
57. Jackson G. The importance of risk factor reduction in erectile dysfunction. *Curr Urol Rep.* 2007;8(6):463-466.
58. Esposito K et al. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: A randomized controlled trial. *J Am Med Assoc.* 2004;291(24):2978-2984.
59. Nehra A et al. The Princeton III Consensus recommendations for the management of erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(8):766-778.

60. Laranjeira R et al. Alcohol use patterns among Brazilian adults. *Rev Bras Psiquiatr.* 2010;32(3):231-241.
61. Carlini E et al. II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas No Brasil : Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades Do País : 2005. 2006th ed. São Paulo: Cebrid - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas - Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina e SENAD - Secretaria Nacional Antidrogas, Presidência da República, Gabinete de Segurança Nacional; 2006. 473p.
62. Galduróz JCF, Carlini EA. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil - 2001. *Brazilian J Med Biol Res.* 2007;40(3):367-375.
63. O'Farrell TJ, Kleinke CL, Cutter HSG. Sexual adjustment of male alcoholics: Changes from before to after receiving alcoholism counseling with and without marital therapy. *Addict Behav.* 1998;23(3):419-425.
64. Bacon CG et al. A prospective study of risk factors for erectile dysfunction. *J Urol.* 2006;176(1):217-221.
65. Nicolosi A et al. Epidemiology of erectile dysfunction in four countries: Cross-national study of the prevalence and correlates of erectile dysfunction. *Urology.* 2003;61(1):201-206.
66. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539-53.
67. Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: A brief review. *J Diabetes Complications.* 2000;14(2):108-115.
68. Morgan CL, Currie CJ, Peters JR. Relationship between diabetes and mortality: A population study using record linkage. *Diabetes Care.* 2000;23(8):1103-1107.
69. Stratton IM et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): Prospective observational study. *Br Med J.* 2000;321(7258):405-412.
70. Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Diabetes and sexual dysfunction: Current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:95-105.
71. Thorve VS et al. Diabetes-induced erectile dysfunction: Epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications.* 2011;25(2):129-136.
72. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531.

-
73. Gunaratne PH, Creighton CJ, Watson MTJ. Large-scale integration of microRNA and gene expression data for identification of enriched MicroRNA-mRNA associations in biological systems. *Methods Mol Biol.* 2010;667:297-315.
 74. Kulshreshtha R et al. Regulation of microRNA expression: The hypoxic component. *Cell Cycle.* 2007;6(12):1425-1430.
 75. Ardekani AM, Naeini MM. The role of MicroRNAs in human diseases. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2010;2(4):161-179.
 76. Guay C et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res.* 2011;157(4):253-264.
 77. Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1(1):1-9.
 78. Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):6845-6853.
 79. Dolganiuc A et al. MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009;33(10):1704-1710.
 80. Wang LL et al. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum Reprod.* 2009;24(3):562-579.
 81. Miranda RC et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34(4):575-587.
 82. Chen X et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006.
 83. Zampetaki A et al. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res.* 2010;107(6):810-817.
 84. Houshmand-Oeregaard A et al. Increased expression of microRNA-15a and microRNA-15b in skeletal muscle from adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *Hum Mol Genet.* 2018;27(10):1763-1771.
 85. Li M et al. MicroRNAs: Control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg.* 2009;33(4):667-684.
 86. Xu F et al. MicroRNA-15b/16 attenuates vascular neointima formation by promoting the contractile phenotype of vascular smooth muscle through targeting YAP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(10):2145-2152.

87. Brogi E et al. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *Am Soc Clin Investig.* 1993;92(5):2408-2418.
88. Dentelli P et al. Human IL-3 Stimulates Endothelial Cell Motility and Promotes In Vivo New Vessel Formation. *J Immunol.* 1999;163(4):2151-9.
89. Poliseno L et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 2006;108(9):3068-3071.
90. Zhu N et al. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis.* 2011;215(2):286-293.
91. Minami Y et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(5):359-367.
92. Sen A et al. MicroRNA-138 Regulates Hypoxia-Induced Endothelial Cell Dysfunction By Targeting S100A1. Ma X-L, ed. *PLoS One.* 2013;8(11):e78684.
93. Kilkenny C et al. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
94. Tirapelli LF et al. Morphometric analysis of seromucous acini and granular ducts of submandibular glands from rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev Chil Anat.* [online]. 2001;19(3):263-269.
95. Vlachos IS et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Web Serv issue Publ online.* 2015;43:1-7.
96. Lizarte FS et al. Chronic alcoholism associated with diabetes impairs erectile function in rats. *BJU Int.* 2010;105(11):1592-1597.
97. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-376.
98. Tanaka A et al. Heavy alcohol consumption is associated with impaired endothelial function: The circulatory risk in communities study (CIRCS). *J Atheroscler Thromb.* 2016;23(9):1047-1054.
99. Puddey IB et al. Alcohol and endothelial function: A brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(12):1020-1024.
100. 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. *Int J Impot Res.* 2012;24(3):91-100.

101. Meirelles RJA et al. Morphological and molecular analysis of apoptosis in the corpus cavernosum of rats submitted to a chronic alcoholism model¹. *Acta Cir Bras*. 2020;35(3):1-8.
102. Bredt DS, Snyder SH. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger Molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63(1):175-195.
103. Cerda A et al. Role of microRNAs 221/222 on statin induced nitric oxide release in human endothelial cells. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(3):195-201.
104. Ritchie R, Sullivan M. Endothelins & erectile dysfunction. *Pharmacol Res*. 2011;63(6):496-501.
105. Costa C et al. Increased endothelial apoptotic cell density in human diabetic erectile tissue - Comparison with clinical data. *J Sex Med*. 2009;6(3):826-835.
106. Pan F et al. Identification and characterization of the microRNA profile in aging rats with erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2014;11(7):1646-1656.
107. Pan F et al. Differentially expressed microRNAs in the corpus cavernosum from a murine model with type 2 diabetes mellitus - associated erectile dysfunction. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(6):2215-2224.
108. Barbery CE et al. Alterations in microRNA expression in a murine model of diet-induced vasculogenic erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2015;12(3):621-630.
109. Liu C, Cao Y, Ko TC, Chen M, Zhou X, Wang R. The changes of MicroRNA Expression in the corpus cavernosum of a rat model with cavernous nerve injury. *J Sex Med*. 2018;15(7):958-965.
110. Hadi HAR, Al Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853-876.
111. Brownlee M. biology of diabetic complications. 2001;414(December):813-820.
112. Cahill PA, Redmond EM. Alcohol and cardiovascular disease-modulation of vascular cell function. *Nutrients*. 2012;4(4):297-318.
113. Zhao J et al. Alcohol consumption and mortality from coronary heart disease: An updated meta-analysis of cohort studies. *J Stud Alcohol Drugs*. 2017;78(3):375-386.
114. Wadland WC, Ferenchick GS. Medical comorbidity in addictive disorders. *Psychiatr Clin North Am*. 2004;27(4):675-687.
115. Fleming M, Mundt M. Carbohydrate-deficient transferrin: Validity of a new alcohol biomarker in a sample of patients with diabetes and hypertension. *J Am Board Fam Pract*. 2004;17(4):247-255.

- 116.Dawson DA. US low-risk drinking guidelines: An examination of four alternatives. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(12):1820-1829.
- 117.Turner BC et al. The effect of evening alcohol consumption on next-morning glucose control in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24(11):1888-1893.
- 118.Cox WM et al. Diabetic patients' alcohol use and quality of life: Relationships with prescribed treatment compliance among older males. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(2):327-331.
- 119.Engler PA, Ramsey SE, Smith RJ. Alcohol use of diabetes patients: The need for assessment and intervention. *Acta Diabetol*. 2013;50(2):93-99.
- 120.Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-2092.
- 121.Cheng Y et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119(2):87-95.
- 122.Fichtlscherer S et al. Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2010;107(5):677-684.
- 123.Ren R et al. miRNA-138 regulates MLK3/JNK/MAPK pathway to protect BV-2 cells from H₂ O₂ -induced apoptosis. *Bratisl Med J*. 2018;119(5):284-288.
- 124.He S et al. MiR-138 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis via MLK3/JNK/c-jun pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(4):763-769.

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 112/2007, sobre o projeto intitulado “*Estudo da disfunção erétil em ratos submetidos ao alcoolismo crônico e diabetes mellitus por meio da avaliação endotelial*”, sob a responsabilidade do **Professor Antonio Carlos Pereira Martins**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **24 de setembro de 2007**.

(We certify that the protocol nº 112/2007, about “*Study of the erectile dysfunction in mice submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus by means of the endothelial evaluation*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 09/24/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2007.

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

11. *Apêndices*

APÊNDICE A

Tabela 1 - Valores da expressão dos **miRNAs no corpo cavernoso** os dados estão expressos como medianas e Intervalos interquartis

	Grupo Controle	Grupo A	Grupo D	Grupo D + A
miRNA 15b	1,10[0,56-1,80]	0,47[0,05-9,71]	0,05[0,03-0,18]	0,07[0,02-0,41]
miRNA 16	1,03[0,77-2,37]	0,61[0,09-10,61]	0,13[0,06-0,24]	0,12[0,05-0,50]
miRNA 138	0,80[0,51-2,20]	0,35[0,07-5,79]	0,21[0,06-0,51]	0,14[0,03-0,57]
miRNA 221	1,01[0,48-2,08]	0,33[0,08-7,14]	0,04[0,03-0,16]	0,03[0,02-0,39]
miRNA 222	0,81[0,53-2,22]	0,49[0,09-8,18]	0,10[0,06-0,21]	0,06[0,02-0,32]

Tabela 2- Valores de p análise estatística da expressão dos miRNAs no corpo cavernoso

	Kruskall-Walis	Pós Teste de Dunn		
		C vs A	C vs D	C vs A+D
miRNA 15b	0,051	>0,999	0,056	0,074
miRNA 16	0,045	>0,999	0,064	0,049
miRNA 138	0,158	>0,999	0,233	0,111
miRNA 221	0,044	>0,999	0,074	0,048
miRNA 222	0,035	>0,999	0,097	0,030

APÊNDICE B

Tabela 3- Valores da expressão dos **miRNAs no sangue** os dados estão expressos como medianas e Intervalos interquartis

	Grupo Controle	Grupo A	Grupo D	Grupo D + A
miRNA 15b	1,34[0,68-2,90]	0,09[0,05-0,17]	0,06[0,03-0,29]	0,02[0,01-0,31]
miRNA 16	1,27[0,54-3,14]	0,11[0,07-0,20]	0,02[0,01-0,13]	0,007[0,004-0,141]
miRNA 138	1,1[0,50-4,78]	0,19[0,14-0,21]	0,0003[0,0001-0,0023]	0,0002[0,0001-0,0003]
miRNA 221	1,00[0,50-3,47]	0,09[0,05-0,15]	0,002(0,0006-0,0742)	0,001(0,0007-0,0125)
miRNA 222	1,13[0,45-3,41]	0,10[0,08-0,21]	0,001(0,0005-0,006)	0,0004[0,0002-0,0058]

Tabela 4- Valores de p análise estatística da expressão dos miRNAs no sangue

	Kruskall-Walis	Pós Teste de Dunn		
		C vs A	C vs D	C vs A+D
miRNA 15b	0.0374	0,143	0,049	0,026
miRNA 16	0,0218	0,598	0,048	0,013
miRNA 138	0,0002	>0,999	0,015	0.011
miRNA 221	0,0014	0,785	0,003	0,004
miRNA 222	0,0013	0,785	0,008	0,001