

PATRÍCIA RODRIGUES CANDIDO

**Avaliação do papel terapêutico do microRNA-29b em um modelo
pré-clínico da doença de Peyronie**

São Paulo

2022

PATRÍCIA RODRIGUES CANDIDO

**Avaliação do papel terapêutico do microRNA-29b em um modelo
pré-clínico da doença de Peyronie**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Thalita
dos Reis Faria

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Candido, Patricia Rodrigues
Avaliação do papel terapêutico do microRNA-29b em
um modelo pré-clínico da doença de Peyronie /
Patricia Rodrigues Candido. -- São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Colágeno 2.Doença de Peyronie
3.Fator de crescimento transformador beta 1
4.Fibrose 5.Matriz extracelular 6.microRNA

USP/FM/DBD-366/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A Deus e aos meus pais Adevanir e Raquel, com todo o meu amor e carinho, agradeço por tudo o que fazem para a realização dos meus sonhos e por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus e a Nossa Senhora Aparecida**, pelas bênçãos e graças concedidas, e pela proteção em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora **Profa. Dra. Sabrina Reis**, por ter me aceitado como sua aluna, por ter me dado essa grande oportunidade e tantas outras que me deu, por ter acreditado e confiado em mim. Muito obrigada pela dedicação ao meu trabalho e pelo carinho que sempre teve em me ajudar em todos os momentos e me apoiar sempre que eu preciso.

À **Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite**, pela oportunidade única de estar no LIM55 ao seu lado. Agradeço por todos os ensinamentos, por me incentivar e principalmente pela paciência e pelo carinho que sempre teve por mim e pelo meu trabalho.

Em especial a minha querida amiga e prima **Dra. Nayara Viana**, que viu em mim a capacidade de desenvolver esse trabalho e graças ao seu incentivo e apoio incondicional sempre, eu consegui. Agradeço a você, ao seu esposo **Carlos Eduardo** e aos seus pais **Antônio Viana e Rozilane Viana**, por terem me acolhido e por terem sido a primeira mão estendida para que eu pudesse estar aqui realizando esse sonho.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, por sempre incentivar e apoiar todos os trabalhos realizados no LIM55.

Ao **Prof. Dr. William Nahas e Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes**, pelo empenho em conduzirem da melhor forma o programa de pós-graduação da Disciplina de Urologia.

Ao **Prof. Dr. José Cury** (*in memoriam*) pelos ensinamentos e a toda equipe da Medicina Sexual do HCFMUSP que se empenhou na coleta das amostras dos pacientes. Ao **Bruno Nascimento e Pedro Daher**, também pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao **Dr. Victor Srougi**, pela oportunidade que me deu e por toda a confiança, apoio e compreensão.

A todos os funcionários da Urologia, especialmente a secretária da pós-graduação **Elisa Cruz**, por toda a ajuda durante o período do mestrado e às secretárias **Inisabete, Tereza e Aparecida**, pelo tempo que convivemos durante a pandemia, sempre dispostas a nos ajudar.

Ao **Iran Amorim Silva**, agradeço por todos os ensinamentos no laboratório e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos do LIM55 que me ajudaram e me apoiaram imensamente durante todo o trabalho, **Dra. Juliana Camargo, Me. Gabriel Arantes, Vitória Ghazarian, Gustavo Inoue e Fabio Gallucci**. Em especial agradeço a **Caroline Chiovatto**, que caminhou ao meu lado e me ajudou durante toda a execução do trabalho.

À **Me. Vanessa Guimarães**, agradeço por todos os ensinamentos durante todo esse tempo, por sua generosidade e disposição sempre em me ajudar quando eu mais preciso.

Ao meu grande amigo **Me. Ruan Pimenta**, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado desde a graduação. Agradeço a amizade de longa data, por ter acreditado que eu era capaz e por me ajudar sempre que eu preciso.

À minha querida amiga **Me. Poliana Romão**, que se tornou uma grande companheira e minha dupla durante todo esse tempo. Agradeço por sempre estar disposta a me ouvir e me ajudar em tudo e em todos os momentos.

À minha amiga **Francismara Melo**, por sempre ter me apoiado nessa caminhada e se preocupado comigo, agradeço pela amizade sincera e pelo carinho que tem por mim.

Aos meus queridos pais **Adevanir e Raquel**, agradeço por tudo que me ensinaram e ensinam até hoje, pelo apoio incondicional que sempre me deram em todas as decisões da minha vida e por terem sempre feito de tudo para a minha felicidade. Agradeço por sempre estarem ao meu lado e por sempre acreditarem em mim. Mãe, obrigada por cuidar tão bem da minha Melissa. Amo muito vocês.

Ao meu querido irmão **Douglas Candido**, agradeço por sempre me apoiar e ficar orgulhoso das minhas conquistas.

Ao meu noivo, **Otávio Viana**, meu amor e companheiro de todos os momentos. Agradeço por nunca medir esforços para a nossa felicidade, por incentivar todos os meus sonhos e por todo o apoio, dedicação, compreensão, carinho e paciência comigo todos os dias. Amo você.

À toda a minha família, agradeço especialmente a minha avó **Nadir Ribeiro** (*in memoriam*), que desde quando eu era pequena sempre acreditou na minha capacidade e me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos, saudades eternas.

RESUMO

Candido PR. Avaliação do papel terapêutico do microRNA-29b em um modelo pré-clínico da doença de Peyronie [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A doença de Peyronie (DP) é caracterizada pela formação de placas fibróticas na túnica albugínea (TA) do pênis. Os tratamentos efetivos são limitados e a cirurgia continua sendo a melhor opção, apesar de não regredir a doença. Nesse sentido, é crescente a busca por novas opções de tratamento. A terapia com microRNAs (miRNAs) é uma alternativa atraente para diversas patologias, por atuarem na regulação da expressão gênica. O miRNA-29b está envolvido na regulação de genes da matriz extracelular, como os genes de colágenos, e sua expressão diminuída pode ser encontrada em doenças fibróticas, inclusive na DP. Uma vez que o aumento da síntese de colágeno é fundamental para o desenvolvimento de fibrose, o controle da expressão de genes envolvidos na DP por miRNA, pode tornar-se uma estratégia terapêutica potencial. E ainda não existem estudos que avaliaram o papel terapêutico do miRNA-29b na DP. **Objetivos:** Caracterizar o perfil de expressão gênica do COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 em amostras de tecido peniano de pacientes com a DP e em indivíduos sem a doença. Estabelecer o modelo pré-clínico da DP e avaliar o papel terapêutico do miRNA-29b *in vivo*. Analisar a expressão do miRNA-29b e dos genes COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1, antes e após o tratamento com o miRNA. **Métodos:** O estudo com os pacientes, foi composto por 8 amostras de placa fibrótica e 11 amostras da TA adjacente de indivíduos com DP. O grupo Controle foi composto por 13 amostras da TA de pacientes sem DP. Para o tratamento *in vivo*, 18 ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley* foram divididos em grupo Controle (n = 6), grupo Fibrose+miRNA-29b (n = 6) e grupo Fibrose+miRNA negativo (*Scramble*) (n = 6). A indução da placa fibrótica ocorreu através de injeções na TA de 100 μ L de solução fibrina e 100 μ L de solução trombina. O tratamento com o *mimic* do miRNA-29b ou seu controle negativo foi realizado após as injeções de fibrina e os grupos Controle receberam injeções de salina. Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados e tiveram o tecido peniano coletado. **Resultados:** Nas amostras dos pacientes, os genes COL1A1 e COL3A1 foram superexpressos no grupo Peyronie Placa (p = 0,02 e p = 0,02, respectivamente) e no grupo Peyronie TA adjacente (p = 0,02 e p = 0,05, respectivamente) quando comparados ao grupo Controle. O TGF- β 1 foi subexpresso no grupo Peyronie Placa em relação ao Controle (p = 0,005). O estabelecimento do modelo pré-clínico foi confirmado a partir das análises histopatológicas com a identificação de fibrose. Após o tratamento, o grupo Fibrose+miRNA-29b apresentou diminuição do processo fibrótico na TA. O miRNA-29b foi superexpresso neste grupo em relação ao *Scramble* e Controle (p = 0,02 e p = 0,003, respectivamente). O COL1A1 e o COL3A1 foram subexpressos no grupo Fibrose+miRNA-29b em relação ao *Scramble* e Controle (p = 0,02 e p = 0,02, respectivamente), e o TGF- β 1 também foi subexpresso no grupo tratado em relação ao *Scramble* (p = 0,001). **Conclusão:** Nas amostras teciduais dos pacientes, o COL1A1 e COL3A1 foram superexpressos na placa e TA adjacente e o TGF- β 1 subexpresso na placa fibrótica. Confirmamos o estabelecimento do modelo pré-clínico da DP, com subexpressão do miRNA-29b e superexpressão dos genes COL1A1 e TGF- β 1. Após o tratamento, demonstramos que a superexpressão do miRNA-29b foi capaz de atenuar a fibrose no modelo de rato da DP.

Palavras-chave: Colágeno. Doença de Peyronie. Fator de crescimento transformador beta 1. Fibrose. Matriz extracelular. MicroRNA.

ABSTRACT

Candido PR. Evaluation of the therapeutic role of microRNA-29b in a preclinical model of Peyronie's disease [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Introduction: Peyronie's disease (PD) is characterized by the formation of fibrotic plaques on the tunica albuginea (TA) of the penis. Effective treatments are limited, and surgery remains the best option, although it does not regress the disease. In this sense, the search for new treatment options is growing. The therapy with microRNAs (miRNAs) is an attractive alternative for several pathologies because they act in the regulation of gene expression. The miRNA-29b regulates extracellular matrix genes, such as collagen genes, and its decreased expression can be found in fibrotic diseases, including PD. Since increased collagen synthesis is critical for the development of fibrosis, controlling the expression of genes involved in PD by miRNA may become a potential therapeutic strategy. And there are still no studies evaluating the therapeutic role of miRNA-29b in PD. **Aims:** To characterize the gene expression profile of COL1A1, COL3A1, and TGF- β 1 in penile tissue samples from patients with PD and individuals without the disease. To establish the preclinical PD model and evaluate the therapeutic role of miRNA-29b in vivo. To analyze the expression of miRNA-29b and genes COL1A1, COL3A1 and TGF- β 1 before and after treatment with miRNA. **Methods:** The study with patients was composed of 8 fibrotic plaque samples and 11 samples of the adjacent TA from individuals with PD. The Control group was composed of 13 samples from the TA of patients without PD. For in vivo treatment, 18 male Sprague-Dawley rats were divided into Control group (n = 6), Fibrosis+miRNA-29b group (n = 6) and Fibrosis+miRNA negative (Scramble) group (n = 6). Fibrotic plaque induction occurred by injections into the TA of 100 μ L of fibrin solution and 100 μ L of thrombin solution. Treatment with miRNA-29b mimic or its negative control was performed after the fibrin injections, and the Control groups received saline injections. At the end of the study, the animals were euthanized, and penile tissue was collected. **Results:** In patient samples, COL1A1 and COL3A1 genes were overexpressed in the Peyronie Plaque group (p = 0.02 and p = 0.02, respectively) and the adjacent Peyronie TA group (p = 0.02 and p = 0.05, respectively) when compared to the Control group. TGF- β 1 was underexpressed in the Peyronie Plaque group compared to the Control (p = 0.005). The establishment of the preclinical model was confirmed from the histopathological analyses with the identification of fibrosis. After treatment, the Fibrosis+miRNA-29b group showed a decreased fibrotic process in the TA. The miRNA-29b was overexpressed in this group compared to Scramble and Control (p = 0.02 and p = 0.003, respectively). COL1A1 and COL3A1 were underexpressed in the Fibrosis+miRNA-29b group relative to Scramble and Control (p = 0.02 and p = 0.02, respectively), and TGF- β 1 was also underexpressed in the treated group relative to Scramble (p = 0.001). **Conclusion:** In patients, COL1A1 and COL3A1 were overexpressed in plaque and adjacent TA, and TGF- β 1 was underexpressed in fibrotic plaque. We confirmed the establishment of the preclinical model of PD, with underexpression of miRNA-29b and overexpression of COL1A1 and TGF- β 1 genes. After treatment, we demonstrated that overexpression of miRNA-29b attenuated fibrosis in the rat model of PD.

Keywords: Collagen. Peyronie's disease. Transforming growth factor beta 1. Fibrosis. Extracellular matrix. MicroRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Demonstração da localização da placa fibrosa no pênis.....	18
Figura 2 - Esquema representativo da biogênese do miRNA.....	23
Figura 3 - Delineamento experimental do estabelecimento do modelo animal da DP	34
Figura 4 - Selante de fibrina: Componente 1 composto por solução de proteína selante (fibrinogênio humano e aprotinina sérica) e componente 2 composto por solução de trombina (trombina humana e cloreto de cálcio). Lote: D4V027AA e Validade: 04/2022	35
Figura 5 – (a) Duas seringas de insulina de 1mL com a solução 1 (proteína selante) e solução 2 (trombina) adaptadas para as aplicações e conectadas a uma peça de junção com uma agulha de calibre 26; (b) Momento da aplicação das soluções de trombina e fibrina no animal do grupo Fibrose	36
Figura 6 - Imagens do animal anestesiado para coleta dos espécimes cirúrgicos. (a) Animal com o pênis distendido; (b) Momento antes da penectomia	37
Figura 7 - Delineamento experimental.....	39
Figura 8 - Aplicação das injeções de tratamento com o miRNA nos animais.....	39
Figura 9 - Análise da expressão gênica de COL1A1. (a) Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste de Mann-Whitney; (b) Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste T de Student.....	43
Figura 10 - Análise da expressão gênica de COL3A1. (a) Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste T de Student; (b) Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste T de Student.....	44
Figura 11 - Análise da expressão gênica de TGF- β 1. (a) Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste T de Student; (b) Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste de Mann-Whitney	45
Figura 12 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de rato dos dois grupos analisados. TA: túnica albugínea; CC: corpo cavernoso; V: veia dorsal; U: uretra. (a) Grupo Controle e coloração de HE; (b) Grupo controle e coloração de Tricômico de Masson; (c) Grupo Controle e coloração de Verhoeff; (d) Grupo Fibrose e coloração de HE; (e) Grupo Fibrose e coloração de Tricômico de Masson; (f) Grupo Fibrose e coloração de Verhoeff. Ampliação de 40x.....	46
Figura 13 - Fotomicrografias do corte transversal de um animal do grupo Controle. (a) Coloração de HE, ampliação de 100x; (b) Coloração de HE, ampliação de 200X; (c) Coloração de Tricômico de Masson, ampliação de 200x; (d) Coloração de Verhoeff, ampliação de 200x. A setas pretas indicam ausência de alterações nas fibras colágenas. A seta azul indica ausência de alterações nas fibras elásticas.....	47
Figura 14 - Fotomicrografias do corte transversal de um animal do grupo Fibrose. (a) Coloração de HE, ampliação de 100x; (b) Coloração de HE, ampliação de 200x; (c) Coloração de Tricômico de Masson, ampliação de 200x; (d) Coloração de Verhoeff, ampliação de 200x. As setas pretas indicam alterações histológicas. A seta vermelha indica inflamação. Setas azuis indicam alterações nas fibras elásticas	48
Figura 15 - Análise dos níveis de expressão do miRNA-29b no tecido peniano dos animais do grupo Controle e grupo Fibrose; teste T de Student	49

Figura 16 - Análise dos níveis de expressão dos genes COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 nos animais do grupo Controle e Grupo Fibrose. (a) Comparação de COL1A1 entre os grupos; (b) Comparação de COL3A1 entre os grupos; (c) Comparação de TGF- β 1 entre os grupos; teste de Mann-Whitney.....	50
Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de rato dos grupos Controle, Scramble e Fibrose+miRNA-29b, nas três colorações (HE, Tricômico de Masson e Verhoeff). Ampliação de 40x.....	51
Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de ratos dos três grupos nas colorações de HE, Tricômico de Masson e Verhoeff. (a, b, c) grupo Controle; (d, e, f) grupo Scramble; (g, h, i) grupo Fibrose+miRNA-29b. As setas pretas indicam ausência ou presença de alterações nas fibras colágenas. Setas vermelhas indicam inflamação. Setas azuis indicam ausência ou presença de alterações nas fibras elásticas. Ampliação de 200x.....	53
Figura 19 - Análise da expressão do miRNA-29b entre os grupos após o tratamento. O miRNA-29b foi superexpresso no grupo Fibrose+miRNA-29b em comparação ao Scramble e Controle.....	54
Figura 20 - Análise da expressão gênica de COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 entre os grupos. (a) O gene COL1A1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em comparação ao Scramble; (b) O gene COL3A1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em relação ao Controle; (c) O gene TGF- β 1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em relação ao Scramble e superexpresso no grupo Scramble em comparação ao grupo Controle.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos analisados e idade dos pacientes	30
Tabela 2 - Sondas utilizadas para quantificação da expressão dos genes estudados nos pacientes	32
Tabela 3 - Grupo de animais utilizados para o tratamento.....	38
Tabela 4 - Sondas utilizadas para quantificação da expressão dos genes e do miRNA nos animais	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B2M – Beta 2-microglobulina

CCH – Collagenase *Clostridium Histolyticum*

cDNA – DNA complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

COL1A1 – Colágeno tipo I alfa 1

COL3A1 – Colágeno tipo III alfa 1

DE – Disfunção erétil

DP – Doença de Peyronie

FDA – *Food and Drug Administration*

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HE – Hematoxilina e Eosina

MEC – Matriz extracelular

miRNA - microRNA

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

Polietilenoimina - PEI

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo

RNA_m – RNA mensageiro

TA – Túnica albugínea

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β 1 – Fator de crescimento transformador beta 1

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Doença de Peyronie	17
1.2	Fisiopatologia da DP	18
1.3	Manifestações clínicas e diagnóstico	20
1.4	Métodos terapêuticos	21
1.5	MicroRNAs	22
1.5.1	Biogênese dos miRNAs	22
1.5.2	MiRNAs e fibrose	24
1.5.3	MiRNA-29b	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MÉTODOS	29
3.1	Pacientes	30
3.2	Extração de RNA total	31
3.3	Transcrição Reversa (RT)	32
3.4	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo	32
3.5	Estudos <i>in vivo</i>	33
3.6	Modelo pré-clínico da DP	33
3.7	Tratamento dos animais com o miRNA-29b	37
3.8	Processamento e análise histopatológica	39
3.9	Análise de expressão do miRNA e dos genes nos espécimes provenientes do tecido peniano dos animais	40
3.10	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Análise da expressão gênica de COL1A1 nas amostras teciduais dos pacientes	43
4.2	Análise da expressão gênica de COL3A1 nos pacientes	44

4.3	Análise da expressão gênica de TGF- β 1 nos pacientes	44
4.4	Modelo experimental da DP	45
4.5	Expressão do miRNA-29b no modelo animal.....	49
4.6	Expressão gênica de COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 no modelo animal.....	49
4.7	Análise histopatológica dos tecidos penianos dos animais após o tratamento com o miRNA-29b.....	50
4.8	Análise molecular do miRNA-29b no tecido peniano dos animais após o tratamento.....	54
4.9	Análise molecular dos genes no tecido peniano dos animais após o tratamento.....	55
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	64
7	ANEXOS	66
8	REFERÊNCIAS	72
9	APÊNDICES	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Peyronie

A doença de Peyronie (DP) é uma condição fibrótica adquirida, caracterizada pela formação de tecido cicatricial fibroso (placa), na túnica albugínea (TA) do pênis (1). Clinicamente, pode ser acompanhada por dor, curvatura peniana quando em ereção, além de estar frequentemente associada à disfunção erétil (DE). Embora a DP tenha sido observada pela primeira vez no ano de 1561 por Fallopius e Vesalius, foi no ano de 1743 que o cirurgião francês François Gigot de La Peyronie a descreveu totalmente e desde então se originou o nome da doença (2).

De acordo com a literatura, a taxa de incidência da DP está estimada entre 1 a 13% em toda a população masculina, contudo, a verdadeira prevalência tende a ser subnotificada, provavelmente pela relutância de alguns homens em procurar orientação médica, por constrangimento ou por acreditarem ser uma condição intratável. Os dados disponíveis sobre a DP podem variar de acordo com a metodologia utilizada e população estudada, e embora a doença seja comumente relatada em homens a partir dos 40 ou 50 anos de idade, pode acometer homens de todas as faixas etárias. No Brasil, existem poucos estudos sobre a incidência da doença, entretanto Rhoden et al., relataram que a DP está presente em 3,67% da população masculina no sul do país (3, 4).

Devido à natureza complexa de sua etiologia, a DP permanece sendo um desafio para a medicina, considerando o aspecto terapêutico e o impacto psicológico que a doença pode acarretar aos indivíduos, muitas vezes impossibilitando as relações sexuais penetrativas, o que traz grande prejuízo para a qualidade de vida do homem. Além dos sintomas físicos e sexuais decorrentes da doença, muitos homens relatam sofrer de depressão, ansiedade, baixa autoestima e angústia (3, 5).

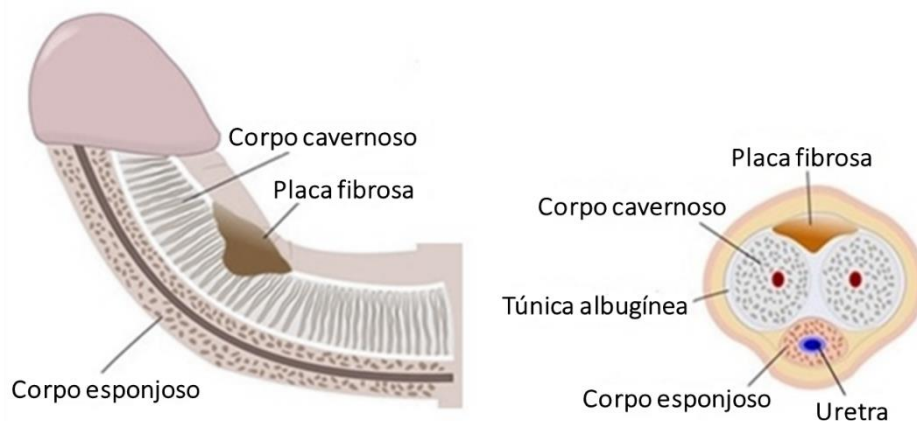
A DP pode estar associada a presença de outras doenças que envolvem o tecido conjuntivo, como a doença de Dupuytren e de Ledderhose (6). Fatores de risco como diabetes, tabagismo, obesidade, idade avançada e altos níveis de vitamina D também já foram correlacionados com uma maior incidência da doença (7, 8). Além disso, estudos apontam que a prevalência de DE em pacientes com DP pode chegar a 54% (4, 8).

1.2 Fisiopatologia da DP

A fisiopatologia da DP é considerada multifatorial e tem sido alvo de diversas pesquisas científicas nas últimas décadas, pelo fato do mecanismo pelo qual ela acontece, ainda não estar totalmente definido (9). A teoria mais aceita é de que a formação de áreas fibróticas na TA, seja ocasionada por microtraumas repetitivos no pênis a longo prazo, em homens com predisposição ao desenvolvimento de fibrose (10). Como consequência, ocorre um processo inflamatório local exacerbado e conseguinte deposição de colágeno, resultando em perda de elasticidade (linear e/ou radial) e formação de placa fibrótica, muitas vezes calcificadas (11).

A TA é uma estrutura bilaminar composta por uma camada externa longitudinal e uma camada interna, constituída de fibras colágenas e elásticas que envolvem os corpos cavernosos, proporcionando flexibilidade, rigidez e resistência ao tecido peniano (12). Alterações estruturais e histológicas na TA características da DP, já foram demonstradas tanto em modelos animais, quanto em amostras de biópsias e espécimes de cadáveres de pacientes portadores da doença (13). Tais alterações incluem a deposição excessiva de colágeno, ruptura das fibras elásticas e presença anormal de fibrina (14). Considerando a anatomia peniana, as placas fibróticas geralmente se concentram na região dorsal ou dorso lateral do pênis e com menos frequência na região ventral (Figura 1) (15).

Figura 1 - Demonstração da localização da placa fibrosa no pênis



Fonte: Adaptado de Graziottin, TM (15).

De forma geral, a DP pode ser dividida em duas fases, que caracterizam o percurso da doença. A fase aguda ou ativa, tem duração de 12 a 18 meses e se inicia com o processo inflamatório agudo local, seguido de proliferação fibroblástica e deposição demasiada de colágeno. A fase crônica ou estável, é caracterizada pelo desaparecimento da dor, estabilização da placa fibrótica e determinação da curvatura peniana, sendo esta fase mais associada à DE (16).

Durante a fase aguda da doença, a primeira etapa envolvida é a fase inflamatória, tendo início com o rompimento dos vasos sanguíneos, seguido da liberação de plaquetas e fatores de crescimento em resposta à lesão no tecido, que levam a formação do coágulo de fibrina. Em seguida, ocorre a fase proliferativa, caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos, os quais sofrem o processo de diferenciação em miofibroblastos, através da ação do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), com o objetivo de sintetizar colágeno e contrair a ferida. A placa fibrótica geralmente é formada na fase aguda. Já a fase crônica da DP, é determinada pela fase de remodelação da matriz extracelular (MEC) e deposição de mais colágeno, levando à uma cicatrização excessiva e conseqüentemente a formação de fibrose. Nesta última fase ocorre a estabilização da curvatura peniana. Assim, a patologia da fibrose inerente à DP, tem como principal característica a cicatrização anormal do tecido com deposição excessiva de colágeno, atribuída a processos inflamatórios e lesões crônicas de reparo (17, 18).

O TGF- β é um fator de crescimento que atua como um mediador multifuncional em vários processos biológicos, incluindo a fibrose. A família do TGF- β é composta por três isoformas (TGF- β 1, TGF- β -2 e TGF- β -3) (19). O TGF- β 1 se destaca como sendo um importante mediador de componentes da MEC, atuando por meio de uma via de sinalização canônica que abrange a fosforilação e ativação de mediadores a jusante, como as proteínas Smads. Foi demonstrado que a alta expressão de TGF- β 1 está intensamente ligada ao processo de fibrose peniana (20, 21).

Os miofibroblastos são considerados elementos de grande importância no processo fibrótico, pois atuam na síntese dos colágenos fibrilares do tipo I e III, apontados como os principais componentes da MEC e as proteínas mais abundantes durante a fase de cicatrização de feridas. Essas proteínas são codificadas pelos genes COL1A1 (colágeno tipo I alfa 1) e COL3A1 (colágeno tipo III alfa 1), e a

superexpressão destes genes está relacionada a deposição excessiva de tecido cicatricial em doenças fibróticas (22, 23).

1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico

Na fase aguda da DP quando a inflamação está presente, a apresentação clínica pode ser variável e incluir sintomas de dor local, curvatura peniana durante a ereção, presença de placa palpável ou DE (24). Na fase crônica, geralmente a dor desaparece e ocorre a estabilização da placa fibrótica, e nos casos de progressão para a cirurgia, é comum o paciente relatar ansiedade em relação as opções de tratamento disponíveis, a possíveis complicações e recorrência da doença (25, 26).

O diagnóstico pode ser feito com base na história clínica do paciente, exame físico peniano e análise de imagem (27). A avaliação da história clínica deve evidenciar o início e duração dos sintomas apresentados pelos pacientes, principalmente se há ou não a presença de dor, o que pode auxiliar na determinação da fase em que a doença se encontra. A investigação da presença de outras doenças fibroproliferativas, como também possíveis fatores de risco, deve ser realizada. Ainda não há marcadores laboratoriais específicos para o diagnóstico da DP (27, 28).

O exame físico peniano deve avaliar a aparência do pênis flácido, comprimento peniano, rigidez, curvatura durante a ereção e presença de placa palpável. Normalmente a palpação é a forma mais simples de diagnóstico da placa fibrótica, e o grau de curvatura pode ser melhor avaliado através de um ultrassom doppler peniano, após estimulação farmacológica da ereção (28, 29).

Os exames de imagem são geralmente solicitados apenas se uma possível intervenção cirúrgica é considerada e podem ser realizados por algumas modalidades, as quais fornecem informações sobre a curvatura peniana, características da placa e sua localização precisa, além de avaliarem a função erétil do tecido. Dessa forma, esse conjunto de informações pode direcionar o tratamento mais adequado para cada paciente (30).

1.4 Métodos terapêuticos

De acordo com os *guidelines* da sociedade americana e europeia de DP, a escolha da melhor forma de tratamento, bem como o momento ideal para uma intervenção deve levar em consideração a fase da doença, a severidade, complexidade da deformidade peniana, qualidade da função erétil e comprimento peniano (31).

As opções de tratamento podem variar de acordo com a gravidade da deformidade peniana e estabilidade dos sintomas apresentados (32). A terapia não cirúrgica para a DP, está indicada principalmente na fase aguda da doença, em que os sintomas se iniciam, tendo como objetivo apenas aliviar os mesmos (33). Entre as opções de medicamentos, estão a vitamina E (36), a colchicina (34,36), aminobenzoato de potássio (Potaba) (34), Ésteres acetílicos de carnitina (38), L-arginina (34), Verapamil (34) e gel H-100. Entretanto, a terapia com medicação oral é contraindicada por falta de evidência científica robusta (39).

A terapia com injeções intralesionais permite que concentrações elevadas de agentes farmacológicos sejam entregues diretamente na placa fibrótica, representando uma modalidade de tratamento menos invasiva comparada as técnicas cirúrgicas. Diversos agentes já foram sugeridos, sendo que os mais utilizados atualmente na prática clínica incluem o verapamil, interferon alfa-2b e mais recentemente a collagenase *Clostridium Histolyticum* (CCH) (32). É possível também a realização da terapia mecânica, uso de dispositivos à vácuo e terapia com ondas de choque extracorpóreo de baixa intensidade (25).

A resolução espontânea da doença não é descrita, e a maioria dos pacientes notam uma piora da deformidade no período de 12 a 18 meses após o aparecimento da lesão. Nos casos mais graves de deformidade peniana, em que o paciente é incapacitado de ter relações sexuais satisfatórias, a cirurgia é considerada a melhor opção (34). As opções incluem técnicas de plicatura da túnica, incisão, excisão (parcial ou completa) da placa com colocação de enxerto e em alguns casos colocação de prótese peniana para homens com DE concomitante (35). É importante ressaltar que o tratamento cirúrgico, apesar de eficaz, visa contornar a deformidade peniana adquirida, não sendo capaz de regredir a doença propriamente dita. Além

disso, pode acarretar alguns efeitos adversos, como DE pós-operatória, perda sensorial e encurtamento do pênis, o que pode representar uma condição muito desfavorável para o paciente (36).

Embora existam muitas opções de tratamento para a DP, a literatura demonstra que os efeitos a longo prazo são conflitantes e controversos, e os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da fibrose crônica e progressiva, ainda não estão totalmente claros (33, 37). Nesse sentido, investigar potenciais alvos moleculares, poderiam fornecer alternativas ao tratamento cirúrgico, como os microRNAs (miRNAs), que são candidatos promissores para aplicações terapêuticas, atuando como importantes reguladores da expressão gênica (38).

1.5 MicroRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples não codificantes de proteínas, compostas por aproximadamente 22 nucleotídeos, com capacidade de regular a expressão gênica a nível pós-transcricional por emparelhamento de bases com o RNAm alvo. Acredita-se que os miRNAs podem regular a expressão de inúmeros genes, incluindo aqueles que estão envolvidos no processo fibrótico (39), atuando em diversas vias de regulação celular, como crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose (40).

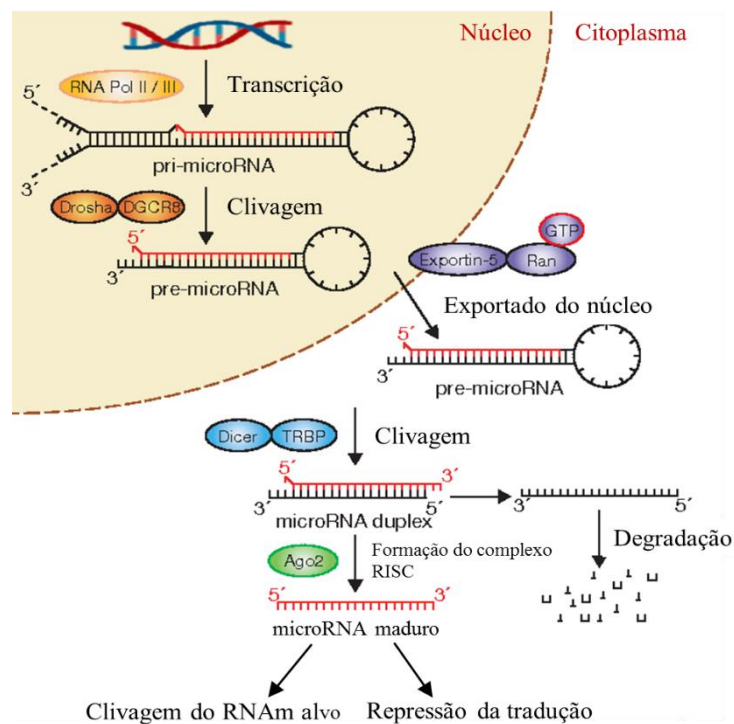
O primeiro miRNA foi descoberto em 1993, no entanto, somente no ano de 2000, os miRNAs foram reconhecidos como reguladores biológicos (41). O miRNA maduro se liga à extremidade da região 3' não traduzida do RNAm alvo, levando à repressão da tradução ou induzindo a clivagem ou inibição do RNAm. Vários miRNAs podem regular a expressão de um mesmo RNAm, por outro lado, um único miRNA pode regular diferentes RNAm alvo (42).

1.5.1 Biogênese dos miRNAs

Cerca de 52% dos miRNAs humanos estão localizados em regiões intergênicas e 40% em regiões intrônicas (43). A biogênese dos miRNAs tem início no núcleo, onde

são sintetizados pela RNA polimerase II e modificados após a transcrição pelo acréscimo de uma *cap* na região 5' e uma cauda poli A na região 3', para produzir o transcrito primário longo denominado pri-miRNA, que abriga uma estrutura do tipo *hairpin*. Ainda no núcleo, o pri-miRNA é submetido à ação do complexo microprocessador que contém a enzima Drosha, e então é convertido em pré-miRNA, uma molécula de fita dupla de aproximadamente 60-70 nucleotídeos (42, 44). O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, uma proteína especializada no transporte núcleo-citoplasmático de macromoléculas, incluindo os ácidos ribonucleicos (45). No citoplasma, o pré-miRNA é submetido à clivagem pela enzima Dicer, transformando-se em um miRNA duplex, contendo o miRNA maduro e sua fita complementar. Novamente a Dicer cliva essa dupla fita dando origem ao miRNA maduro de fita única de aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos, que então é incorporado a um complexo efetor denominado RISC (complexo silenciador induzido por RNA) (46, 47). Este complexo guia o miRNA maduro até o seu RNAm alvo, e então ocorre a repressão da tradução da proteína ou a degradação do RNA. Esta ação dependerá do grau de complementariedade do miRNA com o seu RNAm alvo (Figura 2), podendo este pareamento ser perfeito ou incompleto (47).

Figura 2 - Esquema representativo da biogênese do miRNA



Fonte: Adaptado de Winter, J et al., (47).

1.5.2 MiRNAs e fibrose

Os miRNAs são importantes na manutenção do genoma e auxiliam no equilíbrio da expressão gênica, assim sendo, qualquer distúrbio desse equilíbrio mediado por miRNA pode levar a ocorrência de doenças, incluindo a fibrose (48). Uma vez que o aumento da síntese e secreção de colágeno e outras proteínas da MEC é um passo crítico na formação de fibrose, direcionar a síntese proteica desses componentes por miRNA tornou-se uma estratégia terapêutica potencial para a fibrose tecidual (49).

Esses miRNAs desregulados podem representar novos alvos terapêuticos, como os miRNAs da família miRNA-29, que têm sido demonstrados como antifibróticos em diferentes modelos animais com fibrose tecidual. A família do miRNA-29 inclui o miRNA-29a, miRNA-29b e miRNA-29c, sendo que o miRNA-29a e o 29b são codificados no cromossomo 7, enquanto o miRNA-29c é codificado no cromossomo 1 (50, 51).

Vários genes de MEC, incluindo os colágenos, estão entre os principais alvos previstos dessa família (52). Múltiplos fatores podem regular a expressão do miRNA-29 a nível transcricional, incluindo o TGF- β , que quando aumentado, pode diminuir a sua expressão. Acredita-se que o miRNA-29 atua como um regulador mestre na MEC, além disso, o miRNA-29b parece estar relacionado à síntese de colágeno em fibroblastos (53).

1.5.3 MiRNA-29b

O miRNA-29b está relacionado a diversos processos biológicos, incluindo a regulação da MEC, e sua expressão diminuída pode ser encontrada em várias doenças fibróticas, como na fibrose pulmonar (54), cardíaca (52), hepática (55) e renal (56). Sabe-se que o miRNA-29b pode ser considerado um potente miRNA antifibrótico e que após a sua superexpressão induzida tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é possível verificar uma redução acentuada dos níveis de colágeno e atenuação da fibrose (57, 58).

As terapias baseadas na introdução de miRNA sintéticos são alvos de diversas pesquisas em oncologia (59) e doenças fibróticas (50), esses pequenos miRNAs produzidos quimicamente são chamados de mimics, os quais se assemelham aos miRNAs biológicos maduros que ocorrem naturalmente nos organismos, sendo comumente utilizados em aplicações terapêuticas para a regulação da subexpressão de miRNAs endógenos e silenciamento de genes (60). É demonstrado que a subexpressão do miRNA-29b contribui para a patogênese da fibrose, sendo sugerido que a indução da sua expressão, poderia representar uma nova estratégia terapêutica para condições fibróticas (61).

Ensaio funcionais e análises de predição *in silico*, confirmaram que o miRNA-29b tem como alvos diretos o gene COL1A1, que codifica o colágeno tipo I e o gene COL3A1, que codifica o colágeno tipo III e que a superexpressão do miRNA-29b regula negativamente seus genes alvo (62). Foi visto que a superexpressão do miRNA-29b na fibrose pulmonar, possui um efeito protetivo e reversivo da fibrose, sugerindo o potencial terapêutico do miRNA-29b na doença fibrótica (63). Um estudo conduzido recentemente por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que o miRNA-29b está subexpresso em amostras provenientes da placa fibrótica, TA adjacente e corpo cavernoso de pacientes com DP, revelando que a subexpressão do miRNA-29b também está associada a essa condição (64).

Dessa forma, apesar de alguns avanços terem sido obtidos nos últimos anos envolvendo terapias para a DP, investigar os mecanismos moleculares através de modelos *in vitro* e *in vivo* da doença, são amplamente necessários para buscar novos tratamentos não cirúrgicos e minimamente invasivos para a doença (65).

Os modelos animais disponíveis atualmente para investigações envolvendo a patogênese da DP e a busca de possíveis novos tratamentos, são baseados predominantemente em ratos, pelo fato de que, a anatomia do pênis desses roedores apresentam características morfológicas e funcionais semelhantes às do pênis humano (66). Os modelos animais de DP mais frequentemente relatados incluem, o modelo induzido por TGF- β 1 (67), fibrina (68), trauma cirúrgico (69) e mais recentemente o modelo de DP induzido por plasma (70).

O pênis do rato pode ser dividido em três regiões denominadas como porção proximal, média e distal. A porção proximal está localizada próxima ao bulbo do pênis,

a porção média é limitada de modo distal pela flexura do pênis que a separa da porção distal, que é a região da glândula do pênis. A porção média do pênis do rato é composta por dois corpos cavernosos unidos entre si, recobertos pela túnica albugínea e estão localizados dorsalmente ao corpo esponjoso (71). Diferentemente do pênis humano, os ratos possuem uma estrutura osteocartilaginosa na porção distal, sendo a porção média a região que mais se assemelha ao pênis humano (72).

Atualmente, a DP continua sendo uma condição complexa e de etiologia pouco clara, que afeta a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, devido a seus efeitos físicos e psicológicos. O tratamento cirúrgico, apesar de eficaz, visa contornar a deformidade peniana adquirida, no entanto, não é capaz de regredir a doença propriamente dita. Diante disso, compreender os mecanismos moleculares envolvidos na DP é de fundamental importância para que seja possível o desenvolvimento de novas terapias seguras e eficazes. Nesse contexto, os miRNAs se apresentam como uma alternativa atraente, uma vez que são importantes reguladores da expressão gênica em diversas doenças, incluindo as patologias fibróticas, e ainda não existem estudos envolvendo o uso de miRNAs para o tratamento da DP. O miRNA-29b que se encontra subexpresso na doença, possui importantes características antifibróticas por controlar a expressão de genes codificadores de colágeno. Dessa forma, avaliar o papel do miRNA-29b na DP, através do estímulo da sua expressão em um modelo experimental, poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença e para o desenvolvimento de novas vias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel terapêutico do miRNA-29b em um modelo pré-clínico da DP.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar os níveis de expressão gênica de COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 em amostras de tecido peniano de pacientes com a DP e em pacientes sem o diagnóstico da doença.

Estabelecer o modelo pré-clínico da DP.

Caracterizar os níveis de expressão do miRNA-29b e dos genes COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 no modelo pré-clínico da DP, antes e após o tratamento com o miRNA-29b.

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Os pacientes com DP foram selecionados prospectivamente a partir da cirurgia para correção da curvatura peniana e sete indivíduos tiveram amostras de biópsia coletadas da placa fibrótica e da TA adjacente, um paciente teve amostra coletada apenas da placa fibrótica e quatro pacientes tiveram amostras coletadas somente da TA adjacente. Dessa forma, tivemos o grupo Peyronie Placa (n = 8) e grupo Peyronie TA (n = 11). Esses pacientes apresentaram média de idade de 55,36 anos. As cirurgias para correção da curvatura peniana consistiram em técnicas de plicatura, incisão da placa com colocação de enxerto e prótese peniana quando houvesse DE concomitante. O critério de inclusão para a realização das cirurgias foi o paciente estar na fase crônica e estável da DP.

O grupo Controle foi composto por 13 pacientes sem diagnóstico de DP, com média de idade de 58,54 anos, que foram submetidos à cirurgia de colocação de prótese peniana para correção de DE e tiveram amostras de biópsia coletadas da TA. A caracterização dos grupos e comparação da idade dos pacientes estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos analisados e idade dos pacientes

Variável	Grupos			p
	Média ± (desvio padrão)			
	Pacientes sem DP*	Pacientes com DP		
	Controle (n = 13)	Peyronie Placa (n = 8)	Peyronie TA** (n = 11)	
Idade (anos)	58,54 (14)	55,36 (7,76)		0,46#

*Doença de Peyronie; **Túnica albugínea adjacente; #Teste de Mann-Whitney.

Todos os pacientes selecionados são acompanhados no ambulatório de Medicina Sexual do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os mesmos foram convidados a participarem do estudo, sendo elegíveis os que aceitaram e responderam ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras utilizadas em nosso trabalho foram coletadas no período de maio de 2016 e abril de 2019. O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMUSP sob o parecer nº 3.830.118.

Todas as cirurgias foram realizadas pela equipe médica da Medicina Sexual do HCFMUSP. Os fragmentos teciduais foram coletados através de biópsia no momento das cirurgias e imediatamente armazenados em RNA $/later^{\text{TM}}$, em seguida, foram enviados para o Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia (LIM55) da FMUSP, onde foram estocados em freezer a -20°C até o processamento.

3.2 Extração de RNA total

Para extração de RNA foi utilizado o kit de isolamento miRVana® miRNA (Ambion, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA, incluindo os microRNAs, e por isso o utilizamos para a extração do RNA total dos tecidos. As preparações das amostras de tecidos frescos foram realizadas em gelo e da maneira mais rápida possível para prevenir a degradação por proteases. As amostras teciduais foram maceradas utilizando o equipamento Tissue Lyser LT (Qiagen, Germantown, USA) com 500 μL do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização e em seguida os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500 μL de fenol clorofórmio, e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 64% a temperatura ambiente. A solução então foi transferida para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Nesta etapa o filtro contém o RNA. Nos filtros com o RNA, foram realizadas lavagens com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 minuto a 10.000g para a secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e então adicionamos 50 μL da solução de eluição do kit pré-aquecida a 95°C , no centro da coluna. Após 1 minuto à temperatura ambiente, os RNAs foram centrifugados e armazenados a -20°C até sua utilização. A pureza e a concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (260/280nM) (ND1000, Wilmington, EUA).

3.3 Transcrição Reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) do RNA foi realizada utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (AppliedBiosystems) que utiliza a Transcriptase reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em água livre de nucleases em um volume final de 20 µl e concentração de 50 ng/µl. A este volume foram acrescentados 2 µl de oligonucleotídeos randômicos, 0,8 µl do mix de dNTPs, 2 µl do tampão da enzima, 1µl da enzima transcriptase reversa e 4,2 µl de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos) no termociclador Veriti® (AppliedBiosystems). Ao final das reações o cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

3.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo

A expressão dos genes estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qPCR) no sistema ABI 7500 *Fast* RT-PCR no modo standard utilizando-se Master Mix PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). As expressões dos RNAs individuais foram analisadas usando sondas de sequência específicas (Tabela 2).

Tabela 2 - Sondas utilizadas para quantificação da expressão dos genes estudados nos pacientes

Genes	Ensaio	Marca
COL1A1	Hs00164004_m1	Applied Biosystems
COL3A1	Hs00943809_m1	Applied Biosystems
TGF-β1	Hs00998133_m1	Applied Biosystems
B2M	Hs00187842_m1	Applied Biosystems

Este protocolo TaqMan® utilizou dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda

é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR. Para quantificação relativa dos genes em estudo normalizamos a expressão destes em relação à expressão do gene controle Beta 2-microglobulina (B2M). Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 0,5 µL de primer (contendo a sonda marcada) conforme a tabela 2, 2 µL de TaqMan Master Mix, 6,5 µL de água livre de nucleasse e 1 µL de cDNA, somando um total de 10 µL para cada reação. As condições das reações foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A expressão relativa normalizada foi calculada através do limiar dos valores Ct dos genes estudados com o valor Ct de B2M (calibrador). Os dados foram analisados em DataAssist® Software (Applied Biosystems, EUA). Todas as reações qPCR foram realizadas em duplicata.

3.5 Estudos *in vivo*

3.6 Modelo pré-clínico da DP

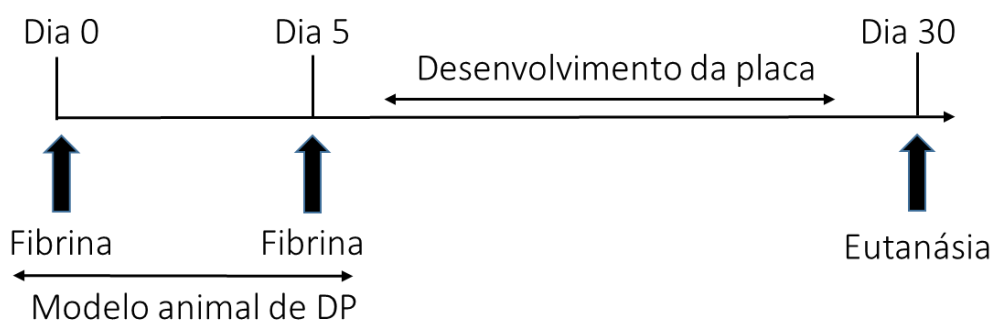
Para os estudos *in vivo* da DP, foram utilizados 32 ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* com 9-11 semanas de idade e peso de 400-450 gramas. Os animais foram mantidos em condições de fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) e condicionados no biotério gentilmente cedido pelo LIM08 (Laboratório de Investigação Médica 08 da Anestesiologia), sob temperatura entre 21 e 23°C. Todos os animais tiveram livre acesso a ração comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP sob o nº 1450/2020.

Para o estabelecimento do modelo experimental da DP, utilizamos 14 ratos divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo Controle (n = 6) e grupo Fibrose (n = 8). O modelo foi induzido por fibrina baseado no estudo de Kwon et al. (2014) (73).

Antes dos procedimentos, os animais foram fixados pelos membros superiores e inferiores, em decúbito dorsal e em uma mesa cirúrgica após pesagem e anestesia com sedação inalatória (isoflurano 2-3%). Para obtermos acesso ao local exato da injeção, utilizamos uma régua cirúrgica para demarcar a região da porção média do lado direito do pênis do animal, exatamente 2 cm acima da inserção dos corpos cavernosos na cavidade abdominal e em um ângulo de 60°, como descrito em um outro estudo de modelo experimental da doença (74). Para todas as aplicações na TA dos animais, utilizamos uma agulha de calibre 26.

O grupo Fibrose recebeu injeções repetidas na TA contendo uma mistura de 100 µL de solução fibrina e 100 µL de solução trombina humana (Tisseel Duo, Baxter AG, Viena, Áustria), nos dias 0 e 5. O grupo Controle recebeu 200 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) nos dias 0 e 5, respectivamente. Para a confirmação do modelo experimental da DP, todos os animais foram eutanasiados no dia 30 do estudo (73) (Figura 3).

Figura 3 - Delineamento experimental do estabelecimento do modelo animal da DP



Fonte: A autora, 2022.

A indução da placa semelhante a DP humana foi realizada a partir da aplicação do selante de fibrina, também conhecido como cola de fibrina ou adesivo de fibrina, que é um produto obtido de proteínas do plasma humano que possui a função de mimetizar a última fase da cascata de coagulação. O produto de nome comercial Tisseel Duo que utilizamos em nosso trabalho, é um kit constituído por uma seringa de duas câmaras com uma tampa na ponta, composta por 1 mL de solução de proteína selante congelada (componente 1) e 1 mL de solução de trombina congelada

(componente 2). O componente 1 é constituído por 1 mL de solução de proteína selante com 91 mg/mL de fibrinogênio humano e 3000 UIC/mL de aprotinina sintética. O componente 2 é constituído por 1 mL de solução de trombina com 500 UI/mL de trombina humana e 40 μ mol/mL de cloreto de cálcio (Anexo 3) (Figura 4). O produto foi mantido em freezer a -20°C até sua utilização.

Figura 4 - Selante de fibrina: Componente 1 composto por solução de proteína selante (fibrinogênio humano e aprotinina sérica) e componente 2 composto por solução de trombina (trombina humana e cloreto de cálcio). Lote: D4V027AA e Validade: 04/2022

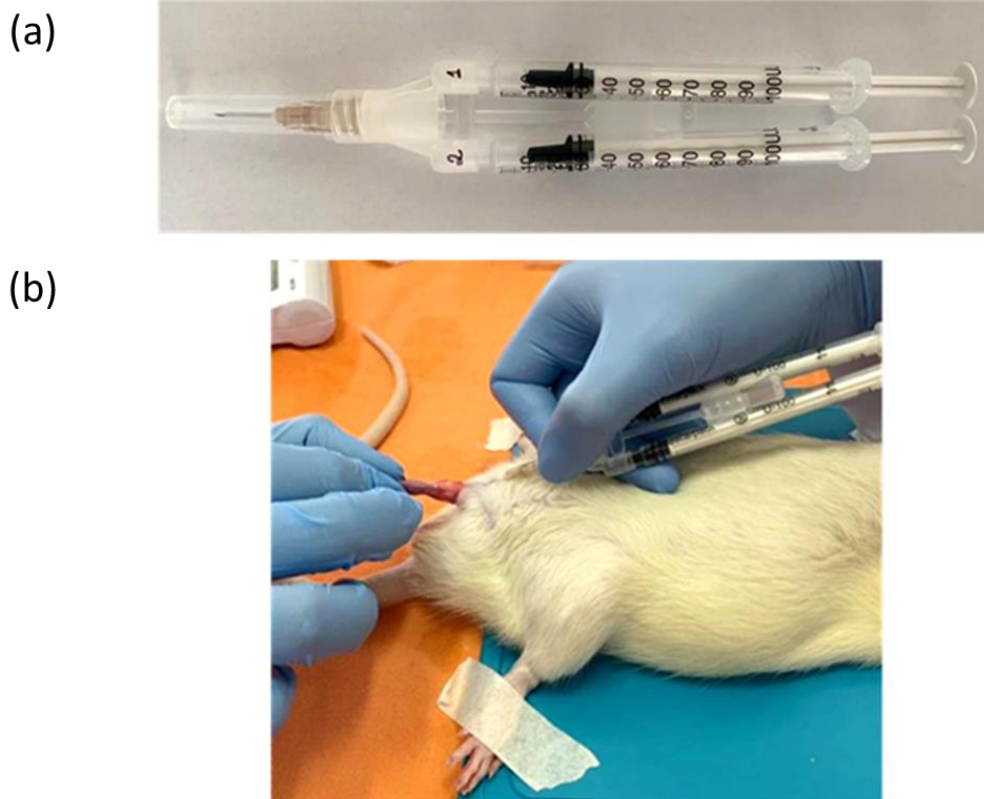


Fonte: A autora, 2022.

O mecanismo do selante de fibrina é dado pela conversão do fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina, sendo que quando o fator XIII é ativado pela ação combinada de trombina e íons de cálcio, este reage com as fibras de fibrina, resultando em um coágulo de fibrina estável e insolúvel. A aprotinina age como um antifibrinolítico para evitar a degradação prematura do coágulo. O selante de fibrina é utilizado atualmente como adjuvante em diversos procedimentos cirúrgicos como agente hemostático, selador de tecidos, estimulador da reparação tecidual, além disso, é biocompatível e biodegradável, sendo metabolizado da mesma maneira que a fibrina endógena, através de fibrinólise e fagocitose. Estudos *in vivo* não demonstraram efeitos de toxicidade (75, 76). O processo de descongelamento das soluções foi realizado em temperatura ambiente a 37°C imediatamente antes das aplicações, conforme recomendação do fabricante.

Para evitar o entupimento da agulha, garantir a aplicação simultânea e em quantidades exatas das soluções nos animais do grupo Fibrose, optamos por transferir as soluções cuidadosamente em ambiente estéril, para outras duas seringas de insulina de 1mL cada, que em seguida foram conectadas a peça de junção fornecida pelo kit Tisseel Duo juntamente com uma agulha de calibre 26. As duas seringas contendo as duas soluções, foram unidas com uma fita adesiva transparente a fim de facilitar o manuseio e evitar a movimentação das seringas durante a aplicação (Figura 5a). Após a aplicação, a agulha permaneceu no local por aproximadamente 20 segundos antes de ser removida, para evitar o extravasamento de solução. Para sabermos se as injeções ocorreram na TA do pênis do animal, observamos um vazamento mínimo de sangue (Figura 5b).

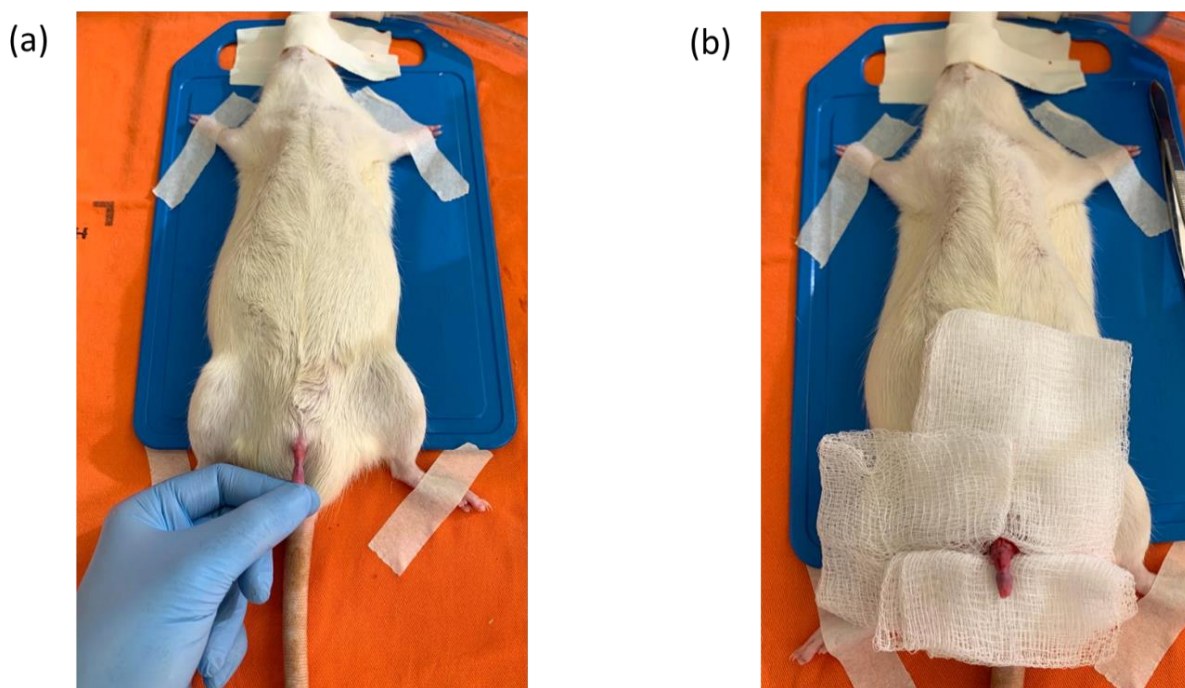
Figura 5 – (a) Duas seringas de insulina de 1mL com a solução 1 (proteína selante) e solução 2 (trombina) adaptadas para as aplicações e conectadas a uma peça de junção com uma agulha de calibre 26; **(b)** Momento da aplicação das soluções de trombina e fibrina no animal do grupo Fibrose



Fonte: A autora, 2022.

Para a confirmação do modelo animal, os animais foram eutanasiados no dia 30 do estudo conforme as normativas preconizadas pelas diretrizes da CEUA de nossa instituição e tiveram a porção média do pênis coletado pela técnica de penectomia total, considerando que nessa fase as placas fibróticas estariam bem desenvolvidas, se assemelhando as placas encontradas na DP humana, conforme descrito anteriormente (73). Após a coleta, duas fatias transversais (3-4 mm) foram cortadas ao redor do local da injeção de solução salina ou solução fibrina, para análise histopatológica e molecular dos tecidos (Figura 6).

Figura 6 - Imagens do animal anestesiado para coleta dos espécimes cirúrgicos. **(a)** Animal com o pênis distendido; **(b)** Momento antes da penectomia



Fonte: A autora, 2022.

3.7 Tratamento dos animais com o miRNA-29b

Após o estabelecimento do modelo animal como descrito no item 3.6, partimos para a realização do tratamento com o miRNA-29b ou seu controle Negativo. Para esta etapa do trabalho, foram utilizados 18 ratos divididos aleatoriamente em três grupos, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Grupo de animais utilizados para o tratamento

Grupos	Número de animais
Controle	6
Fibrose+miRNA-29b	6
Fibrose+miRNA Negativo (<i>Scramble</i>)	6

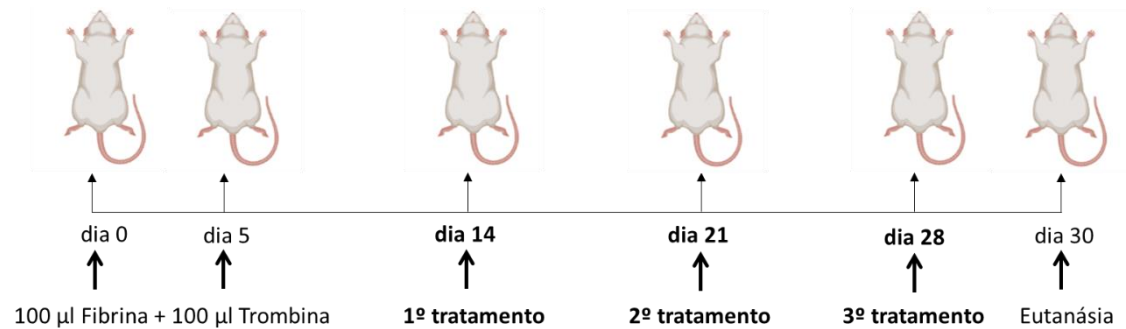
Para a preparação do complexo de transfecção com o mimic do miRNA-29b (MC10103; Ambion) ou seu controle Negativo (*Scramble*) (AM17110; Ambion), utilizamos o *in vivo*-jetPEI® (Polyplus-Transfection, Nova Iorque, EUA), combinados em solução de glicose a 5%, para um volume final de 100 µL nas aplicações. O complexo *in vivo*-jetPEI é um reagente de transfecção a base de polímeros de entrega polivalente, ou seja, é adequado para a entrega de ácido nucleico em qualquer modelo animal, podendo ser utilizado por vias de injeção sistêmica e local (75). O complexo de transfecção foi preparado seguindo as recomendações do protocolo do fabricante em ambiente estéril. O mimic do miRNA-29b e seu controle Negativo foram diluídos em água livre de nuclease a uma concentração final de 20 µM em 100 µL de solução de estoque.

Para preparar a solução 1 do complexo, utilizamos 1,2 µL de *in vivo*-jetPEI, 23,8 µL de solução de glicose e 25 µL de água livre de nuclease. Para a solução 2 utilizamos 10 µL de solução glicose, 25 µL de água livre de nuclease e 15 µL de miRNA-29b que corresponde a 10 µg de miRNA. Em seguida, as soluções 1 e 2 foram homogeneizadas e deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos antes das aplicações nos animais.

De acordo com o delineamento experimental especificado na figura 7, nos dias 0 e 5 os animais do grupo Fibrose+miRNA-29b e grupo *Scramble* receberam as injeções de solução fibrina e trombina para indução da placa fibrótica, e os animais do grupo Controle receberam injeções de solução salina estéril. As aplicações com o miRNA-29b ou seu controle Negativo foram realizadas localmente no pênis dos animais, utilizando uma seringa de insulina de 1 mL e agulha de calibre 29, nos dias 14, 21 e 28 do estudo (Figura 8). Os animais do grupo Controle receberam injeções de solução salina estéril nos mesmos dias dos tratamentos. Todos os animais foram

eutanasiados no dia 30 do experimento, e tiveram o tecido peniano coletado para as análises histopatológicas e moleculares.

Figura 7 - Delineamento experimental



Fonte: A autora, 2022.

Figura 8 - Aplicação das injeções de tratamento com o miRNA nos animais



Fonte: A autora, 2022.

3.8 Processamento e análise histopatológica

Os fragmentos do tecido peniano dos animais destinados as análises histológicas, foram transferidos imediatamente após a coleta para solução de formalina a 10% onde permaneceram *overnight*. Após esse período de fixação, os

espécimes foram lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e armazenados em álcool 70% a temperatura de 4°C até o processamento.

Para a confecção das lâminas histológicas, os tecidos foram inclusos em parafina Paraplast e seções de 5 µm de espessura (4 seções por animal) foram obtidas e montadas em lâminas pré-revestidas com Permount. As lâminas seguiram para o processo de desparafinização (com xilol), reidratação (com etanol) e coloração com as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricômico de Masson e Verhoeff.

As lâminas coradas com as técnicas de HE e Tricômico de Masson foram analisadas de forma qualitativa quanto à presença de processo inflamatório e fibrose. As lâminas coradas com a técnica de Verhoeff foram utilizadas para análise das fibras elásticas. Foram analisadas 4 seções por animal de cada grupo. As lâminas foram observadas em microscópio de luz convencional e as imagens foram obtidas através de uma câmera acoplada ao microscópio. Inicialmente, os cortes histológicos foram analisados em objetiva de 4x (ampliação de 40x), e em seguida, em objetiva de 10x (ampliação de 100x) e 20x (ampliação de 200x). Todas estas análises foram realizadas pela uropatologista Profa. Dra. Kátia R. M. Leite.

3.9 Análise de expressão do miRNA e dos genes nos espécimes provenientes do tecido peniano dos animais

Para as análises moleculares, os fragmentos do tecido peniano dos animais foram armazenados imediatamente após a coleta em solução de RNA^{later}[™], e avaliados quanto a expressão dos genes e do miRNA-29b (Tabela 4).

Tabela 4 - Sondas utilizadas para quantificação da expressão dos genes e do miRNA nos animais

Genes e miRNA	Ensaio	Marca
COL1A1	Rn01463848_m1	Applied Biosystems
COL3A1	Rn01437681_m1	Applied Biosystems
TGF-β1	Rn00572010_m1	Applied Biosystems
B2M	Rn00560865_m1	Applied Biosystems
miRNA-29b	000413	Applied Biosystems
U87	001712	Applied Biosystems

O processo de extração do RNA total e miRNA do tecido peniano dos animais foi realizado conforme descrito no item 3.2. A síntese de cDNA do RNA total foi realizada conforme o item 3.3.

A síntese do cDNA do miRNA foi realizada utilizando-se o kit *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription®* (AppliedBiosystems). O miRNA foi diluído em água livre de nucleases em um volume final de 10 µl e concentração de 50 ng/ µl. A este volume foram acrescentados 0,15 µl do mix de dNTPs, 0,5 µl da enzima transcriptase reversa, 1,5 µl do tampão da enzima, 0,19 µl de inibidor de RNase, 3,66 µl de água livre de nucleasse e 1 µl de primer com a sequência específica para o miRNA, totalizando 10 µl de cDNA. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos) no termociclador Veriti® (AppliedBiosystems). Ao final das reações o cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

A expressão do miRNA e dos genes foi avaliada por qPCR, conforme descrita no item 3.4. As expressões do miRNA e dos genes individuais foram analisadas usando sondas de sequência específicas listadas na tabela 3. A expressão relativa do miRNA normalizada, foi calculada através do limiar dos valores Ct do miRNA estudado com o valor Ct de U87 (calibrador).

3.10 Análise estatística

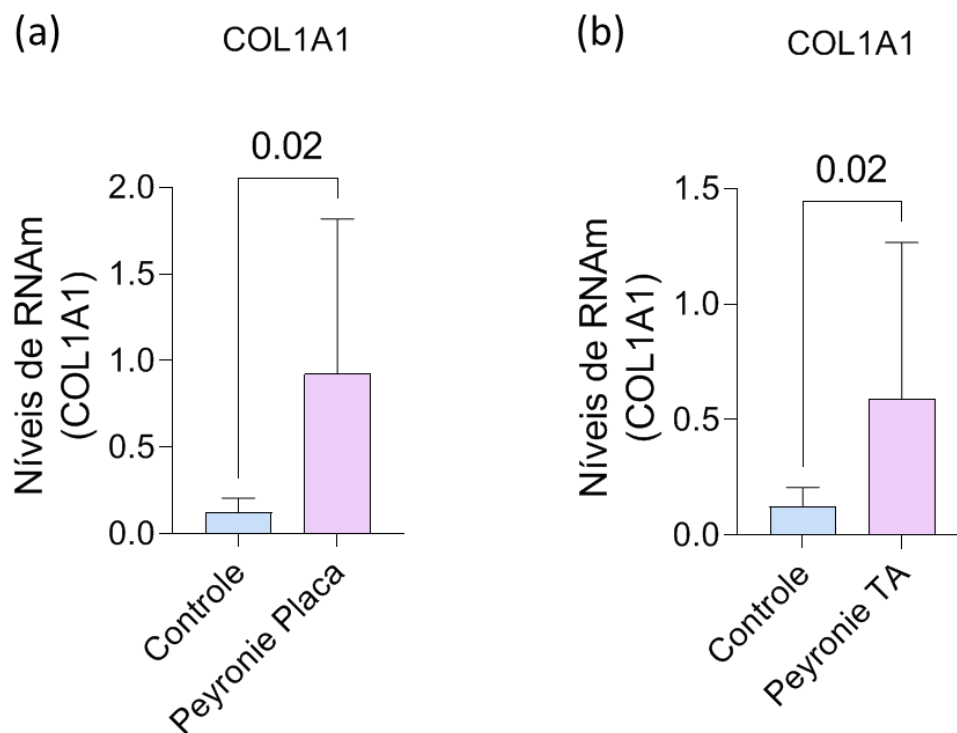
Para todas as análises utilizamos o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade de variáveis quantitativas. Em seguida, para as análises de dois grupos utilizamos o teste T de Student para dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para as análises de três grupos utilizamos o teste ANOVA com correção de Bonferroni para dados paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 8.0.1) e consideramos um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram valor de p igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão gênica de COL1A1 nas amostras teciduais dos pacientes

O gene COL1A1 apresentou superexpressão no grupo Peyronie Placa em comparação ao grupo Controle, de forma estatisticamente significativa ($p = 0,02$), como demonstrado na figura 9a. Do mesmo modo, também observamos que o gene COL1A1 apresentou superexpressão no grupo Peyronie TA quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,02$) (Figura 9b).

Figura 9 - Análise da expressão gênica de COL1A1. **(a)** Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste de Mann-Whitney; **(b)** Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste T de Student

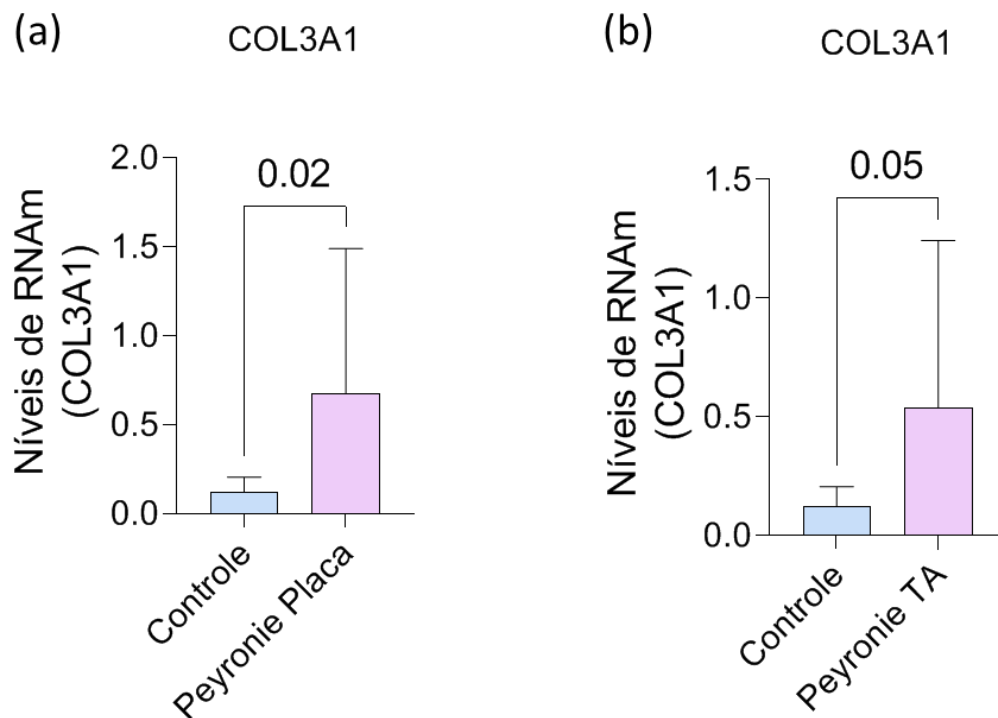


Fonte: A autora, 2022.

4.2 Análise da expressão gênica de COL3A1 nos pacientes

Ao investigar os níveis de expressão do gene COL3A1 nas amostras dos pacientes, observamos que este gene estava superexpresso no grupo Peyronie Placa quando comparado ao grupo Controle, com diferença significativa ($p = 0,02$), (figura 10a). Da mesma forma, encontramos que este gene apresentou superexpressão no grupo Peyronie TA em relação Controle ($p = 0,05$) (Figura 10b).

Figura 10 - Análise da expressão gênica de COL3A1. **(a)** Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste T de Student; **(b)** Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste T de Student



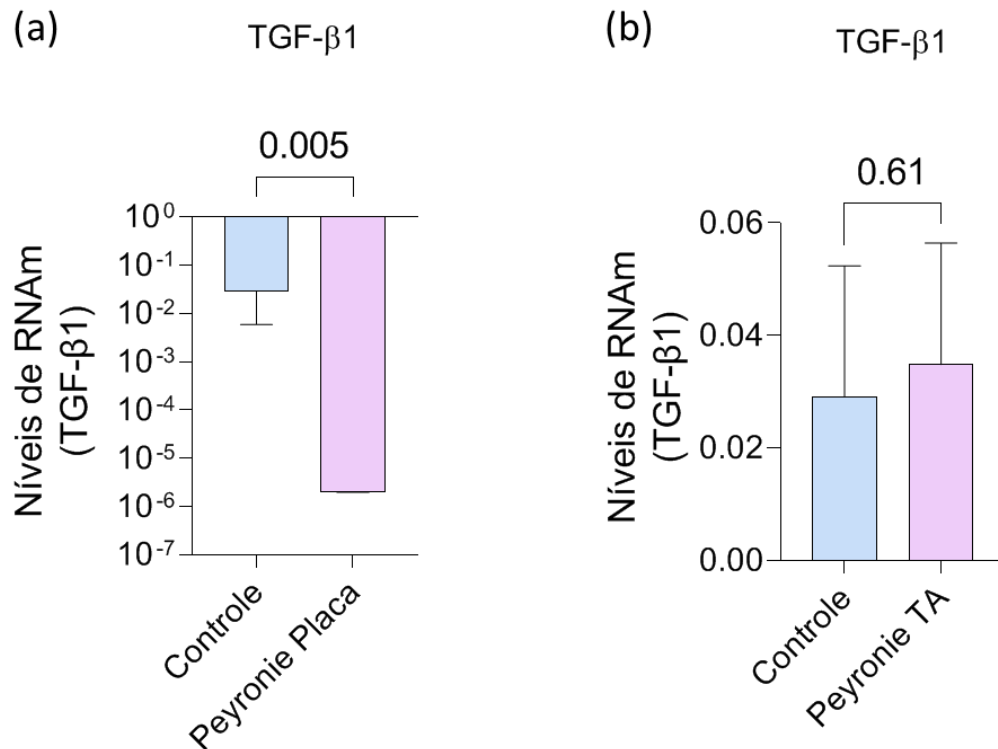
Fonte: A autora, 2022.

4.3 Análise da expressão gênica de TGF- β 1 nos pacientes

Avaliamos os níveis de expressão gênica de TGF- β 1, nas amostras coletadas dos pacientes e encontramos que este gene estava subexpresso significativamente no grupo Peyronie Placa quando comparado ao grupo Controle ($p=0,005$) (Figura

11a). Quando comparamos o grupo Peyronie TA e grupo Controle, não encontramos diferença estatística entre os grupos ($p=0,61$) (Figura 11b).

Figura 11 - Análise da expressão gênica de TGF- β 1. **(a)** Comparação entre o grupo Peyronie Placa e grupo Controle, teste T de Student; **(b)** Comparação entre o grupo Peyronie TA e grupo Controle, teste de Mann-Whitney



Fonte: A autora, 2022.

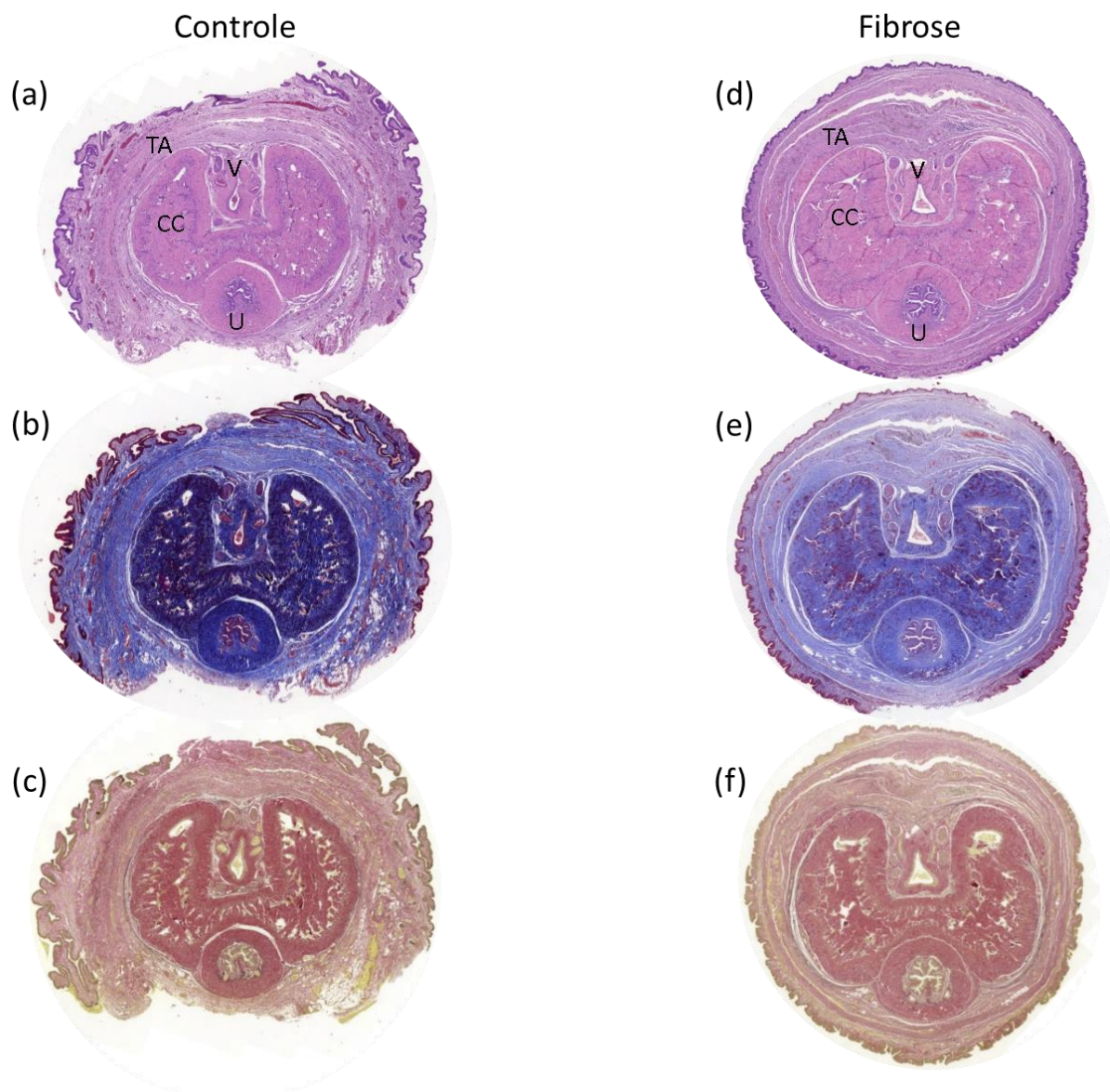
4.4 Modelo experimental da DP

Durante os experimentos para o estabelecimento do modelo pré-clínico da DP, os animais do grupo Controle não apresentaram qualquer intercorrência durante o experimento. Os animais do grupo Fibrose, apresentaram uma pequena inflamação e edema local no pênis nos primeiros dias após as injeções intratúnicas, que desapareceram ao longo do experimento. No dia da eutanásia observamos que alguns animais do grupo Fibrose apresentavam uma rigidez discreta no pênis.

A figura 12 representa o corte transversal do terço médio do pênis de um animal do grupo Controle e grupo Fibrose, com as colorações de HE, Tricômico de Masson

e Verhoeff. Através das colorações de HE com ampliação de 40x, é possível identificar a TA, veia dorsal peniana, corpo cavernoso e uretra no grupo Controle (Figura 12a) e grupo Fibrose (Figura 12d).

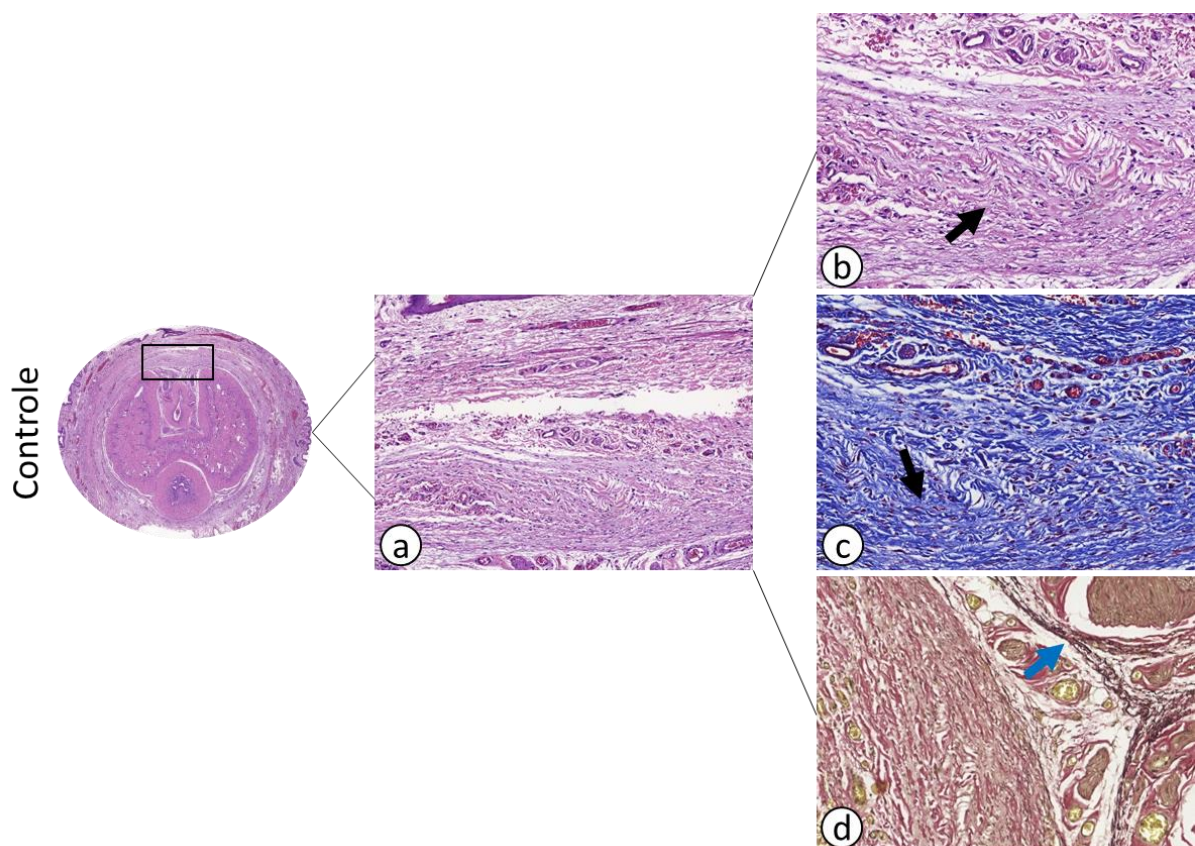
Figura 12 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de rato dos dois grupos analisados. TA: túnica albugínea; CC: corpo cavernoso; V: veia dorsal; U: uretra. **(a)** Grupo Controle e coloração de HE; **(b)** Grupo controle e coloração de Tricômico de Masson; **(c)** Grupo Controle e coloração de Verhoeff; **(d)** Grupo Fibrose e coloração de HE; **(e)** Grupo Fibrose e coloração de Tricômico de Masson; **(f)** Grupo Fibrose e coloração de Verhoeff. Ampliação de 40x



Fonte: A autora, 2022.

Em seguida analisamos o corte histológico do animal do grupo Controle, em ampliações de 100 e 200x e não observamos alterações histopatológicas em relação à presença de inflamação e fibrose, indicando que as injeções de salina não causaram quaisquer alterações na TA dos animais, como representado pela figura 13. Através das colorações de HE e Tricômico de Masson, podemos observar que as fibras colágenas apresentaram aparência normal com feixes ondulados e organizados (Figura 13b, c, setas pretas). A coloração de Verhoeff demonstrou as fibras elásticas sem alterações, apresentando aspecto alongado, distribuídas na região dorsal e coradas em cor escura (Figura 13d, seta azul).

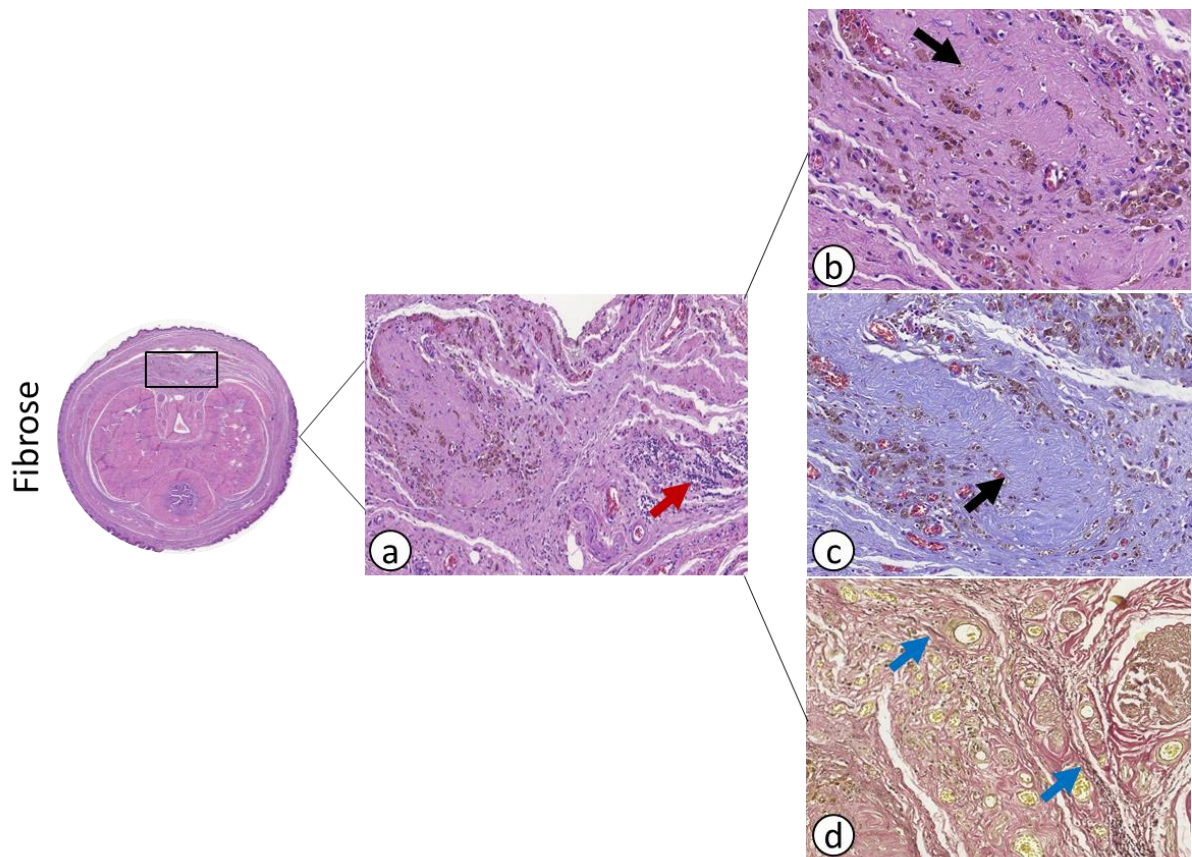
Figura 13 - Fotomicrografias do corte transversal de um animal do grupo Controle. **(a)** Coloração de HE, ampliação de 100x; **(b)** Coloração de HE, ampliação de 200X; **(c)** Coloração de Tricômico de Masson, ampliação de 200x; **(d)** Coloração de Verhoeff, ampliação de 200x. A setas pretas indicam ausência de alterações nas fibras colágenas. A seta azul indica ausência de alterações nas fibras elásticas



Fonte: A autora, 2022.

A figura 14 representa o corte histológico do pênis de um animal do grupo Fibrose. Observamos alterações histológicas na TA características de fibrose em todos os animais deste grupo. Em ampliações de 100 e 200x desta região, através das colorações de HE e Tricômico de Masson, observamos a formação de uma placa fibrótica densa, com desorganização das fibras colágenas e presença de hemossiderina no local da injeção (Figura 14b, c, setas pretas). Também identificamos um processo inflamatório intersticial, próximo à região de formação da placa fibrótica (Figura 14a, seta vermelha). De acordo com a coloração de Verhoeff, observamos que as fibras elásticas foram pouco coradas e apresentaram aspecto fragmentado na região dorsal do pênis (Figura 14d, setas azuis).

Figura 14 - Fotomicrografias do corte transversal de um animal do grupo Fibrose. **(a)** Coloração de HE, ampliação de 100x; **(b)** Coloração de HE, ampliação de 200x; **(c)** Coloração de Tricômico de Masson, ampliação de 200x; **(d)** Coloração de Verhoeff, ampliação de 200x. As setas pretas indicam alterações histológicas. A seta vermelha indica inflamação. Setas azuis indicam alterações nas fibras elásticas

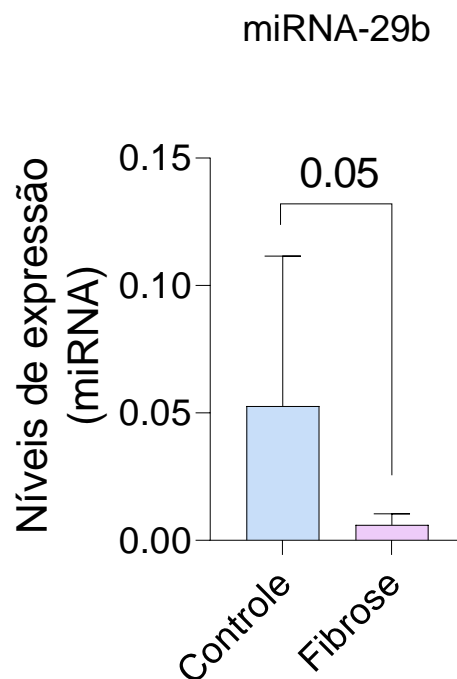


Fonte: A autora, 2022.

4.5 Expressão do miRNA-29b no modelo animal

Nesta análise, encontramos que o miRNA-29b estava subexpresso no grupo Fibrose quando comparado ao grupo Controle, sendo esta diferença significativa ($p = 0,05$), como representado na figura 15.

Figura 15 - Análise dos níveis de expressão do miRNA-29b no tecido peniano dos animais do grupo Controle e grupo Fibrose; teste T de Student



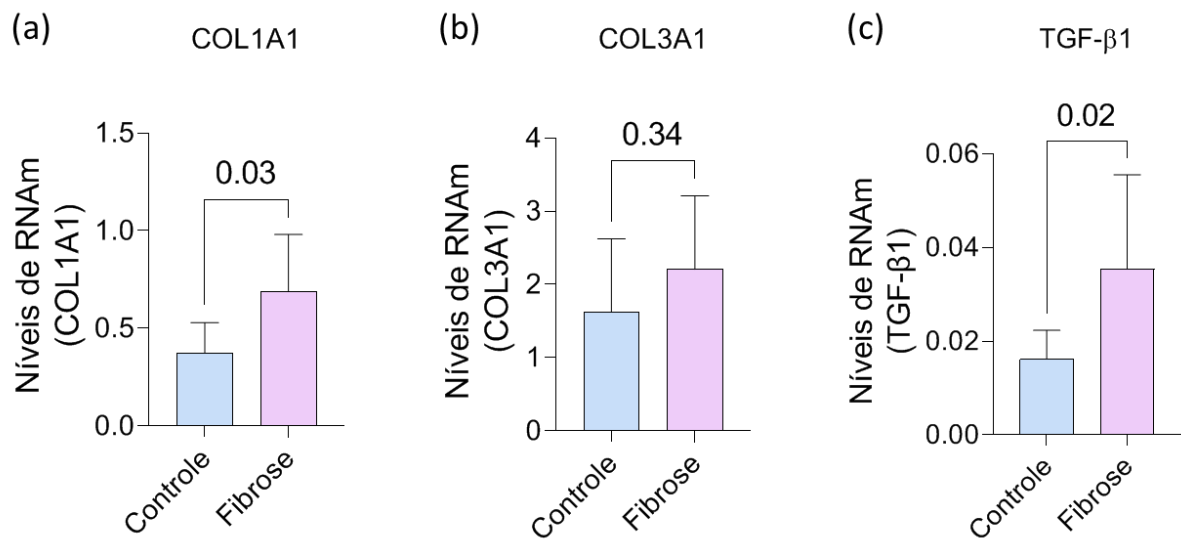
Fonte: A autora, 2022.

4.6 Expressão gênica de COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 no modelo animal

A análise dos níveis de expressão gênica de COL1A1, observamos que este gene estava superexpresso no grupo Fibrose quando comparado ao grupo Controle, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$) (Figura 16a). Quando analisamos a expressão gênica de COL3A1, não encontramos diferença significativa entre os grupos ($p = 0,34$) (Figura 16b). Na análise de expressão gênica de TGF- β 1, observamos que este gene estava superexpresso no Grupo Fibrose quando

comparado ao grupo Controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$) (Figura 16c).

Figura 16 - Análise dos níveis de expressão dos genes COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 nos animais do grupo Controle e Grupo Fibrose. **(a)** Comparação de COL1A1 entre os grupos; **(b)** Comparação de COL3A1 entre os grupos; **(c)** Comparação de TGF- β 1 entre os grupos; teste de Mann-Whitney

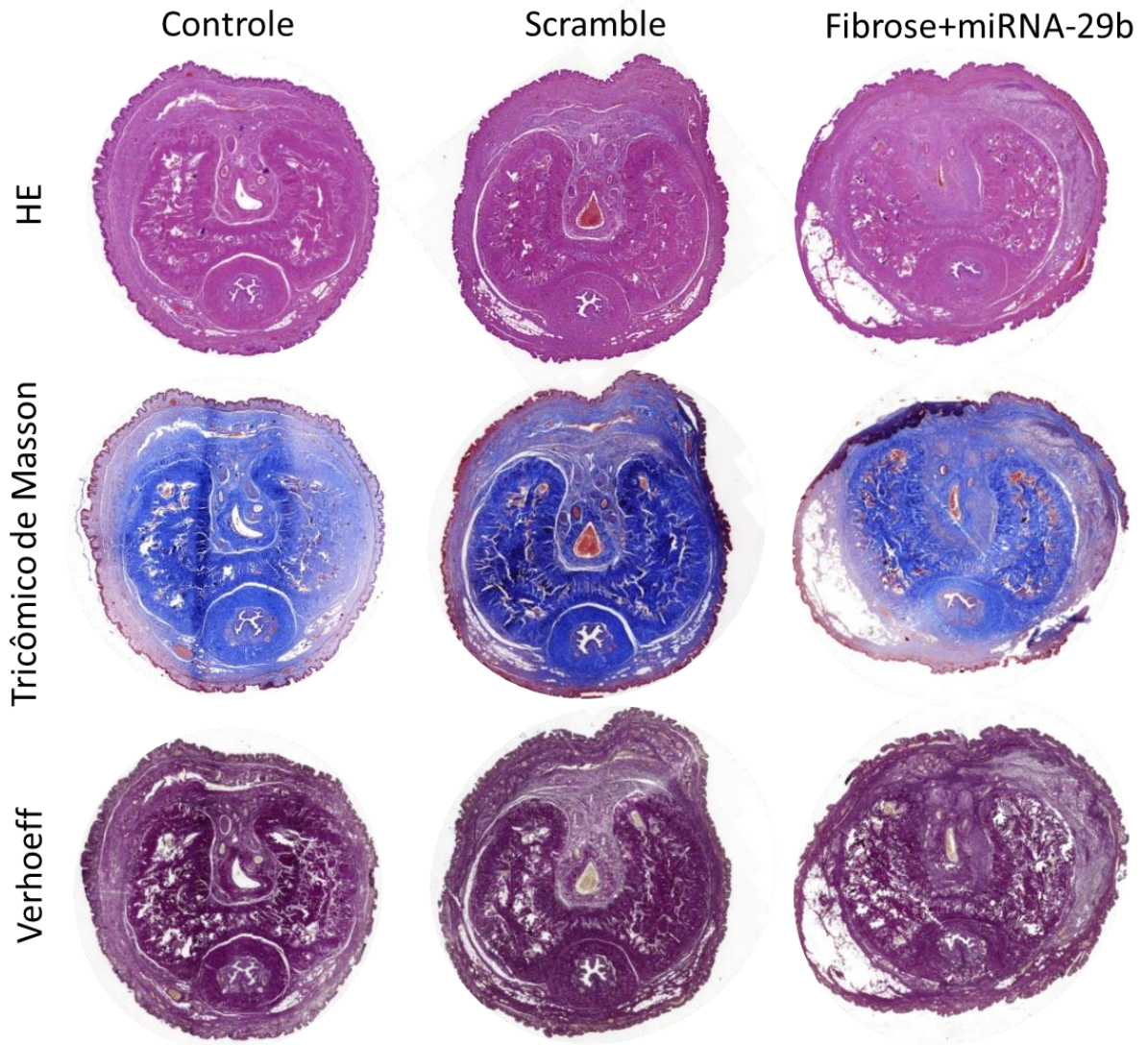


Fonte: A autora, 2022.

4.7 Análise histopatológica dos tecidos penianos dos animais após o tratamento com o miRNA-29b

A figura 17 representa o corte histológico do pênis de um animal de cada grupo com as colorações de HE, Tricômico de Masson e Verhoeff, em ampliação de 40x.

Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de rato dos grupos Controle, *Scramble* e Fibrose+miRNA-29b, nas três colorações (HE, Tricômico de Masson e Verhoeff). Ampliação de 40x



Fonte: A autora, 2022.

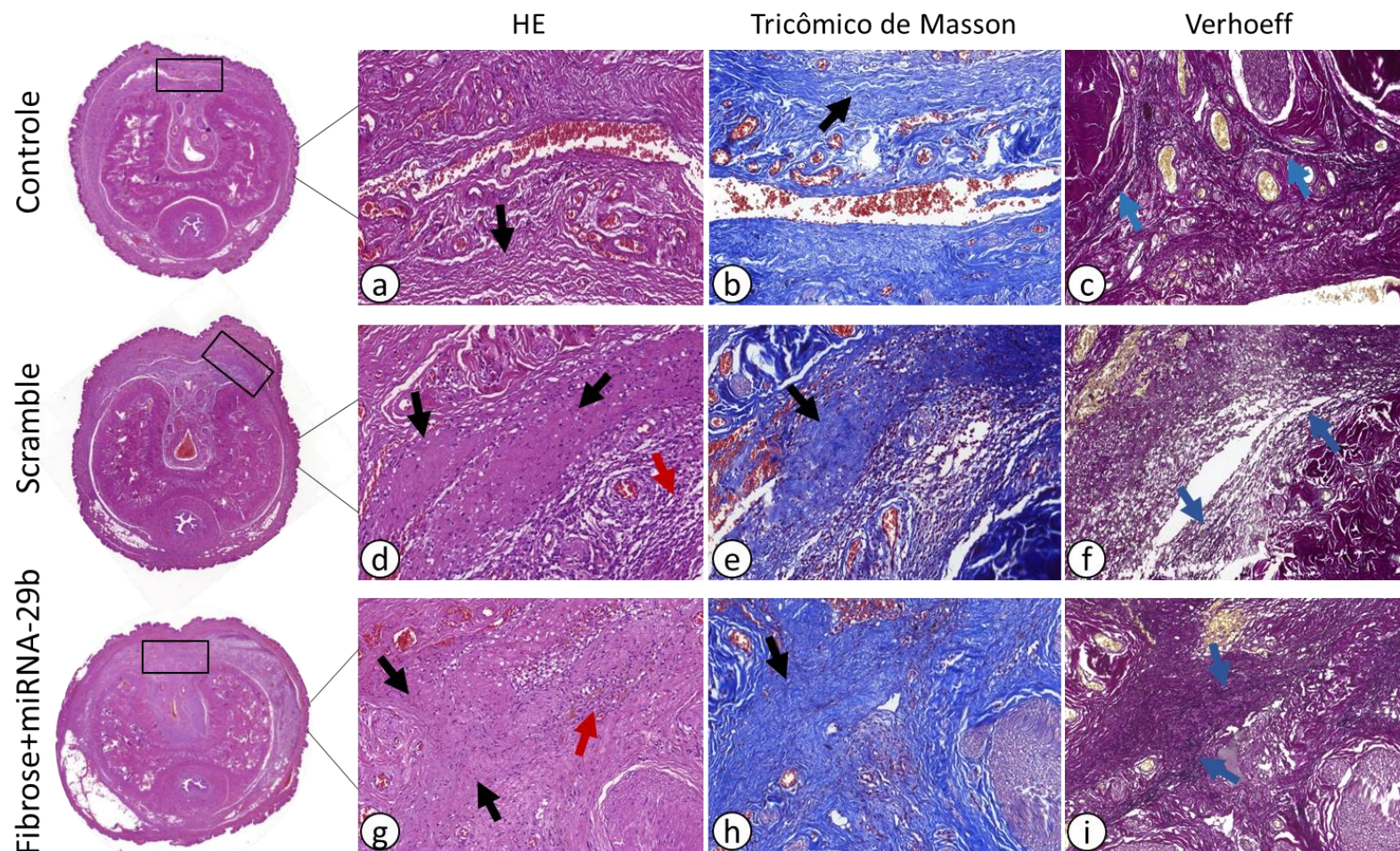
Após a realização do protocolo de tratamento, as análises histopatológicas demonstraram que a superexpressão do miRNA-29b foi capaz de atenuar a progressão da fibrose na TA do pênis dos animais do grupo Fibrose+miRNA-29b em comparação aos animais do grupo *Scramble* que não receberam o tratamento. Quando analisamos os cortes histológicos em maior ampliação (200x), observamos que, no grupo Controle através das colorações de HE e Tricômico de Masson, a TA apresentou aspecto regular com ondulação normal dos feixes de colágeno, com fibras

finas e bem alinhadas, e ausência de alterações histológicas (Figura 18a, b, setas pretas). A coloração de Verhoeff mostrou as fibras elásticas com aparência alongada e coradas em cor escura na região dorsal (Figura 18c, setas azuis). Essas observações demonstraram que as injeções repetidas de solução salina durante todo o experimento, não foram capazes de causar alterações histológicas no tecido peniano dos animais.

No grupo *Scramble*, a partir das colorações de HE e Tricômico de Masson, observamos a presença de placa fibrótica densa na TA, com desorganização das fibras colágenas no local da fibrose e perda da aparência de ondulação dos feixes de colágeno (Figura 18d, e, setas pretas). A coloração de Verhoeff demonstrou poucas fibras elásticas, porém estas apresentavam aspecto fragmentado próximo à região da placa fibrótica (Figura 18f, setas azuis).

A partir do corte histológico do grupo Fibrose+miRNA-29b nas colorações de HE e Tricômico de Masson, foi possível observar a presença de placa fibrótica discreta e menos densa em comparação ao corte histológico do animal do grupo *Scramble*. Além disso, observamos que as fibras colágenas apresentaram uma aparência mais organizada e menos perda de ondulação dos feixes de colágeno, demonstrando que as injeções com o miRNA-29b foram capazes de atenuar o processo fibrótico (Figura 18g, h, setas pretas). Pela coloração de Verhoeff, observamos que as fibras elásticas ainda apresentavam aspecto fragmentado na região dorsal (Figura 18i, setas azuis).

Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais do pênis de ratos dos três grupos nas colorações de HE, Tricômico de Masson e Verhoeff. **(a, b, c)** grupo Controle; **(d, e, f)** grupo *Scramble*; **(g, h, i)** grupo Fibrose+miRNA-29b. As setas pretas indicam ausência ou presença de alterações nas fibras colágenas. Setas vermelhas indicam inflamação. Setas azuis indicam ausência ou presença de alterações nas fibras elásticas. Ampliação de 200x



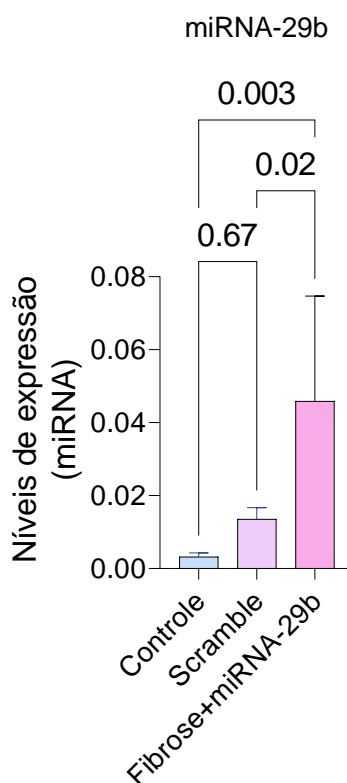
Fonte: A autora, 2022.

Outras alterações histopatológicas encontradas no grupo *Scramble* e grupo Fibrose+miRNA-29b, incluíram a presença de inflamação local na região dorsal do pênis dos animais, com proliferação de células inflamatórias, como demonstrado pelas setas vermelhas na figura 18d, g. Também observamos que ao final do experimento, eventualmente alguns animais de ambos os grupos apresentavam edema e enrijecimento peniano.

4.8 Análise molecular do miRNA-29b no tecido peniano dos animais após o tratamento

Após o tratamento, identificamos que o miRNA-29b foi superexpresso significativamente no grupo Fibrose+miRNA-29b quando comparado aos grupos *Scramble* e Controle ($p = 0,02$ e $p = 0,003$, respectivamente). Não encontramos diferença na comparação entre os grupos *Scramble* e Controle ($p = 0,67$) (Figura 19).

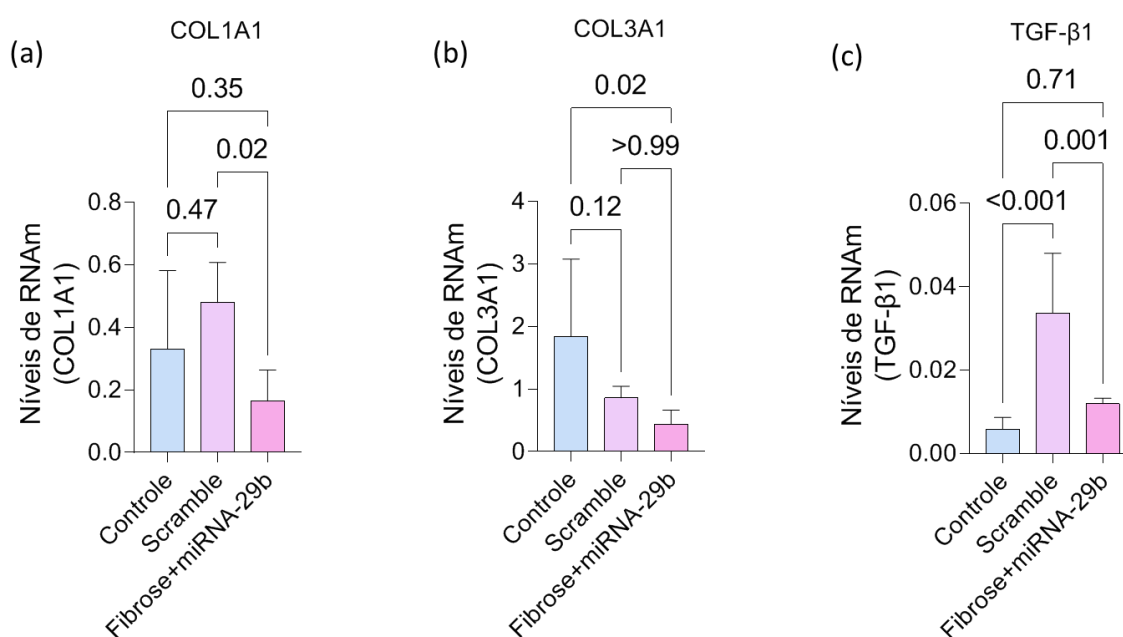
Figura 19 - Análise da expressão do miRNA-29b entre os grupos após o tratamento. O miRNA-29b foi superexpresso no grupo Fibrose+miRNA-29b em comparação ao *Scramble* e Controle



4.9 Análise molecular dos genes no tecido peniano dos animais após o tratamento

Observamos que o gene COL1A1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA-29b em relação ao grupo *Scramble*, com diferença significativa ($p = 0,02$). Não observamos diferenças nas comparações entre o *Scramble* e Controle ($p = 0,47$), e grupo Fibrose+miRNA-29b e Controle ($p = 0,35$) (Figura 20a). O gene COL3A1 foi subexpresso significativamente no grupo Fibrose+miRNA-29b quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,02$). Não encontramos diferenças nas comparações entre *Scramble* e Controle ($p = 0,12$), e Fibrose+miRNA-29b e *Scramble* ($p > 0,99$) (Figura 20b). O gene TGF- β 1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA-29b em comparação ao *Scramble*, com diferença significativa ($p = 0,001$). Além disso, observamos que este gene foi superexpresso significativamente no grupo *Scramble* quando comparado ao Controle ($p < 0,001$). Não identificamos diferença na comparação entre o grupo Fibrose+miRNA-29b e grupo Controle ($p = 0,71$) (Figura 20c).

Figura 20 - Análise da expressão gênica de COL1A1, COL3A1 e TGF- β 1 entre os grupos. **(a)** O gene COL1A1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em comparação ao *Scramble*; **(b)** O gene COL3A1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em relação ao Controle; **(c)** O gene TGF- β 1 foi subexpresso no grupo Fibrose+miRNA29b em relação ao *Scramble* e superexpresso no grupo *Scramble* em comparação ao grupo Controle



Fonte: A autora, 2022.

5 DISCUSSÃO

O miRNA-29b é apresentado na literatura como um importante miRNA antifibrótico, descrito por atuar nas vias de sinalização associadas à fibrose, principalmente controlando a expressão de genes de colágeno (77). Em trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que o miRNA-29b se apresentou subexpresso em pacientes com DP (64). A partir disso, avaliamos a expressão dos genes COL1A1 e COL3A1, alvos previstos do miRNA-29b, nas amostras do tecido peniano desses pacientes e de indivíduos sem o diagnóstico da DP.

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo do gene COL1A1 na placa fibrótica e na TA adjacente dos indivíduos com DP. Similarmente aos nossos achados, Magee et al., demonstraram que o COL1A1 foi altamente expresso em amostras da placa fibrótica de indivíduos com a DP (78). Somers et al., relataram em seu estudo que, em homens saudáveis, 48% da TA é composta por fibras de colágeno, enquanto que, em homens com DP, 68% da TA é composta por essas fibras, com tendência à predominância do colágeno fibrilar tipo III (79). No presente trabalho, também encontramos um aumento da expressão gênica de COL3A1, tanto na placa fibrótica, quanto na TA adjacente dos pacientes com DP.

Os tipos mais frequentes de colágeno durante a fase cicatrização de feridas, são os colágenos fibrilares do tipo I e III, os quais são codificados pelos genes COL1A1 e COL3A1, respectivamente. O gene COL1A1 está localizado no cromossomo 17 e é responsável por codificar a cadeia α 1 do colágeno I. O gene COL3A1 está localizado no cromossomo 2 e codifica a cadeia α 1 do colágeno III (22). O processo de inflamação crônica e reparo desencadeiam o acúmulo dessas proteínas, que culminam na formação de tecido fibroso (18). Além disso, a expressão do colágeno tipo I e III pode ser facilmente encontrada na placa fibrótica e na TA adjacente de pacientes com DP (80). Nossos resultados corroboram com esse achado, mostrando que as alterações moleculares não são só específicas da placa, mas também no tecido peniano adjacente dos indivíduos com DP. Em adição, há evidências suportando a hipótese de que a placa fibrótica pode induzir alterações em todo o tecido peniano (80, 81).

Curiosamente, nossa análise de qPCR nas amostras dos pacientes demonstrou níveis muito baixos da expressão de TGF- β 1 na placa fibrótica, entretanto, observamos que este gene apresentou maior expressão nas amostras da

TA adjacente dos pacientes com DP, embora sem significância estatística. Pavone et al., encontrou resultados similares aos nossos, demonstrando que o TGF- β 1 apresentou níveis diminuídos em amostras de tecido peniano de indivíduos com DP, apesar de ter se mostrado mais expresso na TA desses pacientes, em relação aos indivíduos não afetados pela doença (82). Diferentemente das nossas descobertas, um estudo realizado por El-Sakka et al., demonstrou que a expressão do TGF- β 1 estava aumentada em 86% das amostras de TA de pacientes com DP (83). Evidências sugerem que o TGF- β 1 interage com mecanismos de defesa antifibróticos, como a decorina, uma inibidora de TGF- β 1 (84). Outro fator que pode explicar a diminuição que encontramos nos indivíduos com DP, é o fato de que o TGF- β 1 se encontra aumentado nos eventos iniciais do processo de cicatrização (85). Diante disso, nossos resultados apontam que a DP possui uma natureza dinâmica, uma vez que podemos encontrar diferentes padrões de expressão gênica do TGF- β 1 no tecido peniano dos indivíduos portadores da doença.

Para explorarmos ainda mais os mecanismos moleculares subjacentes à DP, avaliamos a expressão gênica de COL1A1, COL3A1, TGF- β 1 e do miRNA-29b *in vivo*. Para isso, estabelecemos o modelo animal de DP induzido por fibrina, para posteriormente avaliarmos o papel terapêutico do miRNA-29b na doença. E quando avaliamos a expressão de COL1A1 e COL3A1 em nosso modelo animal antes do tratamento, encontramos um aumento significativo apenas na expressão do COL1A1. Nossos resultados foram consistentes com o estudo de Cohen et al., que demonstrou aumento significativo apenas do colágeno I em seu modelo animal (70). Possivelmente, nossos achados se devem ao fato de que o colágeno tipo III é um colágeno imaturo, sintetizado durante os estágios iniciais da cicatrização e posteriormente substituído pelo colágeno I, considerado o colágeno maduro (22).

Nossos resultados mostraram que a expressão de TGF- β 1 foi significativamente aumentada nos animais do grupo Fibrose, corroborando com trabalhos anteriores que avaliaram os efeitos pró-fibróticos do TGF- β 1 de intensificar a fibrose em modelos animais, através da estimulação da síntese de colágeno (86, 87). O primeiro modelo experimental proposto para a DP, foi utilizando o TGF- β 1 como indutor de fibrose e demonstrando que o mesmo é capaz de induzir a sua própria síntese e gerar uma inflamação crônica e fibrose no tecido peniano de ratos em torno de seis semanas (20, 23). Desde então, esse modelo tem sido amplamente utilizado

e adaptado para pesquisas envolvendo novas terapias para a DP (87, 88). Sabe-se que o TGF- β 1 atua via sinalização de Smads, uma família de proteínas intracelulares que também auxiliam na transcrição dos genes COL1A1 e COL3A1 para produção de colágeno tipo I e III (22). Além disso, o TGF- β 1 liberado pelas plaquetas durante a resposta aguda à lesão, atua como um elemento quimiotático de macrófagos e fibroblastos para o local da ferida (85). Nossos achados corroboram com a literatura, apoiando a hipótese de que o TGF- β 1 é um fator essencial no processo de fibrogênese.

Partindo da teoria de que lesões no pênis ereto desencadeiam a DP ao induzir o extravasamento de fibrina e a síntese subsequente do TGF- β 1, o modelo animal de DP induzido por fibrina foi proposto por Davila et al., que demonstraram pela primeira vez que a fibrina é capaz de induzir a expressão de TGF- β 1 e desencadear fibrose no pênis de ratos (68). O papel da fibrina como determinante chave na patogênese da DP foi relatado anteriormente por Somers e Dawson, que demonstraram uma deposição excessiva de colágeno, desorganização das fibras elásticas e acúmulo de fibrinogênio e fibrina em tecidos retirados da placa fibrótica de indivíduos com DP (89).

No presente estudo, conseguimos confirmar que injeções repetidas de fibrina, induzem a formação de placa fibrótica na TA de ratos em 4 semanas, corroborando com os trabalhos anteriores que utilizaram este modelo animal (73, 90). Os estudos conduzidos anteriormente por Davila et al., demonstraram que a formação de fibrose no pênis de ratos pode ser observada a partir da terceira semana após a injeção de fibrina (68, 91). Uma vantagem deste modelo animal é o aparecimento mais rápido da placa fibrótica, em comparação com o modelo de TGF- β 1, além de apresentar alterações histológicas semelhantes à DP humana.

A partir das análises histopatológicas do nosso modelo animal, identificamos a presença de fibrose limitada a TA, poupando o corpo cavernoso. Estudos pré-clínicos anteriores, no entanto, frequentemente demonstram fibrose que se estende aos tecidos cavernosos (20, 92). Portanto, nossos resultados sugerem que o nosso modelo experimental representou de forma mais fidedigna e com maior semelhança ao que acontece na DP humana, e uma vez estabelecido em nosso laboratório, poderá ser utilizado como modelo pré-clínico da DP em pesquisas futuras que busquem por novas ferramentas terapêuticas para a doença.

A TA é composta principalmente por feixes de colágeno e fibras elásticas que envolvem o corpo cavernoso do pênis, sendo componentes essenciais para atingir a rigidez durante a ereção (20). Nossos resultados demonstraram que as injeções de fibrina levaram a deposição excessiva e desorganização dos feixes de colágeno na TA. Além disso, demonstramos que as fibras elásticas apresentaram aspecto fragmentado em decorrência da fibrose na TA dos animais. Estudos anteriores com modelos animais da DP, também observaram uma diminuição e quebra das fibras elásticas, levando a perda da elasticidade, ocasionada pela formação da placa fibrótica (88, 93, 94).

Evidências indicam o miRNA-29b como um potente inibidor da via de sinalização do TGF- β 1 e da biossíntese de colágeno (95-97). Nossos achados foram similares ao estudo de Wang et al., no qual relatou que a superexpressão do TGF- β 1 contribui para um aumento significativo dos níveis de colágeno I e III e que esse aumento da expressão de colágeno, também foi associado a uma diminuição significativa dos níveis de expressão do miRNA-29b em um modelo de fibrose renal (98).

Depois de identificarmos a subexpressão do miRNA-29b após as injeções de fibrina, partimos para a realização do tratamento, na tentativa de regular a sua expressão e então avaliarmos seu possível papel antifibrótico na doença. A partir disso, nossas análises histopatológicas e moleculares mostraram que as injeções com o miRNA-29b foi capaz de atenuar o desenvolvimento de fibrose na TA do pênis dos animais, possivelmente através da diminuição da expressão dos genes codificadores do colágeno tipo I e III e do TGF- β 1.

Corroborando com os nossos achados, Li et al., demonstraram a partir de um modelo animal de endometriose com presença de fibrose no endométrio, uma superexpressão de COL1A1 associada a uma perda significativa de miRNA-29b, e quando investigaram o potencial terapêutico deste miRNA, demonstraram que a restauração endógena do miRNA-29b inibiu a progressão da fibrose no endométrio através do bloqueio do TGF- β 1 e da diminuição do colágeno (97). Outro estudo revelou que a superexpressão do miRNA-29b também foi capaz de inibir a fibrose cardíaca em um modelo animal (99). Além disso, foi demonstrado que o miRNA-29b

é capaz de suprimir a fibrogênese, por controlar diretamente os genes COL1A1, COL3A1 e inibir a transcrição do TGF- β 1 (100).

Um recente ensaio clínico duplo-cego, randomizado, controlado por placebo de fase I, avaliou a segurança e tolerabilidade de um mimetizador do miRNA-29b como potencial terapêutico para fibrose cutânea, e demonstrou que diferentes doses de miRNA foram capazes de agir na repressão de genes de colágeno e TGF- β 1. Os efeitos colaterais observados nos indivíduos após a aplicação intradérmica foram, eritema e edema localizado de curta duração que se resolveram espontaneamente sem intervenção médica. Os achados desse estudo indicaram que o tratamento com o miRNA-29b pode ser uma terapia eficaz para prevenir fibrose na pele, suprimindo potencialmente a formação de cicatriz fibrótica (101). Montgomery et al., mostrou em seu estudo que, a entrega terapêutica de mimetizador de miRNA-29b durante a fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, restaurou a função endógena do miRNA-29b diminuindo a expressão de colágeno e revertendo a fibrose pulmonar (63). Aqui em nosso trabalho, conseguimos demonstrar pela primeira vez a partir de um modelo animal induzido por fibrina, que o miRNA-29b também pode ser uma ferramenta promissora para o tratamento da DP.

A terapêutica baseada em miRNA inclui mimetizadores e inibidores de miRNA (antagomiRs), que tem como objetivo diminuir e aumentar a expressão de genes alvo (102). Contudo, apesar de serem uma proposta atraente para o tratamento na área oncológica e em diversas patologias, existem obstáculos importantes, envolvendo a entrega segura, eficiente e direcionada de miRNAs aos tecidos alvos, que ainda precisam ser melhorados para a transição da terapia de miRNA para a clínica. As limitações incluem a baixa estabilidade *in vivo*, biodistribuição inadequada e efeitos indesejáveis, como toxicidade e inflamação (103, 104).

Nossos resultados demonstraram que as injeções locais com o miRNA-29b, causaram uma reação inflamatória na TA dos animais, corroborando com o estudo de Piao et al., que relataram que injeções repetidas na TA de ratos, ocasionaram o aprisionamento de células inflamatórias no local das injeções (93). Em adição, um dos grupos de polímeros mais utilizados para a entrega de ácidos nucleicos são os polímeros catiônicos, pois sendo carregados positivamente podem ser conjugados aos ácidos nucleicos carregados negativamente. Polímeros catiônicos derivados

sinteticamente incluem o polietilenoimina (PEI), como o que utilizamos no presente trabalho. A principal vantagem do sistema de entrega baseado em PEI é a rápida absorção e liberação de pequenos ácidos nucleicos, como os miRNAs, às células alvo. No entanto, as limitações associadas a esse sistema de entrega incluem, menor biodegradabilidade dentro da célula, levando ao seu acúmulo e citotoxicidade (105). Esses fatos podem possivelmente, explicar a presença de inflamação que encontramos nas análises histopatológicas após o tratamento com o miRNA.

Outro ponto relevante a ser considerado é que a grande complexidade do mecanismo fibrogênico, pode dificultar o desenvolvimento de uma ferramenta terapêutica eficaz, e a formulação de agentes capazes de atravessar a barreira fibrótica, conduzirá o desenvolvimento de terapias baseadas em miRNA seguras e eficazes para a DP e outras patologias fibróticas (106). Diante disso, destacamos a importância de novas abordagens capazes de transportar ácidos nucleicos através dessas barreiras, com o objetivo de evitar potenciais toxicidades e respostas imunes induzidas por miRNA. Até o momento, nossos achados sugerem que o miRNA-29b se apresenta como um candidato promissor para uma validação futura e novas estratégias de entregas devem ser consideradas para outros estudos experimentais da DP.

Limitações do estudo

Considerando nossos estudos *in vivo*, há algumas limitações que devemos considerar. Primeiramente, destacamos a dificuldade técnica no estabelecimento do modelo animal, por ser difícil injetar a solução de fibrina que apresenta um aspecto viscoso, através de uma pequena agulha hipodérmica, como já foi relatado por estudos anteriores. Outra limitação importante é que o modelo de rato pode não representar completamente a complexidade da DP no homem.

Nossos resultados mostram claramente que os desafios na entrega de miRNAs necessitam ser superados, uma vez que observamos que as injeções com o miRNA-29b ocasionou inflamação, e por isso, acreditamos que o tratamento com múltiplas injeções locais na TA pode não ser o mais adequado para o modelo pré-clínico da DP. Para ultrapassar essas limitações, novos estudos são necessários para avaliar a

segurança e tolerabilidade do miRNA-29b *in vivo* e posteriormente em uma possível aplicação clínica.

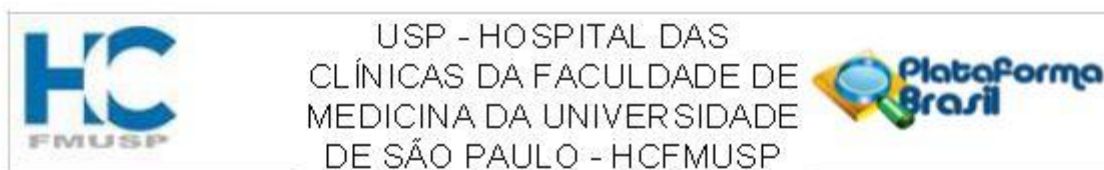
6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que os genes que codificam o colágeno tipo I e III estão superexpressos em pacientes com a DP. Em contraste, encontramos níveis baixos de TGF- β 1 nas amostras de placa fibrótica desses indivíduos.

Através dos estudos *in vivo*, as análises histopatológicas confirmaram o estabelecimento do modelo pré-clínico da DP em ratos, após injeções repetidas de fibrina, com subexpressão do miRNA-29b e superexpressão dos genes COL1A1 e TGF- β 1.

Após a realização do tratamento, demonstramos pela primeira vez que a superexpressão do miRNA-29b foi capaz de atenuar a fibrose em um modelo de rato da DP, possivelmente através da diminuição da expressão dos genes de colágenos tipo I e III e do TGF- β 1.

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética dos pacientes



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de expressão das metaloproteinases da matriz na doença de peyronie

Pesquisador: Sabrina Thalita dos Reis

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99663318.2.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.830.118

Apresentação do Projeto:

A proposta do estudo é analisar o perfil de expressão das metaloproteinases da Matriz (MMP) 1,2,3,8,9 e 13 em amostras teciduais de pacientes com doença de Peyronie (DP) e em pacientes sem doença (grupo controle), para tentar identificar se alguma dessas proteínas apresenta um padrão de expressão característico da doença.

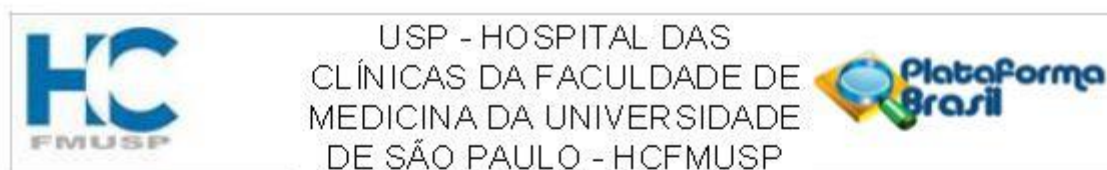
Objetivo da Pesquisa:

Serão analisadas amostras teciduais provenientes de albugínea, corpo cavernoso e placa fibrosa de 30 pacientes portadores de DP e albugínea de outros 30 pacientes sem DP. Estas amostras teciduais serão encaminhadas para o laboratório de investigação médica da disciplina de urologia (LIM55) em RNA later. Essas amostras serão processadas e a expressão gênica será avaliada por PCR em tempo real para avaliar o perfil de expressão das MMPs 1,2,3,8,9 e 13 e TIMP 1 e 3, nas biópsias de placas de pacientes com DP e de pacientes sem DP. Assim, estabelecer quais são as MMPs e/ou TIMPs que apresentam um impacto na DP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos, não existe nenhum desconforto associado uma vez que a biópsia será realizada com o paciente anestesiado durante a cirurgia para excisão da placa(grupo tratado) ou

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.830.118

para a prótese peniana (grupo controle), após a retirada do tecido, um fragmento será encaminhado para o laboratório.

Em relação aos benefícios, não há benefício direto para o participante da pesquisa; somente no final do estudo poderemos identificar algum benefício para os pacientes, como por exemplo, algum marcador importante para a doença de Peyronie que pode ser útil em pesquisas futuras envolvendo o tratamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As amostras teciduais serão encaminhadas para o LIM55 em RNA later, onde estas amostras serão processadas e a expressão gênica será avaliada por PCR em tempo real.

Serão posteriormente avaliados os resultados encontrados tanto nos pacientes portadores da DP como o grupo controle. Serão ao todo 60 pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Dentro do esperado e conforme a proposição. Haverá o TCLE.

Recomendações:

No momento não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

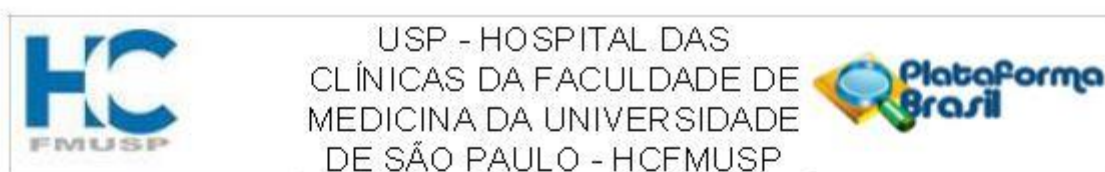
Projeto adequado e no momento não há pendências e nem lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.830.118

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1137365.pdf	30/01/2020 08:47:05		Aceito
Outros	Justificativa_adequada.docx	30/01/2020 08:45:58	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
Cronograma	Cronograma_novo.pdf	28/01/2020 14:49:46	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_TCLE_adequado.doc	28/01/2020 14:49:22	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoeyronienovo.docx	20/01/2020 11:59:48	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
Brochura Pesquisa	projetoeyronienovo.pdf	20/01/2020 11:50:22	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2966340.pdf	20/01/2020 11:48:19	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito
Folha de Rosto	FR_ass.pdf	25/04/2019 10:24:51	Sabrina Thalita dos Reis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Dvídio Pires de Campos, 226 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 2. Carta de aprovação da CEUA



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“O efeito terapêutico do microRNA-29b em um modelo experimental de Doença de Peyronie”**, registrada com o nº **1450/2020**, sob a responsabilidade de **Sabrina Thalita dos Reis Faria e Patricia Rodrigues Candido** apresentada pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 12/02/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 06-04-2020 Término: 06-04-2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Sprague Dawley
Nº de animais	30
Peso/Idade	12 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério de Produção de Ratos/ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 12 de fevereiro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo 3. Ficha técnica do produto comercial Tisseel Duo

Tisseel Duo 2 mL
fibrinogênio, aprotinina e trombina

Baxter

Selante de fibrina
Congelado
USO TÓPICO
1 mL de solução de proteína selante, congelada e
1 mL de solução de trombina congelada, em uma
seringa de duas câmaras de uso único, com uma
tampa na ponta.

- Componente 1 – 1 mL de solução de proteína selante com 91 mg/mL de fibrinogênio humano e 3000 UIC/mL de aprotinina sintética
- Componente 2 – 1 mL de solução de trombina com 500 UI/mL de trombina humana e 40 µmol/mL de cloreto de cálcio

VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA
Não injetar o produto.

0726798 

Ler a bula antes de usar o produto.
Armazenar e transportar o produto congelado ($\leq -20^{\circ}\text{C}$). Após o descongelamento, a solução não deve ser re-congelada ou refrigerada.
Produto sensível a temperatura. Não expor o produto a temperatura acima de 37°C .
Fabricado por:
Baxter AG – Viena - Áustria
Baxter Hospitalar Ltda.
SAC - Serviço de Atendimento ao Consumidor:
0800 012 5522

Baxter

LOT.: D4V027AA
VAL.: 04 2022
P

8 REFERÊNCIAS

1. Jalkut M, Gonzalez-Cadavid N, Rajfer J. Peyronie's Disease: A Review. *Rev Urol.* 2003;5(3):142-8.
2. Taylor FL, Levine LA. Peyronie's Disease. *Urol Clin North Am.* 2007;34(4):517-34, vi.
3. Hussein AA, Alwaal A, Lue TF. All about Peyronie's disease. *Asian J Urol.* 2015;2(2):70-8.
4. Rhoden EL, Teloken C, Ting HY, Lucas ML, Teodósio da Ros C, Ary Vargas Souto C. Prevalence of Peyronie's disease in men over 50-y-old from Southern Brazil. *Int J Impot Res.* 2001;13(5):291-3.
5. Punjani N, Nascimento B, Salter C, Miranda E, Terrier J, Taniguchi H, et al. Predictors of Depression in Men With Peyronie's Disease Seeking Evaluation. *J Sex Med.* 2021;18(4):783-8.
6. Mohede DCJ, Riesmeijer SA, de Jong IJ, Werker PMN, van Driel MF. Prevalence of Peyronie and Ledderhose Diseases in a Series of 730 Patients with Dupuytren Disease. *Plast Reconstr Surg.* 2020;145(4):978-84.
7. Canat HL, Can O, Ozbir S, Cakir SS, Culha MG, Bayraktarli RY, et al. Is high levels of vitamin D a new risk factor for Peyronie's disease? *Andrologia.* 2019;51(9):e13368.
8. Segundo A, Glina S. Prevalence, Risk Factors, and Erectile Dysfunction Associated With Peyronie's Disease Among Men Seeking Urological Care. *Sex Med.* 2020;8(2):230-6.
9. El-Sakka AI, Salabas E, Dinçer M, Kadioglu A. The pathophysiology of Peyronie's disease. *Arab J Urol.* 2013;11(3):272-7.
10. Devine CJ, Somers KD, Jordan SG, Schlossberg SM. Proposal: trauma as the cause of the Peyronie's lesion. *J Urol.* 1997;157(1):285-90.
11. Jarow JP, Lowe FC. Penile trauma: an etiologic factor in Peyronie's disease and erectile dysfunction. *J Urol.* 1997;158(4):1388-90.
12. Brock G, Hsu GL, Nunes L, von Heyden B, Lue TF. The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. *J Urol.* 1997;157(1):276-81.
13. Moreland RB, Nehra A. Pathophysiology of Peyronie's disease. *Int J Impot Res.* 2002;14(5):406-10.
14. Bilgutay AN, Pastuszak AW. Peyronie's disease: a review of etiology, diagnosis, and management. *Curr Sex Health Rep.* 2015;7(2):117-31.
15. Graziottin TM. The pathophysiology of Peyronie's disease: beyond the Smith's space. *Int Braz J Urol.* 2015;41(6):1040-2.
16. Di Maida F, Cito G, Lambertini L, Valastro F, Morelli G, Mari A, et al. The Natural History of Peyronie's Disease. *World J Mens Health.* 2020.
17. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(2):94-101.
18. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214(2):199-210.
19. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact.* 2018;292:76-83.
20. Castiglione F, Hedlund P, Van der Aa F, Bivalacqua TJ, Rigatti P, Van Poppel H, et al. Intratunical injection of human adipose tissue-derived stem cells prevents fibrosis and is associated with improved erectile function in a rat model of Peyronie's disease. *Eur Urol.* 2013;63(3):551-60.
21. Lin CS, Lin G, Wang Z, Maddah SA, Lue TF. Upregulation of monocyte chemoattractant protein 1 and effects of transforming growth factor-beta 1 in Peyronie's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295(4):1014-9.

22. da Silva IR, Tiveron LCRD, da Silva MV, Peixoto AB, Carneiro CAX, Dos Reis MA, et al. In Situ Cytokine Expression and Morphometric Evaluation of Total Collagen and Collagens Type I and Type III in Keloid Scars. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6573802.
23. Castiglione F, Hedlund P, Weyne E, Hakim L, Montorsi F, Bivalacqua TJ, et al. Intratunical Injection of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Restores Collagen III/I Ratio in a Rat Model of Chronic Peyronie's Disease. *Sex Med.* 2019;7(1):94-103.
24. Campbell J, Alzubaidi R. Understanding the cellular basis and pathophysiology of Peyronie's disease to optimize treatment for erectile dysfunction. *Transl Androl Urol.* 2017;6(1):46-59.
25. Larsen SM, Levine LA. Peyronie's disease: review of nonsurgical treatment options. *Urol Clin North Am.* 2011;38(2):195-205.
26. Hartzell R. Psychosexual Symptoms and Treatment of Peyronie's Disease Within a Collaborative Care Model. *Sex Med.* 2014;2(4):168-77.
27. Levine LA, Greenfield JM. Establishing a standardized evaluation of the man with Peyronie's disease. *Int J Impot Res.* 2003;15 Suppl 5:S103-12.
28. Al-Thakafi S, Al-Hathal N. Peyronie's disease: a literature review on epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis and work-up. *Transl Androl Urol.* 2016;5(3):280-9.
29. Parmar M, Masterson JM, Masterson TA. The role of imaging in the diagnosis and management of Peyronie's disease. *Curr Opin Urol.* 2020;30(3):283-9.
30. Rainer QC, Rodriguez AA, Bajic P, Galor A, Ramasamy R, Masterson TA. Implications of Calcification in Peyronie's Disease, A Review of the Literature. *Urology.* 2021.
31. Gouveia Nascimento BC, de Paula Miranda E, Abdo CHN. Desafios e importância da avaliação pré-operatória na doença de Peyronie. *Biblioteca Virtual em Saúde.* 2021.
32. Ziegelmann MJ, Bajic P, Levine LA. Peyronie's disease: Contemporary evaluation and management. *Int J Urol.* 2020;27(6):504-16.
33. Capoccia E, Levine LA. Contemporary Review of Peyronie's Disease Treatment. *Curr Urol Rep.* 2018;19(7):51.
34. Brimley SC, Yafi FA, Greenberg J, Hellstrom WJG, Tue Nguyen HM, Hatzichristodoulou G. Review of Management Options for Active-Phase Peyronie's Disease. *Sex Med Rev.* 2019;7(2):329-37.
35. Barrett-Harlow B, Clavell-Hernandez J, Wang R. New Developments in Surgical Treatment for Penile Size Preservation in Peyronie's Disease. *Sex Med Rev.* 2019;7(1):156-66.
36. Hatzichristodoulou G. Grafting techniques for Peyronie's disease. *Transl Androl Urol.* 2016;5(3):334-41.
37. Herati AS, Pastuszak AW. The Genetic Basis of Peyronie Disease: A Review. *Sex Med Rev.* 2016;4(1):85-94.
38. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1202-7.
39. Vettori S, Gay S, Distler O. Role of MicroRNAs in Fibrosis. *Open Rheumatol J.* 2012;6:130-9.
40. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
41. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-65.

42. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
43. Hsu PW, Huang HD, Hsu SD, Lin LZ, Tsou AP, Tseng CP, et al. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D135-9.
44. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016-27.
45. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-6.
46. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
47. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11(3):228-34.
48. Ying SY, Lin SL. Intronic microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(3):515-20.
49. Fan X, Gao Y, Zhang X, Lughmani HY, Kennedy DJ, Haller ST, et al. A strategic expression method of miR-29b and its anti-fibrotic effect based on RNA-sequencing analysis. *PLoS One.* 2020;15(12):e0244065.
50. He Y, Huang C, Lin X, Li J. MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie.* 2013;95(7):1355-9.
51. Harmanci D, Erkan EP, Kocak A, Akdogan GG. Role of the microRNA-29 family in fibrotic skin diseases. *Biomed Rep.* 2017;6(6):599-604.
52. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13027-32.
53. Deng Z, He Y, Yang X, Shi H, Shi A, Lu L, et al. MicroRNA-29: A Crucial Player in Fibrotic Disease. *Mol Diagn Ther.* 2017;21(3):285-94.
54. Yamada Y, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ohno SI, Kuroda M. Novel form of miR-29b suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171957.
55. Gong X, Wang X, Zhou F. Liver microRNA-29b-3p positively correlates with relative enhancement values of magnetic resonance imaging and represses liver fibrosis. *J Biochem.* 2020;168(6):603-9.
56. Chen HY, Zhong X, Huang XR, Meng XM, You Y, Chung AC, et al. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Mol Ther.* 2014;22(4):842-53.
57. Li J, Cen B, Chen S, He Y. MicroRNA-29b inhibits TGF- β 1-induced fibrosis via regulation of the TGF- β 1/Smad pathway in primary human endometrial stromal cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(5):4229-37.
58. Cheng J, Wang Y, Wang D, Wu Y. Identification of collagen 1 as a post-transcriptional target of miR-29b in skin fibroblasts: therapeutic implication for scar reduction. *Am J Med Sci.* 2013;346(2):98-103.
59. Iscaife A, Reis ST, Morais DR, Viana NI, da Silva IA, Pimenta R, et al. Treating metastatic prostate cancer with microRNA-145. *Apoptosis.* 2018;23(7-8):388-95.
60. Wang Z. The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods Mol Biol.* 2011;676:211-23.
61. Chau BN, Brenner DA. What goes up must come down: the emerging role of microRNA in fibrosis. *Hepatology.* 2011;53(1):4-6.
62. Chen Y, Mohammed A, Oubaidin M, Evans CA, Zhou X, Luan X, et al. Cyclic stretch and compression forces alter microRNA-29 expression of human periodontal ligament cells. *Gene.* 2015;566(1):13-7.

63. Montgomery RL, Yu G, Latimer PA, Stack C, Robinson K, Dalby CM, et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1347-56.
64. Dos Santos VG, Dos Santos GA, Neto CB, Viana NI, Pimenta R, Guimarães VR, et al. Downregulation of miR-29b is associated with Peyronie's disease. *Urologia*. 2021;3915603211036628.
65. Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J. Experimental models of Peyronie's disease. Implications for new therapies. *J Sex Med*. 2009;6(2):303-13.
66. Chung E, De Young L, Brock GB. Rat as an animal model for Peyronie's disease research: a review of current methods and the peer-reviewed literature. *Int J Impot Res*. 2011;23(6):235-41.
67. Bivalacqua TJ, Diner EK, Novak TE, Vohra Y, Sikka SC, Champion HC, et al. A rat model of Peyronie's disease associated with a decrease in erectile activity and an increase in inducible nitric oxide synthase protein expression. *J Urol*. 2000;163(6):1992-8.
68. Davila HH, Ferrini MG, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Fibrin as an inducer of fibrosis in the tunica albuginea of the rat: a new animal model of Peyronie's disease. *BJU Int*. 2003;91(9):830-8.
69. El-Sakka AI, Selph CA, Yen TS, Dahiya R, Lue TF. The effect of surgical trauma on rat tunica albuginea. *J Urol*. 1998;159(5):1700-7.
70. Cohen DJ, Reynaldo WV, Borba VB, Theodoro TR, Petri G, Cavalheiro RP, et al. New in vivo model to assess macroscopic, histological and molecular changes in Peyronie's Disease. *Andrology*. 2021.
71. Pinheiro AC, Costa WS, Cardoso LE, Sampaio FJ. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *J Urol*. 2000;164(5):1802-6.
72. Felix-Patricio B, Medeiros JL, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ. Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats. *J Sex Med*. 2015;12(1):39-47.
73. Kwon KD, Choi MJ, Park JM, Song KM, Kwon MH, Batbold D, et al. Silencing histone deacetylase 2 using small hairpin RNA induces regression of fibrotic plaque in a rat model of Peyronie's disease. *BJU Int*. 2014;114(6):926-36.
74. Cohen DJ, Oliveira AV, Theodoro TR, Petri G, Melo CM, Cavalheiro RP, et al. Extracellular matrix alterations after blood instillation in tunica albuginea of rats. *Int J Impot Res*. 2018;30(2):85-92.
75. Spotnitz WD. Commercial fibrin sealants in surgical care. *Am J Surg*. 2001;182(2 Suppl):8S-14S.
76. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *Am J Surg*. 2001;182(2 Suppl):1S-7S.
77. Zhao W, Cheng L, Quek C, Bellingham SA, Hill AF. Novel miR-29b target regulation patterns are revealed in two different cell lines. *Sci Rep*. 2019;9(1):17449.
78. Magee TR, Qian A, Rajfer J, Sander FC, Levine LA, Gonzalez-Cadavid NF. Gene expression profiles in the Peyronie's disease plaque. *Urology*. 2002;59(3):451-7.
79. Somers KD, Sismour EN, Wright GL, Devine CJ, Gilbert DA, Horton CE. Isolation and characterization of collagen in Peyronie's disease. *J Urol*. 1989;141(3):629-31.
80. Costa WS, Rebello SB, Cardoso LE, Cavalcanti AG, Sampaio FJ. Stereological and biochemical analysis of muscular and connective tissue components in the penile

corpus cavernosum adjacent to the fibrous plaque of Peyronie's disease. *BJU Int.* 2009;103(2):212-6.

81. Hellstrom WJ, Bivalacqua TJ. Peyronie's disease: etiology, medical, and surgical therapy. *J Androl.* 2000;21(3):347-54.

82. Pavone C, Caruana G, Abbadessa D, Scaduto G, Gambino G, Serretta V, et al. Cytokine gene expression in the tunica albuginea of patients with Peyronie's disease. Pilot study with a control group. *Urologia.* 2012;79(3):189-96.

83. El-Sakka AI, Hassoba HM, Pillarisetty RJ, Dahiya R, Lue TF. Peyronie's disease is associated with an increase in transforming growth factor-beta protein expression. *J Urol.* 1997;158(4):1391-4.

84. Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J. Mechanisms of Disease: new insights into the cellular and molecular pathology of Peyronie's disease. *Nat Clin Pract Urol.* 2005;2(6):291-7.

85. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen.* 2016;24(2):215-22.

86. Gokce A, Abd Elmageed ZY, Lasker GF, Bouljihad M, Kim H, Trost LW, et al. Adipose tissue-derived stem cell therapy for prevention and treatment of erectile dysfunction in a rat model of Peyronie's disease. *Andrology.* 2014;2(2):244-51.

87. Li J, Wang S, Qin F, Zhu M, You X, Wu C, et al. Reduction in Peyronie's-like plaque size using a vacuum erection device in a rat model of Peyronie's disease via the TGF- β /SMAD signalling pathway. *Andrologia.* 2018;50(7):e13051.

88. Antoniassi T, Júnior FNF, Spessoto LCF, Guerra LH, Campos SS, Taboga S. Anti-fibrotic effect of mycophenolate mofetil on Peyronie's disease experimentally induced with TGF- β . *Int J Impot Res.* 2020;32(2):201-6.

89. Somers KD, Dawson DM. Fibrin deposition in Peyronie's disease plaque. *J Urol.* 1997;157(1):311-5.

90. Song KM, Chung DY, Choi MJ, Ghatak K, Minh NN, Limanjaya A, et al. Vactosertib, a Novel, Orally Bioavailable Activin Receptor-Like Kinase 5 Inhibitor, Promotes Regression of Fibrotic Plaques in a Rat Model of Peyronie's Disease. *World J Mens Health.* 2020;38(4):552-63.

91. Davila HH, Magee TR, Vernet D, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Gene transfer of inducible nitric oxide synthase complementary DNA regresses the fibrotic plaque in an animal model of Peyronie's disease. *Biol Reprod.* 2004;71(5):1568-77.

92. Gokce A, Abd Elmageed ZY, Lasker GF, Bouljihad M, Braun SE, Kim H, et al. Intratunical Injection of Genetically Modified Adipose Tissue-Derived Stem Cells with Human Interferon α -2b for Treatment of Erectile Dysfunction in a Rat Model of Tunica Albuginea Fibrosis. *J Sex Med.* 2015;12(7):1533-44.

93. Piao S, Ryu JK, Shin HY, Zhang L, Song SU, Han JY, et al. Repeated intratunical injection of adenovirus expressing transforming growth factor-beta1 in a rat induces penile curvature with tunical fibrotic plaque: a useful model for the study of Peyronie's disease. *Int J Androl.* 2008;31(3):346-53.

94. Jiang H, Gao Q, Che X, Zhu L, Zhang Z, Chen Y, et al. Repeated Micro-Trauma of the Penile Tunica Albuginea: A New Animal Model of Peyronie's Disease. *Urol Int.* 2018;100(2):228-39.

95. Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, et al. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(8):1462-74.

96. Zhu Y, Li Z, Wang Y, Li L, Wang D, Zhang W, et al. Overexpression of miR-29b reduces collagen biosynthesis by inhibiting heat shock protein 47 during skin wound healing. *Transl Res*. 2016;178:38-53.e6.
97. Li J, Du S, Sheng X, Liu J, Cen B, Huang F, et al. MicroRNA-29b Inhibits Endometrial Fibrosis by Regulating the Sp1-TGF- β 1/Smad-CTGF Axis in a Rat Model. *Reprod Sci*. 2016;23(3):386-94.
98. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(2):252-65.
99. Zhang Y, Huang XR, Wei LH, Chung AC, Yu CM, Lan HY. miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling. *Mol Ther*. 2014;22(5):974-85.
100. Yu JW, Duan WJ, Huang XR, Meng XM, Yu XQ, Lan HY. MicroRNA-29b inhibits peritoneal fibrosis in a mouse model of peritoneal dialysis. *Lab Invest*. 2014;94(9):978-90.
101. Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, Seto AG, Hong SJ, Mustoe TA, et al. A MicroRNA-29 Mimic (Replarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *J Invest Dermatol*. 2019;139(5):1073-81.
102. Sun P, Liu DZ, Jickling GC, Sharp FR, Yin KJ. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(7):1125-48.
103. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release*. 2013;172(3):962-74.
104. Hueso M, Mallén A, Suñé-Pou M, Aran JM, Suñé-Negre JM, Navarro E. ncRNAs in Therapeutics: Challenges and Limitations in Nucleic Acid-Based Drug Delivery. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
105. Ganju A, Khan S, Hafeez BB, Behrman SW, Yallapu MM, Chauhan SC, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer. *Drug Discov Today*. 2017;22(2):424-32.
106. Puente A, Fortea JI, Cabezas J, Arias Loste MT, Iruzubieta P, Llerena S, et al. LOXL2-A New Target in Antifibrogenic Therapy? *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).

9 APÊNDICES



Certificamos que **Patrícia Rodrigues Candido** apresentou o trabalho intitulado **Under-expression of microRNA-29b may favor the development of Peyronie's disease, via downregulation of COL1A1 and COL3A1 genes.**, de autoria de *Patrícia Candido; Caroline Chiovatto; Nayara Viana; Ruan Pimenta; Gabriel Arantes dos Santos; Poliana Romão; Vitória Ghazarian; Katia Ramos Moreira Leite; Miguel Srougi; Sabrina Thalita dos Reis*, no GENÉTICA 2021 - Brazilian Congress of Genetics, de **13 a 16 de setembro de 2021**, em formato online.


Ana Maria Benko Iseppon
Presidente da SBG

 SOCIEDADE
BRASILEIRA
DE GENÉTICA


Ândrea Kely Ribeiro dos Santos
Primeira Secretária da SBG

29º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade de São Paulo

MENÇÃO HONROSA

A Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo atribui Menção Honrosa a **Caroline Brandão Chiovatto** pela apresentação do trabalho **Estabelecimento de um modelo in vivo de doença de peyronie** na área de **Ciências da Saúde** na Etapa Internacional do **29º** Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, sob a orientação de **Sabrina Thalita dos Reis Faria**, com a colaboração de **Ruan Cesar Aparecido Pimenta**, e **Patricia Rodrigues Candido**, em **2021**.



Prof. Dr. Sylvio Roberto Accioly Canuto
Pró Reitor de Pesquisa
Universidade de São Paulo

Documento emitido às 11:05:41 horas do dia 08/12/2021 (hora e data de Brasília).

Código de controle: C28J-L4QF-CYY7-VW61

A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da Universidade de São Paulo

<http://uspdigital.usp.br/webdoc>

CERTIFICADO

33^º CONGRESSO BRASILEIRO DE
 PATOLOGIA
 FOZ DO IGUAÇU 03 A 06 DE AGOSTO DE 2022

26^º CONGRESSO BRASILEIRO DE
 CITOPATOLOGIA

Certificamos que o trabalho


AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO MICRORNA-29B EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DA DOENÇA DE PEYRONIE

foi apresentado no formato Pôster durante o 33º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA E 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE CITOPATOLOGIA, realizado no período de 03 a 06 de agosto de 2022 na cidade de FOZ DO IGUAÇU.

Autores:

PATRICIA CANDIDO, CAROLINE CHIOVATTO, RUAN PIMENTA, POLIANA ROMÃO, JULIANA ALVES DE CAMARGO, GABRIEL A DOS SANTOS, VANESSA RIBEIRO GUIMARÃES, VITÓRIA GHAZARIAN, IRAN AMORIM SILVA, MIGUEL SROUGI, WILLIAN NAHAS, KATIA RAMOS MOREIRA LEITE, NAYARA IZABEL VIANA, SABRINA THALITA DOS REIS

FOZ DO IGUAÇU, 06 de agosto de 2022



Katia Ramos Moreira Leite
 CRM 51442/SP
 Presidente da Sociedade
 Brasileira de Patologia



Isabela Werneck da Cunha
 CRM 102851/SP
 Vice-Presidente P/ Assuntos
 Acadêmicos Sociedade Brasileira
 de Patologia



Mauro Tadeu Ajaaj Saieg
 CRM 105333/SP
 Presidente Sociedade Brasileira
 de Citopatologia



Regina de Paula Xavier Gama
 CRM 15071/PR
 Presidente do 33º Congresso
 Brasileiro de Patologia



Luiz Martins Collição
 CRM 8402/PR
 Presidente do 26º Congresso
 Brasileiro de Citopatologia

