

Júlia Cisilotto

**EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES EM PACIENTES
COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA AGUDIZADA E
EXPERIMENTAÇÃO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO
FUNCIONAL DOS microRNAs**

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutora em Farmácia

Orientadora: Prof. Dra. Tânia Beatriz
Creczynski Pasa

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cisilotto, Júlia
EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES EM PACIENTES
COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA AGUDIZADA E
EXPERIMENTAÇÃO MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO FUNCIONAL
DOS microRNAs / Júlia Cisilotto ; orientadora,
Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, 2018.
157 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. insuficiência hepática crônica
agudizada (ACLF). 3. biomarcador. 4. miRNAs. 5.
validação de alvos de miRNAs. I. Creczynski-Pasa,
Tânia Beatriz. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

**“EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES EM
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA
CRÔNICA AGUDIZADA E EXPERIMENTAÇÃO
MOLECULAR PARA AVALIAÇÃO FUNCIONAL
DOS microRNAs”**

POR

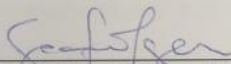
Júlia Cisilotto

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:



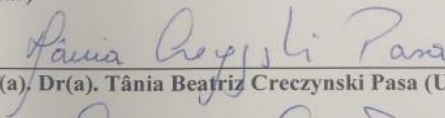
Prof(a). Dr(a). Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



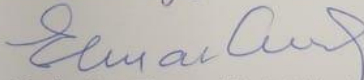
Prof(a). Dr(a). Sara Löfgren (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Ionara Ródrigues Siqueira (UFRGS - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientador)



Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 17 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, agradeço a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço os ensinamentos que compartilhamos nesse período de mestrado e doutorado. Obrigada pelo acolhimento, carinho, confiança, amizade e também por compartilhar seu amplo conhecimento comigo e com todos os pesquisadores do laboratório.

Agradeço o professor Dr. Leonardo de Luca Schiavon por todo suporte na realização deste trabalho e pelo exemplo profissional.

A todos os colegas do laboratório, muito obrigada pelo auxílio na realização dos experimentos, pela troca de conhecimentos, experiências e pela amizade que construímos.

Aos membros da banca examinadora, meus agradecimentos pela contribuição e disponibilidade de avaliar este trabalho.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Incluo, de forma especial, minha família e meu companheiro Moriel, que de uma forma ou de outra deixaram meus dias mais felizes e também contribuíram para a realização deste trabalho. Expresso a minha gratidão a todos.

Este trabalho não poderia ser concluído sem ajuda de todos vocês.

Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.
Cora Coralina (1889-1985)

RESUMO

A insuficiência hepática crônica agudizada (do inglês: *acute-on-chronic liver failure*, ACLF) é uma complicação da cirrose e está associada à falência de um ou mais órgãos e alta mortalidade em curto prazo. Apesar da doença de base ser irreversível, pacientes ACLF possuem potencial de reversibilidade da deterioração aguda da cirrose e recuperação para o estado prévio, antes de um evento de agudização. Sendo assim, o acompanhamento de pacientes com cirrose com a detecção de biomarcadores, tais como os microRNAs (miRNAs), podem auxiliar na prevenção de ACLF e no prognóstico destes pacientes. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, estáveis nos fluidos biológicos, e a diferença nos níveis de expressão pode indicar a presença ou ausência de determinada doença. Além disso, para o entendimento da função dos miRNAs é importante conhecer os respectivos genes-alvo. A identificação pode ser feita por meio da predição computacional de alvos ou experimentação molecular. Diante deste panorama, os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes ACLF e selecionar possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Além de validar a regulação pós-transcricional mediada por um miRNA de um gene selecionado a partir da predição computacional. Para isso, o RNA total das amostras de soro de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) por descompensação aguda da cirrose foi extraído e os miRNAs diferencialmente expressos foram detectados pela técnica de microarranjo. Os resultados mostraram diferentes miRNAs com expressão alterada nas amostras dos pacientes ACLF bem como naqueles que foram a óbito. Os principais miRNAs significativamente alterados para estas amostras foram: let-7a-5p, let-7g-5p, miR-106b-5p, miR-107, miR-126-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-25-3p, miR-451a, miR-15b-5p, miR-199a-3p, miR-223-3p, miR-575, miR-1202 e miR-5100. Entre esses os miRNAs miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-20a-5p, miR-25-3p; miR-451a; miR-223-3p; miR-575; miR-1202 e miR-5100 foram selecionados para validação por transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). Na etapa de validação foram incluídas amostras de 139 pacientes. Destes, 35 pacientes (25%) apresentavam ACLF e 31 (22%) evoluíram para óbito em 30 dias. Verificou-se que o miR-223-3p e o miR-25-3p estavam significativamente alterados nos pacientes com ACLF ($p=0,026$ e $p=0,009$, respectivamente) e nos que evoluíram para óbito em 30 dias ($p=0,006$ e $p=0,008$, respectivamente). Estes miRNAs correlacionaram-se negativamente com valores de creatinina, pontuação de CLIF-SOFA e somente o miR-25-3p correlacionou-se negativamente com a escala MELD.

ACLF na admissão foi associada de forma independente a menores níveis de sódio (OR 0,82; IC95% 0,74 - 0,91; $p < 0,001$), Child-Pugh C (OR 3,48; IC95% 1,34 - 9,01; $p = 0,010$), hepatite C (OR 3,69; IC95% 1,35 - 10,04; $p = 0,011$) e miR-25-3p (OR 0,99; IC95% 0,98 - 0,99; $p = 0,040$). Neste trabalho também foi realizada análise de regressão univariada de Cox e foi observado que os miRNAs miR-223-3p (HR 0,99; IC95% 0,98 - 0,99; $p = 0,030$) e miR-25-3p (HR 0,99; IC95% 0,98 - 0,99; $p = 0,013$) foram associados a menor sobrevivência em 30 dias. Os demais miRNAs estudados não foram associados à presença de ACLF e a um prognóstico desfavorável. Na análise de regressão múltipla de Cox a mortalidade em 30 dias foi associada de forma independente à presença de ACLF (HR 2,69; IC95% 1,25 - 5,80; $p = 0,012$), Child-Pugh C (HR 2,92; IC95% 1,28 - 6,66; $p = 0,011$) e menor expressão de miR-25-3p (HR 0,99; IC95% 0,99 - 1,00; $p = 0,044$). A probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier em 30 dias foi de 70,1% nos indivíduos com expressão do miR-25-3p < 50 e de 87,1% naqueles com expressão ≥ 50 (log-rank teste, $p = 0,012$). Conclui-se que em pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose, as expressões dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p associaram-se à presença de ACLF e ao prognóstico. Destes, o miR-25-3p relacionou-se de forma independente à ACLF na admissão e evolução para óbito em 30 dias. Além disso, neste trabalho também foi verificada a regulação da quimiocina pró-inflamatória CCL1 pelo miR-20a-5p. Para isso, a região 3'UTR do gene CCL1 foi clonada no plasmídeo pmirGLO e o miRNA precursor (pre-miR-20a) foi clonado no plasmídeo psiUx. Os plasmídeos com os insertos foram transfectados na linhagem celular de carcinoma cervical (HeLa) e em seguida realizado o ensaio da Luciferase. Foi possível verificar uma redução de aproximadamente 50% na atividade relativa da Luciferase. Sendo assim, foi possível validar a interação do miR-20a-5p com o gene CCL1.

Palavras-chave: insuficiência hepática crônica agudizada (ACLF), biomarcador, miRNAs, prognóstico, predição de alvos, validação de alvos de miRNA

ABSTRACT

CIRCULATING microRNAs EXPRESSION OF PATIENTS WITH ACUTE-ON-CHRONIC LIVER FAILURE AND MOLECULAR EXPERIMENTATION FOR FUNCTIONAL ASSESSMENT OF microRNAs

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) is a complication of cirrhosis and is associated with organs failure and high mortality in the short term. Although the underlying disease is irreversible, ACLF patients have the potential for reversibility of acute deterioration of cirrhosis and recovery to the previous state, prior to the acute event. Thus, there is a need for the monitoring of patients with cirrhosis with the detection of biomarkers, such as microRNAs (miRNAs), which may assist in the prevention and prognosis of ACLF. The miRNAs are small non-coding RNA molecules, stable in biological fluids, and the difference in expression levels may indicate the presence or absence of a particular disease. Furthermore, to understand the function of the miRNAs it is important to know the respective gene targets. The identification can be done through target prediction softwares or molecular experimentation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the miRNAs expression in serum samples from ACLF patients and to select possible biomarkers for diagnosis and prognosis, as well as to validate the post-transcriptional regulation mediated by a miRNA of a gene selected by the prediction software. To that end, total RNA of serum samples from patients hospitalized in the Hospital of the Federal University of Santa Catarina by acute decompensation of cirrhosis was extracted and the miRNAs differentially expressed were detected by miRNA microarray. The results showed different miRNAs altered in ACLF patients as well as in the patients who died. The major miRNAs significantly altered for these samples were: let-7a-5p, let-7g-5p, miR-106b-5p, miR-107, miR-126-3p, miR-17-5p, miR- miR-25-3p, miR-451a, miR-15b-5p, miR-199a-3p, miR-223-3p, miR-575, miR-1202 and miR-5100. Among these the miRNAs miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-20a-5p, miR-25-3p; miR-451a; miR-223-3p; miR-575; miR-1202 and miR-5100 were selected for validation by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-qPCR). At the validation stage, samples from 139 patients were included. Of these, 35 patients (25%) presented ACLF and 31 (22%) died after 30 days. It was found that miR-223-3p and miR-25-3p were significantly altered in ACLF patients ($p=0.026$ and $p=0.009$, respectively) and in those who died at 30 days ($p=0.006$ and $p=0.008$, respectively). These miRNAs were negatively correlated with creatinine values,

CLIF-SOFA score and only miR-25-3p correlated negatively with the MELD scale. ACLF was associated in an independently manner with lower levels of sodium (OR 0.82, CI95% 0.74 - 0.91, $p < 0.001$), Child-Pugh C (OR 3.48, CI95% 1.34 - 9.01, $p = 0.010$), hepatitis C (OR 3.69, CI95% 1.35 - 10.04, $p = 0.011$) and miR-25-3p (OR 0.99, CI95% 0.98 - 0.99, $p = 0.040$). In this work, the univariate Cox regression analysis was performed, and it was observed that miRNAs miR-223-3p (HR 0.99, CI95% 0.98 - 0.99, $p = 0.030$) and miR-25-3p (HR 0.99, CI95% 0.98 - 0.99, $p = 0.013$) were associated with the lowest survival in 30 days. The remaining miRNAs studied were not associated to the presence of ACLF or prognosis. In the multiple Cox regression analysis, 30-day mortality was independently associated with the presence of ACLF (HR 2.69, CI95% 1.25 - 5.80, $p = 0.012$), Child-Pugh C (HR 2.92, CI95% 1.28 - 6.66, $p = 0.011$) and lower expression of miR-25-3p (HR 0.99, CI95% 0.99-1.00, $p = 0.044$). The Kaplan-Meier survival rate after 30 days was 70.1% in individuals with miR-25-3p < 50 and 87.1% in those with ≥ 50 expression (log-rank test, $p = 0.012$). It was concluded that in patients hospitalized for acute decompensation of cirrhosis, the miR-223-3p and miR-25-3p were associated with the presence of ACLF and the prognosis. Of these, miR-25-3p was independently related to ACLF at admission and evolution to death within 30 days. Moreover, in this work the regulation of the pro-inflammatory cytokine CCL1 by miR-20a-5p was also verified. For this, the 3'UTR region of the CCL1 gene was cloned into the plasmid pmirGLO and the precursor miRNA (pre-miR-20a) was cloned into the plasmid psiUx. Plasmids with the inserts were transfected into the cervical carcinoma cell line (HeLa) and then performed the Luciferase assay. A relative reduction of approximately 50% in relative Luciferase activity was observed. Thus, it was possible to validate the interaction of miR-20a-5p with the CCL1 gene.

Keywords: Acute-on-chronic liver failure (ACLF). biomarkers. miRNAs. prognosis. target prediction. validation of miRNA targets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da doença hepática crônica	34
Figura 2. Estágios da cirrose compensada e descompensada	36
Figura 3. Taxa de mortalidade de pacientes com e sem ACLF (28 e 90 dias)	39
Figura 4. Biogênese dos miRNAs	43
Figura 5. Características dos principais programas para predição de alvos de miRNAs.....	46
Figura 6. Esquema de representação da RT-qPCR.....	57
Figura 7. Matriz de expressão dos miRNAs significativamente alterados em pacientes sem ACLF, com ACLF e no grupo controle. Os valores de intensidade de expressão variaram de 7 (verde claro) a -7 (vermelho claro).	69
Figura 8. Diagrama de Venn com os miRNAs alterados nos grupos com ausência ACLF × ACLF presente e Sobrevivente × Óbito e que foram selecionados para validação por RT-qPCR.....	73
Figura 9. Gráficos do tipo <i>Box Plot</i> dos miRNAs selecionados para validação por RT-qPCR	74
Figura 10. Eficiência da qPCR determinada pelo programa LinRegPCR.	81
Figura 11. Ciclo quantitativo (Cq) médio do miRNA exógeno cel-miR-238.....	82
Figura 12. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes com ou sem ACLF.....	84
Figura 13. Expressão relativa dos miRNAs miR-20a-5p, miR-223-3p e miR-25-3p em relação ao desfecho da internação (alta hospitalar ou óbito).....	84
Figura 14. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias.....	85
Figura 15. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes com encefalopatia hepática na admissão	86
Figura 16. Curva ROC (<i>Receive Operator Curve</i>) do miR-25-3p	90
Figura 17. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para análise da relação da expressão relativa do miR-25-3p com a sobrevida dos pacientes.....	91
Figura 18. Análise de enriquecimento das vias biológicas referentes aos genes alvos do miR-25-3p.....	92

Figura 19. Mecanismo de ação do ensaio da Luciferase.....	106
Figura 20. Vetor psiUx para inserção do pre-miR-20a	110
Figura 21. Vetor pmirGLO para inserção da região 3'UTR de CCL1.....	111
Figura 22. Diagrama de Venn para demonstração da distribuição do número de alvos preditos para o miR-20a-5p pelos programas DIANA microT_CDS (http://www.microrna.gr/microT-CDS), PITA (https://omictools.com/pita-tool) e Targetscan (http://www.targetscan.org/).....	119
Figura 23. Pareamento entre o miR-20a-5p e a região 3'UTR do gene CCL1.....	119
Figura 24. Amplificação do pre-miR-20a	120
Figura 25. Amplificação da região 3'UTR do gene CCL1.....	120
Figura 26. Digestão do vetor psiUx.....	121
Figura 27. Digestão do vetor pmirGLO	121
Figura 28. Digestão do plasmídeo psiUx+pre-miR-20a após transformação em bactérias competentes.....	122
Figura 29. Digestão do plasmídeo pmirGLO+CCL1 3'UTR após transformação em bactérias competentes.....	122
Figura 30. Sequenciamento de aproximadamente 900 nucleotídeos do vetor psiUx com a inserção do pre-miR-20a	123
Figura 31. Sequenciamento de aproximadamente 900 nucleotídeos do pmirGLO com CCL1 3'UTR	123
Figura 32. Superexpressão dos miRNAs (A) miR-20a-5p, (B) miR-29a-5p e (C) miR-29a-3p.....	125
Figura 33. Atividade relativa da Luciferase após (A) 24 h e (B) 48 h. Transfecção com os plasmídeos pmirGLO sem inserto ou com CCL1 3'UTR e plasmídeos com os miRNAs.....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Definição de ACLF conforme estabelecido pelo estudo CANONIC.....	38
Quadro 2. Características de um bom biomarcador.....	48
Quadro 3. Descrição dos iniciadores utilizados.....	58
Quadro 4. Iniciadores utilizados para amplificação do inserto.	112
Quadro 5. Componentes utilizados para amplificação do inserto	112
Quadro 6. Condições para PCR convencional.....	113
Quadro 7. Reagentes para digestão com as enzimas de restrição	113
Quadro 8. Reagentes para digestão com as enzimas de restrição	114
Quadro 9. Reagentes e concentrações utilizadas para ligação do inserto ao vetor.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos indivíduos controles utilizados do ensaio de microarranjo	61
Tabela 2. Características dos pacientes utilizados no ensaio de microarranjo	62
Tabela 3. miRNAs com expressão diferencial nos pacientes em relação ao grupo controle.	65
Tabela 4. miRNAs com expressão diferencial em pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF. (continua)	66
Tabela 5. miRNAs com expressão diferencial em pacientes sobreviventes em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias. (continua)	70
Tabela 6. miRNAs detectados em todas amostras de pacientes e que não apresentaram diferença significativa entre os grupos com e sem ACLF; Sobrevivente e Óbito. Média e desvio padrão dos valores de intensidade normalizados.	77
Tabela 7. Características dos pacientes e fatores associados com ACLF.	78
Tabela 8. Expressão de miRNAs relacionados com o sexo dos pacientes e com diferentes parâmetros associados com a doença hepática. (continua)	83
Tabela 9. Análise de correlação entre miRNAs e parâmetros laboratoriais relacionados com doença hepática. (continua)	87
Tabela 9. Análise de correlação entre miRNAs e parâmetros laboratoriais relacionados com doença hepática. (continuação).....	88
Tabela 10. Regressão logística múltipla para avaliação dos fatores independentemente associados à ACLF.....	89
Tabela 11. Influência de variáveis selecionadas na sobrevida dos pacientes (Regressão de Cox).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACLF** - insuficiência hepática crônica agudizada do inglês *Acute-on-Chronic Liver Failure*
- AGO** - argonauta
- ALT** - alanina aminotransferase
- AST** - aspartato aminotransferase
- CCL1** - quimiocina C-C-Motif ligante 1
- CDS** - região codificantes do RNAm
- CIBIO** - Centro Integrado para Biologia
- CLIF-SOFA** - *Chronic Liver-Failure Sequential Organ Failure Assessment*
- DP**- desvio padrão
- EASL-CLIF** - *European Association for the Study of the Liver-Chronic Liver Failure*
- EROS** - espécies reativas de oxigênio
- FC** - *Fold Change*
- FiO₂** - fração de oxigênio inspirado
- FU** - unidade de fluorescência
- GALT** - tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
- GGT** - gama glutamil transpeptidase
- HBV** - vírus da hepatite B
- HCC** - carcinoma hepatocelular
- HCV** - vírus da hepatite C
- HDA** - hemorragia digestiva alta
- HLA-DR** - complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II
- HR** - *hazard ratio*
- HSCs** - células estreladas hepáticas
- IC** - intervalo de confiança
- IL13** - interleucina 13
- IL15** - intercelucina 15
- IL17RD** - receptor D da interleucina 17
- IL4** - interleucina 4
- IL6** - interleucina 6
- IL6ST** - transdutor de sinal da interleucina 6
- IL8** - interleucina 8
- INF- γ** - interferon gama
- LPS** - lipopolissacarídeo bacteriano

luc2 - gene repórter da luciferase bioluminescente
miRNAs - microRNAs
MITF - fator de transcrição de microftalmia
mTOR - alvo mecanicista da rapamicina
NACSELD - *North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease*
NASH - esteatohepatite não alcoólica
OR - *Odds ratio*
Ori - origem da replicação
PBE - peritonite bacteriana espontânea
PCR - proteína C reativa
PCT - procalcitonina
pre-miRNA - miRNA precursor
pri-miRNAs - miRNA primário
qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa
RISC - complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAm - RNA mensageiro
RNI - razão normalizada internacional
RT-qPCR - transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase quantitativa
SEC - células endoteliais sinusoidais
SpO₂ - saturação de oxigênio
Th2 - linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF - fator de necrose tumoral
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TRAF3 - fator 3 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
VEGF - fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR - receptor do fator de crescimento vascular endotelial
 α -SMA - alfa-actina de músculo liso
3'UTR - região 3' do RNAm não traduzida
5'UTR - região 5' do RNAm não traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	24
2 OBJETIVO GERAL	28
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
2.1.1 Objetivos específicos relacionados ao Capítulo I.....	28
2.1.2 Objetivos específicos relacionados ao Capítulo II	29
3 OBJETIVO PRINCIPAL DO CAPÍTULO 1	33
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
4.1 CIRROSE.....	33
4.2 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA AGUDIZADA – ACLF 37	
4.3 miRNAs: CONCEITO E POTENCIAL COMO BIOMARCADOR 42	
4.4 PERFIL DE miRNAs CIRCULANTES ENVOLVIDOS COM DOENÇA HEPÁTICA	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	51
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	51
5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	51
5.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO. 52	
5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	53
5.5 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL POR ESPECTROFOTOMETRIA	54
5.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL POR ELETROFORESE MICROFLUÍDICA	54
5.7 DETECÇÃO DE miRNA POR MICROARRANJO	55
5.8 PCR QUANTITATIVO	56
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
6 RESULTADOS	60
6.1 AVALIAÇÃO DOS miRNAs ALTERADOS NO SORO DE PACIENTES COM ACLF DETERMINADOS PELA METODOLOGIA DE MICROARRANJO.....	60

6.1.1 Características dos controles saudáveis e dos pacientes utilizados no ensaio de microarranjo	60
6.1.2 Avaliação da qualidade do RNA total	63
6.1.3 Perfil de miRNAs no soro de pacientes com ACLF avaliados pela técnica de microarranjo	64
6.1.4 miRNAs selecionados para validação por RT-qPCR.....	72
6.1.5 Escolha dos miRNAs normalizadores endógenos para as reações de RT-qPCR.....	76
6.2 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS POR RT-qPCR	77
6.2.1 Características dos pacientes incluídos para validação dos dados por RT-qPCR	77
6.2.2 Fatores associados à ACLF	78
6.2.3 Quantificação do RNA total	80
6.2.4 Determinação da eficiência da qPCR.....	80
6.2.5 miRNA normalizador; controle de qualidade da extração e cDNA	81
6.2.6 Associação entre miRNAs estudados e variáveis de interesse	82
6.2.7 Fatores independentemente associados à ACLF	88
6.2.8 Análise de sobrevida	89
6.3 PREDIÇÃO DE ALVOS DO miR-25-3p.....	91
7 RESUMO DOS RESULTADOS.....	93
8 DISCUSSÃO.....	94
9 CONCLUSÃO	101
10 OBJETIVO PRINCIPAL DO CAPÍTULO 2.....	105
11 INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO 2	105
12 MATERIAIS E MÉTODOS	109
12.1 PREDIÇÃO DE ALVOS DO mir-20a-5p	109
12.2 CLONAGEM.....	109
12.2.1 Amplificação dos insertos pre-miR-20a e CCL1 3'UTR	111
12.2.2 Preparo dos géis de agarose	112
12.2.3 Purificação dos produtos da PCR e digestão com as enzimas de restrição	113

12.2.4	Preparação dos vetores psiUx e pmirGLO	114
12.2.5	Ligação do inserto ao vetor.....	114
12.3	TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS	115
12.4	DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO E DO PLASMÍDEO.....	116
12.5	TRANSFECCÃO.....	116
12.6	EXTRAÇÃO DO RNA E RT-qPCR PARA CONFIRMAÇÃO DA TRANSECCÃO.....	117
12.7	ENSAIO DA LUCIFERASE	117
13	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
14	CONCLUSÃO	127
15	CONCLUSÕES GERAIS	127
16	PERSPECTIVAS GERAIS	128
17	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
	ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	
	139	
	ANEXO B – Escore CLIF-SOFA, Child-Pugh e MELD	141
	Anexo C – Artigos publicados durante o período de doutorado (2014-2018).....	143
	APÊNDICE A - Soluções	148
	APÊNDICE B – Concentrações de RNA total verificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)	149
	APÊNDICE C – Eletroferogramas do equipamento Bioanalyzer das amostras utilizadas no microarranjo.....	155

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cirrose é uma doença hepática crônica progressiva caracterizada pela substituição do tecido saudável por áreas de fibrose hepática, interrupção do fluxo venoso intra-hepático, hipertensão portal e insuficiência hepática (ARROYO *et al.*, 2016). A cirrose hepática é a principal indicação para transplantes de fígado (BLACHIER *et al.* 2013). A maioria das hepatopatias crônicas são assintomáticas até que ocorra cirrose com descompensação clínica. Eventos de descompensação incluem: ascite, encefalopatia hepática e sangramento secundário a hipertensão portal. Pacientes com cirrose, com descompensação aguda e falência orgânica possuem alta taxa de mortalidade em curto prazo e são referidos por apresentarem insuficiência hepática crônica agudizada (do inglês: *acute-on-chronic liver failure*, ACLF) (JALAN e WILLIAMS, 2002). Pacientes nestas condições são altamente suscetíveis a infecções e a inflamação sistêmica. Além disso, a mortalidade em curto prazo é maior que a esperada para pacientes com cirrose descompensada (JALAN e WILLIAMS, 2002; MOREAU *et al.*, 2013). O tratamento de ACLF limita-se a evitar uma maior deterioração da função hepática, revertendo os fatores precipitantes e dando suporte aos órgãos com falência, mas é provável que uma melhor compreensão da fisiopatologia possa levar à descoberta de novos biomarcadores e estratégias terapêuticas (JALAN *et al.*, 2012).

Em vista deste panorama, é interessante a busca por biomarcadores que possam auxiliar na identificação precoce da evolução para ACLF, contribuindo assim para redução da mortalidade ocasionada por esta síndrome. Os microRNAs (miRNAs) vem sendo estudados como promissores biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento de diversas doenças (SHAH *et al.*, 2009) assim como de doenças hepáticas (CERMELLI *et al.*, 2011; SZABO e BALA, 2013).

Os miRNAs são curtas cadeias de RNA não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (BARTEL, 2004). Os miRNAs foram descobertos no início dos anos 90 primeiramente no nematódeo

Caenorhabditis elegans (LEE *et al.*, 1993), porém somente em 2001 o termo “miRNA” foi instituído (LAGOS-QUINTANA *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2001; LEE e AMBROS, 2001). Os miRNAs são expressos em diferentes tecidos e tipos de células e a expressão desregulada destes pequenos RNAs tem um impacto significativo no desenvolvimento e na manutenção das patologias (WANG *et al.*, 2016). Além disso, já foi demonstrado que os miRNAs circulam de maneira estável nos fluídos biológicos como no soro e plasma (WEBER *et al.*, 2010; WANG, K. *et al.*, 2012).

A identificação dos genes alvo dos miRNAs pode ser feita através da predição computacional de alvos (*in silico*) ou por experimentação molecular. Existem diversos programas computacionais para predição de alvos de miRNAs tais como: Targetscan, PITA, DIANA microT_CDS, entre outros. A predição *in silico* é um método simples, rápido, sem custo e que permite identificar inúmeros alvos preditos ao mesmo tempo. Porém, os métodos computacionais podem gerar um grande número de falso-positivos (DAI e ZHOU, 2010). Sendo assim, para validação de um alvo predito, métodos moleculares experimentais podem ser utilizados. Os métodos moleculares podem ser empregados mediante a superexpressão ou inibição do miRNA de interesse seguido de análise de *northern blot*, hibridização (microarranjo) ou sequenciamento de nova geração, bem como pode-se utilizar o ensaio com Luciferase bioluminescente (*Firefly luciferase*) (PEREIRA, 2015).

Por meio deste trabalho espera-se encontrar miRNAs com expressão diferenciada em pacientes ACLF para que possam contribuir com o diagnóstico e prognóstico de pacientes com esta síndrome. Além disso, pretende-se avaliar os alvos preditos de um miRNA, selecionar um gene-alvo e validar a regulação pelo ensaio da Luciferase.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro estão demonstrados os resultados obtidos na avaliação da expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes admitidos na emergência do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina por descompensação aguda da cirrose hepática. No segundo são apresentados os resultados alcançados na experimentação molecular, com o ensaio da Luciferase, para validação da regulação mediada pelo

mir-20a da quimiocina pro-inflamatória CCL1. Os resultados apresentados no segundo capítulo foram desenvolvidos durante o período de estágio de quatro meses na Universidade de Trento, na cidade de Trento, Itália sob orientação da professora Dra. Michela Alessandra Denti no âmbito dos projetos: Tecnologia de microRNA: Avaliação de diagnóstico avançado para detecção de danos hepáticos e determinação de miRNAs como biomarcadores para glioma e câncer de pulmão, CNPq Processo 23080.059130/2014-15, Brasil e *Developing a Novel Detection Platform for microRNAs Useful as Improved Biomarkers for Detection of Lung Cancer and Clinical Decision Making*, Comunidade Européia, *H2020 Program*, <https://optoi.com/en/applications/research-and-development/projects/mirna-diseasy-home-page>

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivos principais avaliar a expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes com Insuficiência Hepática Crônica Agudizada (ACLF) e selecionar possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Além de validar a regulação pos-transcricional mediada por um miRNA de um gene selecionado a partir da predição computacional.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Objetivos específicos relacionados ao Capítulo I

- a. Avaliar pela técnica de microarranjo o perfil de expressão dos miRNAs presentes no soro de pacientes;
- b. Comparar o perfil de expressão dos miRNAs presentes nos pacientes com ACLF em oposição aos sem ACLF e pacientes sobreviventes com os que foram a óbito e selecionar os principais miRNAs alterados para validação pela técnica de RT-qPCR;
- c. Detectar os miRNAs selecionados por RT-qPCR;
- d. Comparar a expressão relativa dos miRNAs com os diferentes parâmetros clínicos selecionados;
- e. Analisar o potencial diagnóstico e prognóstico dos miRNAs em pacientes ACLF;
- f. Verificar os possíveis genes alvos do principal miRNA alterado em pacientes ACLF.

2.1.2 Objetivos específicos relacionados ao Capítulo II

- a. Selecionar um miRNA e um gene alvo para o ensaio de validação de alvos de miRNAs;
- b. Clonar em plasmídeo o miRNA e a região 3'UTR do gene selecionado;
- c. Transfectar os plasmídeos na linhagem celular HeLa;
- d. Avaliar a expressão do miRNA por RT-qPCR após a transfecção;
- e. Validar a interação do miRNA - RNAm alvo pelo ensaio da Luciferase;

CAPÍTULO 1 – EXPRESSÃO DE microRNAs EM
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA
AGUDIZADA: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO

3 OBJETIVO PRINCIPAL DO CAPÍTULO 1

Investigar o perfil de expressão de miRNAs em amostras de soro de pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose e sua relação com ACLF e o prognóstico.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

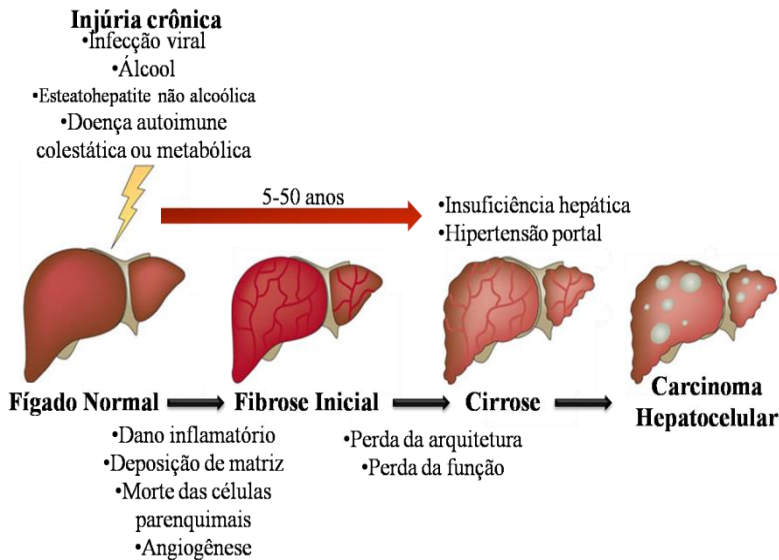
4.1 CIRROSE

O fígado é responsável por várias funções vitais, incluindo absorção, metabolismo, conjugação e excreção de várias substâncias endógenas e exógenas. O fígado também fornece uma função imunológica, pois desempenha um papel na fagocitose e eliminação de microrganismos e endotoxinas do sangue portal. Muitos fatores podem prejudicar as funções do fígado, incluindo infecções pelos vírus das hepatites, fibrose hepática, cânceres, danos por medicamentos, álcool e toxinas (HOEKSTRA *et al.*, 2013).

Cirrose consiste no resultado de vários mecanismos de lesão hepática que levam a inflamação e a fibrogênese. A cirrose é considerada o estágio final induzido por várias doenças crônicas do fígado após anos ou décadas de progressão lenta. As lesões crônicas mais comuns são as infecções virais, consumo de álcool e a esteatohepatite não alcoólica (NASH). Histologicamente a cirrose caracteriza-se por regeneração nodular difusa envolvida por septos fibrosos densos com extinção parenquimatosa e ruptura das estruturas hepáticas, causando modificações acentuadas na arquitetura vascular hepática (SCHUPPAN, D. e AFDHAL, N. H., 2008; WIEGAND e BERG, 2013). Na Figura 1 visualiza-se a história natural da doença hepática crônica até o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC). As fibras hepáticas normalmente acumulam-se lentamente, sendo que o tempo médio para evolução à cirrose na hepatite C crônica é de aproximadamente 30 anos. No entanto, uma vez estabelecida a cirrose, o potencial para ser revertida diminui e as complicações evoluem. Se a causa da fibrose for eliminada precocemente, o que pode

ser realizado com terapias antifibróticas, pode ocorrer a reversão da arquitetura hepática próximo ao normal. Na cirrose, embora a reversão não seja possível, a regressão da fibrose melhora os desfechos clínicos. Além disso, pacientes com cirrose podem desenvolver carcinoma hepatocelular que é uma das principais causas de morte relacionada ao fígado em pacientes com cirrose (PELLICORO *et al.*, 2014).

Figura 1. Estágios da doença hepática crônica



Adaptado de: PELLICORO *et al.*, 2014

A prevalência de cirrose hepática na população em geral não é muito conhecida, no entanto, um estudo publicado em 2015 relatou que a prevalência total entre 1999 e 2010, nos Estados Unidos, foi de 0,27% correspondendo a aproximadamente 600.000 adultos. Ainda, 69% relataram que não tinham consciência de terem a doença hepática (SCAGLIONE *et al.*, 2015). Cirrose é uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos e segundo o estudo de Lozano e colaboradores (2012), que avaliou a mortalidade regional e mundial de 235 causas de morte durante 20 anos, a cirrose foi responsável por aproximadamente um milhão de mortes no mundo em 2010, em média

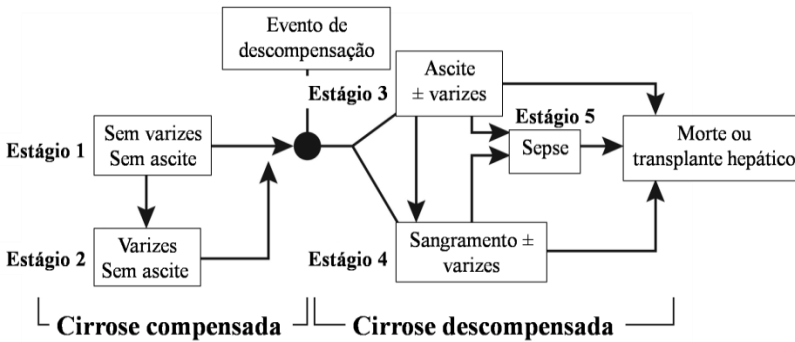
33% a mais que em 1990. As principais causas que levam a cirrose em países desenvolvidos e em desenvolvimento são o consumo abusivo de álcool e infecção pelo vírus da hepatite C (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2004), enquanto que a hepatite B é a principal infecção responsável por esta doença na maior parte da Ásia e da África Subsaariana (SCHUPPAN, DETLEF e AFDHAL, NEZAM H., 2008).

A progressão da cirrose consiste em um processo complexo que envolve células parenquimais (hepatócitos) e não-parenquimais, bem como infiltração de células do sistema imune. A ativação de células estreladas hepáticas (HSCs) quiescentes para células ativadas, produtoras de matriz extracelular, é considerada um passo essencial para estabelecer a fibrose hepática. Com o dano hepático, as HSCs são transformadas fenotipicamente, alteram a organização do citoesqueleto e morfologia, passam a ter capacidade contrátil, com expressão de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e colágeno tipo I. Ainda, as HSCs aumentam a resposta aos vasoconstritores e a proliferação além de secretarem diversas citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (DELEVE *et al.*, 2008; FRIEDMAN, 2008). As células endoteliais sinusoidais (SEC) tornam-se disfuncionais e entre outras características, começam a produzir vasoconstritores e diminuir a liberação de vasodilatadores, tais como o óxido nítrico. Este quadro clínico contribui para o aumento do tônus vascular hepático e hipertensão portal. Como uma resposta adaptativa ocorre vasodilatação esplâncnica contribuindo para o surgimento da ascite e síndrome hepatorenal (GARCIA-PAGAN *et al.*, 2012; TSOCHATZIS *et al.*, 2014).

A cirrose pode ser classificada clinicamente em compensada ou descompensada (Figura 2). A cirrose compensada compreende um período entre o início da doença até complicações maiores. Este período é geralmente longo (aproximadamente 12 anos) e na maioria dos casos os sintomas estão ausentes. No primeiro estágio do período compensado os pacientes não apresentam varizes esofágicas ou ascite, já no segundo, pode ocorrer o surgimento de varizes, mas sem presença de ascite. No entanto, as lesões hepáticas e a pressão venosa portal podem progredir de forma contínua. A fase descompensada (estágios 3, 4 e 5) é a principal causa de hospitalização dos pacientes com cirrose. Nesta fase

ocorre o desenvolvimento de uma ou mais complicações da doença hepática. No estágio 3 é comum o surgimento de ascite com ou sem varizes, no estágio 4 sangramento gastrointestinal com presença ou ausência de ascite. Por fim, no estágio mais avançado, estágio 5, os pacientes podem desenvolver sepse ao qual está relacionada com a alta taxa de mortalidade (GINES *et al.*, 1987; D'AMICO *et al.*, 2006; ARVANITI *et al.*, 2010).

Figura 2. Estágios da cirrose compensada e descompensada



Estágios 1 e 2 compreendem o período da cirrose compensada: estágio 1, sem varizes esofágicas ou ascite; estágio 2, com varizes, mas sem ascite. Cirrose descompensada compreende o estágio 3 com ascite ± varizes; estágio 4 com sangramento gastrointestinal ± ascite e estágio 5 que reflete o período mais avançado com surgimento de sepse. Neste estágio é comum a alta taxa de mortalidade dos pacientes.

Fonte: ARVANITI *et al.*, 2010.

Em alguns casos a descompensação aguda está associada com a falência orgânica (piora do quadro hepático, insuficiência renal, e/ou falência de outros órgãos). Pacientes com cirrose juntamente com descompensação aguda e falência orgânica possuem alto risco de morte em curto prazo e, nesta situação, são referidos por apresentarem insuficiência hepática crônica agudizada (ACLF –*acute-on-chronic liver failure*) (JALAN e WILLIAMS, 2002).

4.2 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA AGUDIZADA – ACLF

O estudo do consórcio *European Association for the Study of the Liver-Chronic Liver Failure* (EASL-CLIF) chamado de *CANONIC* (*EASL-CLIF Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis*) foi realizado com o intuito de criar uma melhor definição para ACLF, capaz de identificar pacientes com cirrose com alto risco de mortalidade em curto prazo (MOREAU *et al.*, 2013). Neste estudo foram incluídos 1343 pacientes com cirrose e com descompensação aguda da doença (ascite, encefalopatia hepática, hemorragia gastrointestinal, infecção bacteriana, ou alguma combinação dessas complicações). Foram utilizados dados da falência orgânica e taxa de mortalidade para definir os graus de ACLF. A falência de órgãos foi estabelecida com base nos critérios de *Chronic Liver-Failure Sequential Organ Failure Assessment* (CLIF-SOFA) (ANEXO B). O escore CLIF-SOFA varia de 0 a 4 para cada um dos seis componentes (fígado - bilirrubina; rins - creatinina; cérebro - grau de encefalopatia; coagulação - razão normalizada internacional; circulação - média de pressão arterial e pulmões - relação entre a saturação de oxigênio (SpO₂) e a fração de oxigênio inspirado (FiO₂)) sendo que os maiores escores indicam disfunção orgânica mais severa. Além disso, os escores agregados variam de 0 a 24 e fornecem informações sobre a gravidade de um modo geral do paciente. Assim, os graus de ACLF foram definidos conforme demonstrado no Quadro 1.

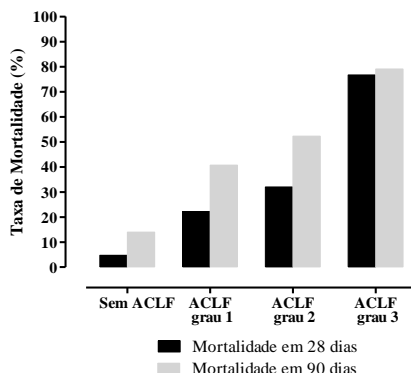
Quadro 1. Definição de ACLF conforme estabelecido pelo estudo CANONIC

Grau	Definição
Sem ACLF	<ol style="list-style-type: none"> 1. pacientes sem falência orgânica 2. pacientes com uma única falência orgânica, que não seja renal, com creatinina sérica < 1,5 mg/dL e ausência de encefalopatia hepática 3. pacientes somente com encefalopatia hepática com creatinina sérica de < 1,5 mg/dL.
ACLF grau 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. pacientes somente com falência renal 2. pacientes somente com falência hepática, de coagulação, circulatória ou respiratória, com creatinina sérica variando de 1,5 a 1,9 mg/dL e/ou encefalopatia hepática leve a moderada 3. pacientes somente com encefalopatia hepática com creatinina sérica variando de 1,5 a 1,9 mg/dL.
ACLF grau 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. pacientes com 2 falências orgânicas
ACLF grau 3	<ol style="list-style-type: none"> 1. pacientes com 3 ou mais falências orgânicas

Fonte: MOREAU *et al.* (2013)

ACLF é uma síndrome muito relevante, frequente, sendo uma importante causa de morte em pacientes com cirrose. Está associada com alta taxa de mortalidade em curto prazo e a mortalidade está relacionada com as falências orgânicas nos pacientes. Na Figura 3 estão apresentados dados retirados do estudo *CANONIC*, em que se pode observar que a taxa de mortalidade em 28 e 90 dias em pacientes sem ACLF foi de 4,7% e 14%, respectivamente, enquanto que a taxa em pacientes com ACLF grau 3 foi de aproximadamente 80%.

Figura 3. Taxa de mortalidade de pacientes com e sem ACLF (28 e 90 dias)



Fonte: Adaptado de MOREAU *et al.* (2013)

Conforme os dados do mesmo estudo *CANONIC*, as causas mais comuns de cirrose foram alcoolismo e hepatite C. Foi também observado maior prevalência de fatores precipitantes, como o alcoolismo ativo e infecção bacteriana severa, além do aumento da resposta inflamatória sistêmica. A maior prevalência de infecção bacteriana no grupo ACLF estava relacionada à peritonite bacteriana espontânea (PBE) e à pneumonia; além disso, sepse e choque séptico foram mais frequentes em pacientes com ACLF.

As infecções bacterianas em pacientes com cirrose são muito comuns, sendo as principais causas da alta taxa de mortalidade associada à doença. A disfunção hepática leva a várias anormalidades dos mecanismos de defesa, uma vez que a imunidade inata e a adaptativa tornam-se ineficientes aumentando a susceptibilidade a agentes infecciosos. Um estudo mostrou que pacientes com ACLF apresentam níveis de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-8 e IL-6 aumentadas quando comparados com pacientes com cirrose estável ($p < 0,01$) e com pacientes com descompensação aguda sem ACLF ($p < 0,05$) (MEHTA *et al.*, 2015). No estudo de Fischer e colaboradores (2017) foi demonstrado aumento das citocinas IL-6, IL-10 e IL-17A nos pacientes ACLF com infecção em relação aos pacientes somente com infecção ($p < 0,001$; $p = 0,009$; $p = 0,040$, respectivamente) e nos indivíduos sem ACLF e infecção ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,025$, respectivamente).

Outro estudo, publicado recentemente, avaliou alterações de citocinas em pacientes ACLF e a relação com o prognóstico dos pacientes. As citocinas VCAM-1 ($p < 0,0001$), VEGF-A ($p = 0,001$), Fractalkina ($p = 0,001$), MIP-1 α ($p = 0,002$), eotaxina (quimiocina CC, quimiotática eosinofílica) ($p = 0,004$) e IP-10 ($p = 0,001$) estavam significativamente aumentadas em pacientes ACLF. Já as citocinas ICAM-1 (0,087) e MCP-1 (0,086) apresentaram uma tendência a aumento. Além disso, o aumento de VCAM-1 ($p = 0,001$), ICAM-1 ($p = 0,001$), MIP-1 α ($p = 0,028$) e IP-10 ($p = 0,040$) e a diminuição de GM-CSF ($p = 0,013$) foram relacionados com um prognóstico ruim dos pacientes (SOLE *et al.*, 2016).

Outra complicação frequentemente relacionada aos pacientes com cirrose é a peritonite bacteriana espontânea (PBE), a qual consiste em infecções causadas usualmente por bactérias de origem intestinal (JALAN *et al.*, 2014). No estudo CANONIC, já mencionado anteriormente, e no trabalho de Silva, *et al.* (2015) a PBE foi verificada como a infecção bacteriana mais comum nos pacientes ACLF. Os principais fatores que contribuem para a migração bacteriana através do intestino são: crescimento bacteriano aumentado, aumento da permeabilidade intestinal e sistema imune comprometido. Na evolução da cirrose ocorre aumento constante da translocação de bactérias e produtos bacterianos (lipopolissacarídeos-LPS e endotoxinas) que favorecem o aumento de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), no espaço GALT (tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal) com o intuito de melhorar a defesa antibacteriana. Porém, na fase descompensada da doença, as junções de oclusões do epitélio intestinal afrouxam, o crescimento bacteriano do intestino acelera e a permeabilidade intestinal aumenta progressivamente contribuindo para passagem de microrganismos através da barreira e consequentemente para o desenvolvimento de inflamação sistêmica e falência múltipla de órgãos (JALAN *et al.*, 2014; WIEST *et al.*, 2014).

Como comentado anteriormente, a falência orgânica é uma das características de pacientes com ACLF e conforme o número de órgãos em falência, incluindo a hepática, renal, cerebral, circulatória e

pulmonar, pior é o prognóstico do paciente. Pacientes com cirrose e insuficiência renal possuem risco sete vezes maior de ir a óbito, no período de um ano, em relação àqueles sem insuficiência renal (FEDE *et al.*, 2012). De acordo com o estudo de Martín–Llahí e colaboradores (2011) as causas mais frequentes de falência renal em pacientes com cirrose foram infecções bacterianas (46%) seguida de hipovolemia (32%), síndrome hepatorenal (13%) e nefropatia parenquimal (9%). As infecções bacterianas mais frequentes em pacientes com falência renal foram às denominadas infecções “espontâneas”, ou seja, infecções causadas pela passagem espontânea de bactérias principalmente do trato gastrointestinal para a circulação sistêmica, incluindo peritonite bacteriana, bacteremia, infecções respiratórias e urinárias (MARTÍN–LLAHÍ *et al.*, 2011). Outra complicação frequente em pacientes com ACLF é a encefalopatia hepática, sendo que os principais sintomas variam de sonolência leve, confusão mental, agitação até o coma. O exato mecanismo fisiopatológico nestes pacientes não está bem esclarecido, mas relaciona-se com hiperamonemia, inflamação sistêmica (translocação bacteriana, sepse) e estresse oxidativo (ROMERO-GOMEZ *et al.*, 2015). Pacientes ACLF também demonstram importantes alterações hemodinâmicas, incluindo diminuição da pressão arterial média e resistência vascular periférica além de um aumento significativo da pressão venosa portal. Ademais, as alterações hemodinâmicas são associadas com alta taxa de mortalidade e sangramento varicoso (GARG *et al.*, 2013).

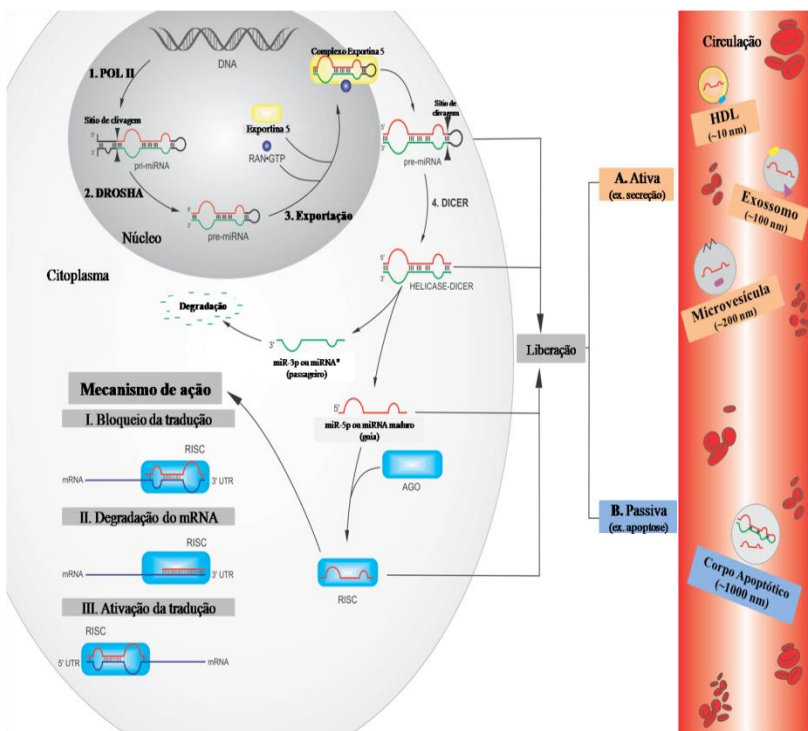
O controle das infecções bacterianas, a prevenção e a detecção precoce da falência de algum órgão podem auxiliar na recuperação dos pacientes e prevenir a ocorrência de ACLF (SARIN e CHOUDHURY, 2016). Sendo assim, a busca por novos biomarcadores que possam auxiliar na identificação da evolução para ACLF, contribuir com o diagnóstico e prognóstico seria de grande valor para o auxílio na tomada de decisões clínicas. Neste contexto, os miRNAs vem sendo estudados como potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de inúmeras doenças pois são encontrados alterados em diversas situações clínicas (SHAH *et al.*, 2009; CERMELLI *et al.*, 2011).

4.3 miRNAs: CONCEITO E POTENCIAL COMO BIOMARCADOR

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, endógenos, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica por meio da ligação, principalmente, na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (RNAm) (LEE e AMBROS, 2001; BARTEL, 2004).

Os miRNAs são formados a partir de precursores denominados miRNAs primários (pri-miRNA), geralmente transcritos pela RNA polimerase II, e possuem uma extremidade 7 metilguanossina (CAP) na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3'. O pri-miRNA é processado ainda no núcleo pela DROSHA, uma enzima RNase III, formando um segmento de aproximadamente 70 nucleotídeos caracterizado por conter regiões pareadas com alguns nucleotídeos não pareados (*hairpin*) denominado precursor do miRNA (pre-miRNA). Proteínas relacionadas com o transporte nuclear como a exportina-5 e a RAN de ligação a GTP (RAN-GTP) transportam o pre-miRNA para o citoplasma. Em seguida, a região não pareada é removida pela enzima DICER, formando um *duplex* de miRNA com aproximadamente 22 pares de nucleotídeos que se associam com a proteína Argonauta (AGO). Este produto é incorporado a um complexo denominado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que inclui as proteínas AGO como principais componentes. A fita passageira pode ser degradada e a outra permanecer no complexo RISC. Esta fita, também chamada de fita madura, pode ligar-se a região 3' UTR de um RNAm complementar e inibir a tradução da mesma, por homologia incompleta, ou degradar o RNAm por homologia completa. Ainda, o miRNA maduro pode ligar-se a região 5'UTR e favorecer a tradução de proteínas (revisado por BARTEL (2004) e KIM (2005)). Os miRNAs podem ser liberados na circulação passivamente, como subprodutos de células mortas, ou ativamente, por meio da interação com proteínas (AGO II), lipídeos (lipoproteínas de alta densidade - HDL), microvesículas ou exossomos (CREEMERS *et al.*, 2012). Na Figura 4 apresenta-se esquematicamente a biogênese dos miRNAs.

Figura 4. Biogênese dos miRNAs



Adaptado de: DO AMARAL (2018)

Os genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II para produzir os transcritos primários (pri-miRNAs) que em seguida são clivados para formação do pre-miRNA. Após o transporte do núcleo para o citoplasma, os pre-miRNAs são processados formando um *duplex* miRNA/miRNA. Após, o *duplex* é separado e o miRNA maduro é incorporado em um complexo de proteína denominado RISC. O RISC carregado com miRNA medeia o silenciamento de genes via clivagem e degradação de RNAm, bloqueio da tradução ou ativação da tradução dependendo da complementaridade entre o miRNA e o RNAm alvo e o local de interação.

A miRBase (<http://www.mirbase.org/>) é o principal repositório e base de dados de miRNAs. É o banco de dados mais completo, pois armazena e disponibiliza livremente informações de miRNAs de inúmeras espécies (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2008). De acordo com a última versão da miRBase, publicada em 2018 (versão 22), foram

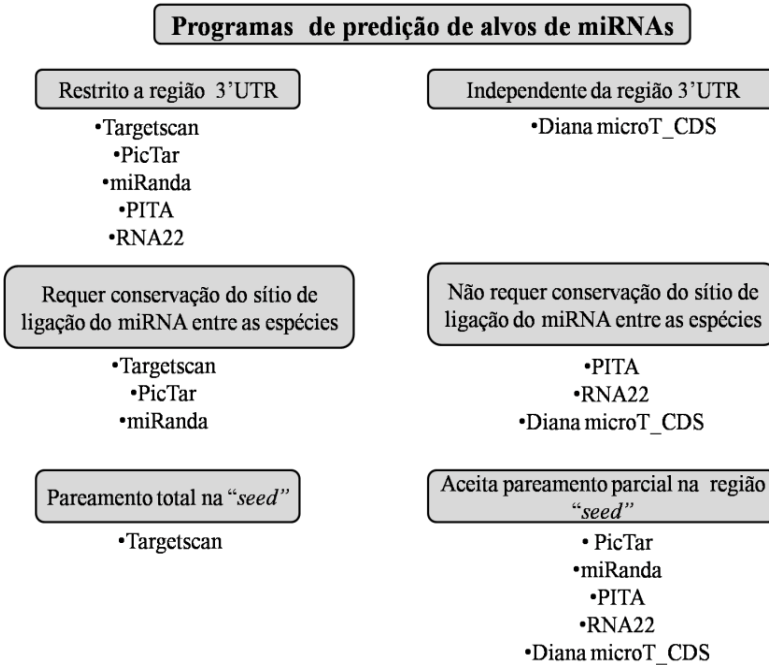
descritos 2.654 miRNAs maduros do genoma humano, sendo que os genes dos miRNAs podem ser encontrados isolados ou agrupados em regiões intergênicas ou em íntrons e éxons de genes codificantes. Os miRNAs maduros são nomeados com a letra “R” em maiúsculo, miR, seguido de um hífen e um número de identificação (exemplo: miR-25). Quando genes de miRNAs expressam sequências maduras não-idênticas mas muito parecidas usa-se o mesmo número e adiciona-se uma letra minúscula (por exemplo: miR-451a). Além disso, um prefixo de 3 ou 4 letras é adicionado indicando o nome da espécie como, “hsa” para *Homo sapiens* (por exemplo: hsa-miR-22) ou “cel” para *Caenorhabditis elegans* (por exemplo: cel-miR-238). A numeração dos miRNAs segue uma ordem sequencial e os sufixos -5p e -3p indicam a extremidade do pre-miRNA da qual se origina o miRNA maduro (por exemplo: hsa-miR-130a-3p originado da porção 3’ do braço precursor) (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006).

Como mencionado, os miRNAs regulam a expressão gênica por meio da ligação do miRNA ao RNAm. A região onde a ligação ocorre é chamada de *seed*, a qual abrange o pareamento de 7 nucleotídeos (nt) na extremidade 5’ do miRNA, sendo o pareamento perfeito na maioria dos casos. Esta região de um miRNA é altamente conservada tornando possível classificar os miRNAs dentro de famílias e espécies. As interações podem ser nomeadas como 7merA1 (hibridização na *seed* do sétimo ao segundo nucleotídeo e inclui uma adenina na posição 1), 8mer (hibridização na *seed* do oitavo até o segundo nucleotídeo e uma adenina na posição 1) e 7mer-m8 (hibridização na *seed* a partir do oitavo nucleotídeo até o segundo). Pareamento de 6 nt também podem ocorrer na região *seed*, mas nestes casos a funcionalidade pode ser limitada. Ainda, pelo menos 3-4 nucleotídeos consecutivamente emparelhados nas posições 13-16 do miRNA são normalmente necessários para aumentar a eficácia da interação miRNA-RNAm (WITKOS *et al.*, 2011; RIFFO-CAMPOS *et al.*, 2016). As variações nas formas de como o miRNA interage com a região alvo resulta em uma ampla variedade de genes em que os miRNAs podem atuar.

Para compreender a função dos miRNAs é importante identificar os respectivos genes-alvo. A identificação pode ser feita de

duas maneiras: predição computacional de alvos ou experimentação molecular. Exemplos de ensaios de experimentação molecular para identificação de alvos de miRNAs serão abordados no Capítulo II deste trabalho. Já a predição computacional é um método rápido e simples para verificação dos alvos dos miRNAs. Porém, os métodos *in silico* podem gerar um grande número de falso-positivos em função dos diferentes modos de ação dos miRNAs (inibição da tradução, clivagem do RNAm, pareamento fora ou dentro da região *seed*, entre outros). Existem diversos programas para predição de alvos tais como: Targetscan (www.targetscan.org), PicTar (pictar.mdc-berlin.de), miRanda (www.microrna.org), PITA (https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html), RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Precomputed/>), Diana-microT_CDS (www.microrna.gr/microT-CDS) (PEREIRA, 2015 e WATANABE, *et al.* 2007). Na Figura 5 verifica-se as características dos programas citados acima. Particularmente, o programa Targetscan requer pareamento perfeito na região *seed* entre o miRNA e a região 3'UTR do alvo predito, já os outros programas aceitam pareamento parcial nesta região. Os programas PITA, RNA22 e Diana microT_CDS não analisam a conservação em outras espécies das interações miRNA-RNAm. E o programa Diana não se restringe ao pareamento na região 3'UTR, a análise é também estendida para regiões codificantes de proteínas (CDS). Pois, conforme observado por Reczko e colaboradores (2012) o miRNA pode ter preferência por regiões CDS quando a região 3'UTR é mais curta (<500 nt), sugerindo que a seleção evolutiva pode favorecer locais adicionais em CDS em casos de espaço restrito na 3'UTR.

Figura 5. Características dos principais programas para predição de alvos de miRNAs



Adaptado de: Pereira (2015)

Os miRNAs desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos como na proliferação, crescimento e organização celular, bem como na transcrição, transdução de sinal e no ciclo celular (SHAH *et al.*, 2009) o que caracteriza a importância da desregulação dos miRNAs no desenvolvimento de inúmeras doenças. Neste contexto, alguns estudos vêm demonstrando o uso de miRNAs na terapêutica baseada na inibição ou reposição de miRNAs. Em relação à inibição, exemplifica-se com o medicamento Miravirsen, desenvolvido pela empresa Santaris Pharma (Hørsholm, Dinamarca). Esta terapia baseia-se na inibição do miR-122 em células hepáticas. O miR-122 é altamente expresso em células do fígado, sendo essencial para estabilidade e replicação do vírus da hepatite C (HCV). Neste sentido, já foi mostrado

que o tratamento com Miravirsen resultou em redução, dose-dependente, da concentração de RNA de HCV. Os pacientes receberam durante 5 semanas injeções subcutâneas de Miravirsen de 3, 5 e 7 mg/kg ou placebo e as doses aplicadas reduziram a carga viral do grupo tratado em relação ao grupo placebo. Ainda, foi observado que durante as 14 semanas de acompanhamento após o tratamento, o RNA de HCV não foi detectado em um indivíduo do grupo de 5 mg e em quatro indivíduos do grupo de 7 mg. Além disso, não foram observados efeitos adversos e mutações no sítio de ligação do miR-122 nos grupos tratados (JANSSEN *et al.*, 2013). Em relação aos estudos baseados na reposição de miRNAs (miRNAs *mimic*), foi observado que pacientes com câncer de pulmão apresentavam baixa expressão do miR-34a, sendo assim, pesquisadores resolveram tratar camundongos com câncer de pulmão com este miRNA. Após o tratamento, foi observado que o tamanho do tumor foi reduzido em 60%, além do aumento da morte celular por apoptose e redução da proliferação das células tumorais (Trang *et al.* 2011). A empresa Mirna Therapeutics (Cambridge, MA, EUA) desenvolveu o primeiro teste clínico e nomeou o miR34a como MRX34 (miR-34a encapsulado em nanopartículas lipossomais). O estudo de fase I foi publicado em 2017 e mostrou atividade antitumoral significativa em pacientes adultos com vários tipos de tumores sólidos incluindo carcinoma hepatocelular (HCC, n=14) (BEG *et al.*, 2017).

Os miRNAs já foram detectados em diferentes fluidos biológicos tais como: plasma, soro, lágrima, leite materno, líquido cefalorraquidiano, saliva, urina entre outros. A quantidade de RNA total entre os fluidos é diferente, bem como, a composição de miRNAs (WEBER *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que os miRNAs circulam de maneira estável nos fluidos biológicos e são resistentes a RNases (enzimas que catalisam a degradação de RNA) (CHEN *et al.*, 2008). A hipótese para esta estabilidade é a agregação dos miRNAs circulantes a proteínas, corpos apoptóticos, lipoproteínas de alta densidade (HDL), exossomos e outras vesículas (SOHEL, 2016). Koberle e colaboradores (2013) comprovaram que miRNAs extraídos do soro associados a vesículas são mais estáveis e resistentes a degradação pelas RNases do que miRNAs livres. Grasedieck *et al.*

(2012) mostraram que miRNAs em soro são estáveis por aproximadamente 6 anos quando estocados a -20 e -80 °C.

É consenso que um biomarcador ideal deve ser de preferência oriundo de amostras coletadas de forma não invasiva ou de fácil acesso, de baixo custo para quantificação, específico e sensível para doença de interesse e possível de identificar a doença precocemente, antes que os sintomas apareçam (WEBER *et al.*, 2010; ETHERIDGE *et al.*, 2011). A seguir apresentam-se os quesitos de um biomarcador considerado ideal (Quadro 2).

Quadro 2. Características de um bom biomarcador

Sensível
Detecção rápida e sensível sobre o desenvolvimento da patologia
Específico
Específico para órgão ou tecido doente Capaz de diferenciar patologias
Robusto
Detecção rápida, simples, precisa e de baixo custo Sem interferência do ambiente ou condições não relacionadas à doença
Preditivo
Meia-vida longa na amostra Proporcional ao grau de gravidade da patologia
Não invasivo
Presente em amostra de fluido de fácil acesso

Fonte: ETHERIDGE *et al.* (2011).

Os miRNAs são potenciais candidatos como biomarcadores pois, podem ser detectados em fluidos de fácil acesso como soro e plasma, podem ser identificados por métodos relativamente simples como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) com sensibilidade alta, são estáveis nos fluidos biológicos e a expressão pode estar diferenciada dependendo do estado clínico dos indivíduos. Além disso, novas metodologias de fácil detecção de miRNAs vem sendo desenvolvidas, incluindo sensores eletroquímicos (CARDOSO *et al.*, 2016).

4.4 PERFIL DE miRNAS CIRCULANTES ENVOLVIDOS COM DOENÇA HEPÁTICA

Estudos demonstram diferentes miRNAs alterados em pacientes com problemas hepáticos. No estudo de Roderburg e colaboradores (2012) foi verificado que a expressão dos miRNAs miR-513-3p e miR-571 encontravam-se aumentadas, enquanto que a expressão do miR-652 encontrava-se diminuída no soro de pacientes com cirrose hepática induzida por álcool e hepatite C. Além disso, a área sob a curva ROC dos miRNAs foi de 0.87, 0.91 e 0.75 respectivamente e a curva ROC para combinação dos miRNAs miR-571 e miR-652 foi de 0.96, confirmando a sensibilidade e especificidade diagnóstica. Neste estudo, também foi possível observar uma diminuição da expressão do miRNA-652 após a estimulação de monócitos (linhagem celular U937) com LPS, enquanto que a expressão do miR-571 manteve-se inalterada. Pode-se sugerir que o miR-652 faz parte de uma rede de sinalização inflamatória que acompanha os processos fisiopatológicos durante a cirrose hepática. Outro estudo verificou que a concentração do miR-122 no soro estava reduzida em pacientes com cirrose hepática descompensada em relação aos pacientes com cirrose compensada. Ou seja, a expressão do miR-122 encontrava-se diminuída nos pacientes com ascite, peritonite bacteriana espontânea e síndrome hepatorenal. Além disso, foi demonstrado significativa associação entre o miR-122 e sobrevida geral, de modo que pacientes com expressão de miR-122 diminuída mostraram menor tempo de sobrevida (WAIMANN *et al.*, 2012).

No estudo de Zheng e colaboradores (2016), 62 miRNAs estavam alterados no tecido hepático de um paciente com ACLF infectado pelo vírus da hepatite B (ACLF-HBV) em comparação com uma amostra de tecido hepático saudável (controle). Entre os 62 miRNAs, 9 foram validados por qPCR em 39 amostras de soro de pacientes com ACLF-HBV. Os resultados mostraram que os miRNAs miR-21, miR-486-5p, miR-130a, miR-192, miR-148a, miR-143, miR-200a e o miR-122 estavam com expressão aumentada. No entanto, pôde-se perceber que o miR-130a estava diminuído no soro dos pacientes não recuperados em

relação aos recuperados com sensibilidade e especificidade de 64,30% e 78,90%, respectivamente. Sendo assim, foi sugerido que o miR-130a poderia servir como um biomarcador de prognóstico dos pacientes com ACLF-HBV. Por outro lado, Chen e colaboradores (2014) detectaram diferentes miRNAs expressos em células mononucleares do sangue periférico de pacientes ACLF-HBV em relação a pacientes com o vírus da hepatite B (HBV) assintomáticos. Com a análise por qPCR, foi observado que os miRNAs miR-let-7a e o miR-16 estavam significativamente aumentados nos casos de ACLF-HBV. Por fim, foi concluído que os miRNAs mencionados podem contribuir com o desenvolvimento da doença e auxiliar no entendimento desta doença. Outro estudo também avaliou a expressão de miRNAs em células mononucleares do sangue periférico de pacientes ACLF-HBV. Estes pacientes apresentaram expressão aumentada dos miRNAs miR-21-5p, miR-34c-5p, miR-143-3p, miR-143-5p, miR-374a-3p e do miR-542-3p em relação ao grupo e grupo com HBV. O miR-21-5p foi o mais abundante nas células mononucleares de pacientes com ACLF-HBV (DING *et al.*, 2015) e já foi associado com resposta inflamatória e diminuição da apoptose (RUAN *et al.*, 2014).

Não foram encontrados na literatura estudos mostrando o perfil de miRNAs em pacientes com ACLF (características descritas no estudo *CANONIC*). Como demonstrado, os artigos publicados até o momento identificaram miRNAs em um grupo mais específico, doentes com ACLF-HBV. Diante do exposto, vislumbra-se a importância da busca por biomarcadores para pacientes ACLF. A identificação de biomarcadores, tais como os miRNAs, poderá contribuir com um diagnóstico precoce da doença além de auxiliar na identificação do estado clínico, prevenir futuras complicações e contribuir na escolha de uma abordagem terapêutica eficaz e precoce.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo sistema Plataforma Brasil e encontra-se registrado sob o parecer n. 948.198. Os pesquisadores garantem que todas as informações das amostras coletadas serão mantidas em sigilo de acordo com as normas legais. Todos os indivíduos que aceitaram participar de forma voluntária deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A).

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população deste estudo foi composta por 139 pacientes admitidos na Emergência do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), no período de janeiro de 2013 a novembro de 2015, devido à descompensação aguda da cirrose hepática. Os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes foram os seguintes:

- **Critérios de inclusão:** Pacientes admitidos na emergência devido a descompensação aguda de cirrose hepática, definida como desenvolvimento agudo de encefalopatia hepática, ascite, sangramento gastrointestinal, infecção bacteriana ou a combinação destes.
- **Critérios de exclusão:** Pacientes nas seguintes situações - hospitalização para procedimentos eletivos, internações não relacionadas com complicações da cirrose hepática, carcinoma hepatocelular fora dos critérios de Milão (pacientes com cirrose com nódulo único de até 5 cm, ou até 3 nódulos, sendo o maior de até 3 cm, sem invasão macrovascular ou metástases detectáveis) e diagnóstico duvidoso de cirrose.

O diagnóstico de cirrose hepática foi estabelecido por histologia, quando disponível, ou pela associação de achados de exames de imagem, laboratoriais e clínicos. A falência de órgãos foi estabelecida com base nos critérios de CLIF-SOFA e a severidade da doença hepática foi estimada pelo sistema de classificação Child-Pugh e MELD (Modelo para doença hepática terminal) calculados com base nos testes laboratoriais realizados na admissão (ANEXO B). A definição de ACLF foi baseada na definição do consócio EASL-CLIF (MOREAU *et al.*, 2013)

Neste trabalho, para a etapa de avaliação do perfil de miRNAs nos pacientes pela técnica de microarranjo foram utilizadas 9 amostras de indivíduos controles selecionados na área de coleta do HU-UFSC, que aguardavam para coleta de sangue para exames de rotina. A coleta foi realizada em agosto de 2014 e os seguintes critérios de exclusão foram considerados: uso de antimicrobianos ou diagnóstico de infecções nos últimos sete dias; antecedentes de doenças hepáticas; etilismo significativo nas quatro semanas anteriores à coleta de dados (252 g de álcool absoluto ou mais/semana para homens e 168 g/semana para as mulheres); diabetes mellitus; uso de imunossupressores ou pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; neoplasias malignas; doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas.

5.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO

A coleta das amostras foi realizada no HU-UFSC sob responsabilidade do Dr. Leonardo de Lucca Schiavon membro do Departamento de Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. O sangue foi coletado em tubo com ativador de coágulo e gel separador (BD Vacutainer® SST® II Advance®) e em seguida, foi centrifugado a 820 ×g por 10 min para obtenção do soro. As amostras de soro foram transferidas para microtubos e armazenadas a -80°C. Para os experimentos, o soro foi

descongelado e centrifugado a 16000 \times g por 10 min a 4°C. Esta etapa permitiu a remoção de células e crioprecipitados. Amostras visivelmente hemolisadas (soro com coloração avermelhada) não foram utilizadas neste estudo.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do kit *mirVana™ PARIS™ RNA* (AM1556, Ambion; Life Technologies, Austin, TX, EUA). A extração foi iniciada a partir da adição de 500 μ L de uma solução desnaturante em 500 μ L de soro, seguido de agitação vigorosa e incubação em gelo por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 25 fmol do miRNA sintético cel-miR-238, o qual foi utilizado como controle de qualidade da extração de RNA e da reação de transcrição reversa (RT). Em seguida foram adicionados 1000 μ L de Ácido-fenol: Clorofórmio para separação da fase orgânica e aquosa. As amostras foram agitadas em vortex por 1 min e centrifugadas a 12000 \times g por 5 min. Após esta etapa, 500 μ L de RNA, que se encontra na fase superior aquosa, foram transferidos para um novo microtubo. Subsequentemente foram adicionados 625 μ L de etanol absoluto (Merck, Massachusetts, EUA) para precipitação dos ácidos nucleicos. Esta mistura, etanol e RNA, foi adicionada em uma coluna com filtro de sílica, fornecida pelo kit, que retém o RNA total enquanto que o material filtrado é descartado. Na sequência, foram realizadas as etapas de lavagem conforme descrito a seguir: inicialmente foram adicionados 700 μ L da solução *Wash1* (fornecida pelo kit) e então as amostras foram centrifugadas por 1 min a 9000 \times g. O filtrado foi desprezado e na mesma coluna de purificação foram realizadas duas lavagens de 500 μ L da solução *Wash 2/3* (também fornecida pelo kit) e novamente centrifugado por 1 min a 9000 \times g. Após a remoção do filtrado, uma centrifugação adicional de 1 min a 9000 \times g foi efetuada para eliminação de soluções de lavagem residuais nos filtros. Os filtros foram transferidos para novos microtubos e 60 μ L de água livre de RNase, pré-aquecida em termobloco (Biocycler) à 95 °C, foram adicionados no centro do filtro. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente os

filtros com as amostras foram novamente submetidos a centrifugação por 1 min a 9000 ×g com a finalidade de obter o RNA total eluído com a água livre de RNase (preparo da água livre de RNase no APÊNDICE A). Por fim, o RNA total obtido foi armazenado em *freezer* -80°C até utilização.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL POR ESPECTROFOTOMETRIA

O espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) foi utilizado para avaliar a quantidade de RNA total. A leitura do RNA foi realizada nos comprimentos de onda 230, 260, 280 e 320 nm utilizando 2µL de amostra. Para a quantificação de RNA foi considerado que a absorbância de 1 unidade em 260 nm corresponde a 40 µg de RNA/mL. Além disso, a absorbância (Abs) A260 foi subtraída da A320 para correção do *background*. Resumidamente, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Concentração de RNA (ng/}\mu\text{L)} = (\text{Abs260} - \text{Abs320}) \times 40$$

5.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA TOTAL POR ELETROFORESE MICROFLUÍDICA

A avaliação da qualidade de RNA total foi realizada conforme as instruções do fabricante do *kit Agilent RNA 6000 Pico* (5067-1513, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) no equipamento 2100 Bioanalyzer (G2947CA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Para realização deste ensaio, primeiramente iniciou-se a preparação do gel RNA 6000 Pico gel matrix, em que foram adicionados 550 µL do gel em uma coluna com filtro acoplado a um microtubo, fornecido pelo próprio kit, e centrifugado a 1500 ×g por 10 min. O gel (65 µL) foi aliqüotado em microtubos de 0,5 mL e estocados a 4°C até o momento de uso. Em uma alíquota de 65 µL do gel filtrado foi adicionado 1 µL de *RNA 6000 Pico dye*, o gel/*dye* foi homogeneizado em vortex e centrifugado a 13000 ×g por 10 min. Em seguida, o *chip RNA 6000*

Pico foi colocado no *priming station* e foram adicionados 9 μL da mistura *gel/dye* na região G indicada no *chip* e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* o gel foi distribuído por todo o *chip*. Após, foram adicionados a solução condicionante, o marcador e as amostras. Logo em seguida, o *chip* foi agitado em vortex IKA MS3 a 2200 rpm por 1 min e colocado no Bioanalyzer para leitura. Para obtenção dos resultados foi utilizado o *Software Agilent 2100 Expert*.

5.7 DETECÇÃO DE miRNA POR MICROARRANJO

Para a avaliação do perfil de miRNAs nas amostras de soro dos pacientes foram utilizadas lâminas de microarranjo, *G3 Human miRNA Microarray, Release 21* (G4870C, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) contendo oito regiões com 2549 sequências de miRNAs humanos e 21 controles internos. Vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados conforme instruções do fabricante. Primeiramente, 35 μL de RNA foi concentrado em SpeedVac™ Concentrator Savant (SPD1010, Thermo Fisher Scientific) à temperatura ambiente e pressão a vácuo de aproximadamente de 10 Torr. Após esta etapa, foram adicionados 2 μL de água livre de RNase em cada amostra de RNA concentrado. Em seguida, foi realizada a etapa de desfosforilação (remoção do grupo fosfato), e para isso, foram adicionados sobre a amostra 2 μL do Mix contendo 0,4 μL de tampão, 1,1 μL *Spike-In* de marcação (1:10000) e 0,5 μL da enzima fosfatase. A mistura foi incubada em termobloco (Biocycler) a 37°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram desnaturadas com adição de 2,8 μL de DMSO, incubadas a 100°C por 7 min e após, mantidas em banho de água e gelo. Na próxima etapa, foi preparado o *Mix* para ligação da Cianina, contendo os seguintes reagentes por amostra: 1 μL do tampão; 3 μL de Cianina-3 e 0,5 μL da enzima *T4 RNA Ligase*. O *Mix* (4,5 μL) foi adicionado sobre as amostras e logo em seguida, foram incubadas a 16°C por 2 h. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram completamente secas em SpeedVac™ Concentrator com aquecimento de 50°C, por 3 h e pressão de aproximadamente 10 Torr. As amostras completamente secas, sem resíduos de DMSO, foram armazenadas à -80°C.

No dia seguinte, as amostras foram solubilizadas em 17 μL de água livre de RNase. Assim, sobre os 17 μL de amostras, foram pipetados: 1 μL do *Spike-In* de hibridização (1:10000), 4,5 μL do agente de bloqueio e 22,5 μL de tampão. As amostras foram misturadas gentilmente, incubadas a 100°C por 5 min e imediatamente transferidas para banho de água e gelo por 5 min. A câmara de hibridização contendo uma lâmina para aplicação de amostra foi montada e foram pipetados 45 μL de amostra sobre essa lâmina. A lâmina da Agilent, contendo os miRNAs impressos, foi colocada em contato com a amostra e em seguida foram levadas a um forno de hibridização com temperatura a 55°C, rotação de 20 rpm, por 20 h.

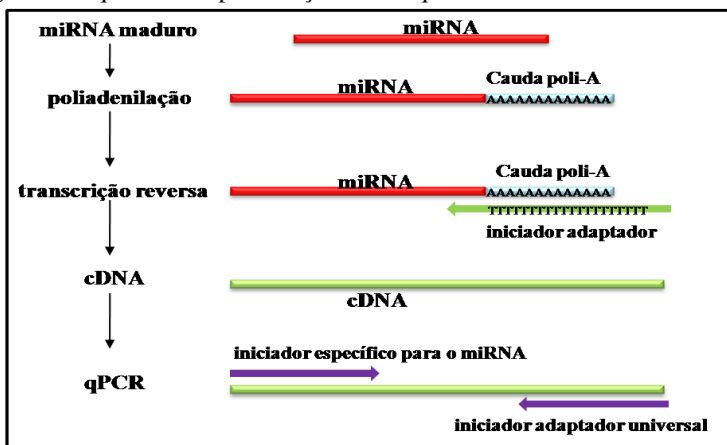
Transcorrida a etapa de hibridização, a lâmina de aplicação e a lâmina contendo os miRNAs foram imersas em um tampão (*GE Wash Buffer 1*), à temperatura ambiente, para a liberação da lâmina com os miRNAs em meio líquido. Em seguida, a lâmina foi submetida a duas lavagens sob agitação, a saber: primeira lavagem com tampão *GE Wash Buffer 1* por 5 min a temperatura ambiente e a segunda lavagem com tampão *GE Wash Buffer 2* por 5 min a 37°C. Logo em seguida, as lâminas foram colocadas em um suporte para serem analisadas no equipamento *SureScan Microarray Scanner* (G4900DA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Os dados foram extraídos com o auxílio do software *Feature Extraction* (G4460-90053, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e os arquivos gerados foram submetidos ao software *GeneSpring* (G5886AA, Agilent Technologies, Califórnia, EUA) para avaliação dos miRNAs alterados. Os experimentos de microarranjo foram realizados sem réplicas técnicas ou biológicas.

5.8 PCR QUANTITATIVO

As reações de poliadenilação, transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), foram realizadas utilizando o Kit miRNA RT-qPCR Master Mix Detection (600584, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). Primeiramente, 35 μL de RNA foram concentrados em SpeedVac™ Concentrator durante 1 h. Em

seguida, o RNA foi ressuspensionado em 14 μL de água livre de RNase e foram adicionados 4 μL de tampão, 1 μL de rATP (10 mM) e 1 μL da enzima poliA polimerase. Após, as amostras foram incubadas em termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA) a 37°C durante 30 min e 95°C por 5 min. Em seguida, para síntese de cDNA, foram adicionados os seguintes componentes em 4 μL de RNA poliadenilado: 2 μL de tampão, 0,8 μL de dNTP, 1 μL do iniciador adaptador, 1 μL da enzima *AffinityScript RT/RNase* e 11,2 μL de água livre de RNAase. As amostras foram novamente incubadas no termociclador com o seguinte programa: 55°C por 5 min, 25°C por 15 min, 42°C por 30 min e 95°C por 5 min. Em seguida, as amostras de cDNA foram armazenadas a -80°C até a realização da qPCR. A Figura 6 representa esquematicamente uma RT-qPCR envolvendo a poliadenilação, a transcrição reversa com um iniciador adaptador e a qPCR utilizando um iniciador adaptador universal.

Figura 6. Esquema de representação da RT-qPCR.



Representação esquemática das etapas para realização da RT-qPCR. Primeiramente é realizada a poliadenilação dos miRNAs, em seguida, a transcrição reversa para obtenção do cDNA utilizando um iniciador adaptador e por fim, a qPCR é realizada com um iniciador senso específico para o miRNA de interesse e outro iniciador universal antisense.

Fonte: elaborado pela autora

Para realização da qPCR os iniciadores específicos de cada miRNA foram desenhados conforme recomendado no protocolo do kit, seguindo o guia online disponível em: www.genomics.agilent.com/files/LitItems/miRNA_primer_design_guidelines.pdf.

Foram desenhados iniciadores para avaliação da expressão de cel-miR-238-3p; hsa-miR-223-3p; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-451a; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-25-3p; hsa-miR-126-3p; hsa-miR-1202; hsa-miR-5100; hsa-miR-6510 e o hsa-miR-1273g-3p. A descrição dos iniciadores utilizados pode ser visualizada no Quadro 3. A qPCR foi realizada utilizando 1 µL de cDNA (diluído 1:6); 12,5 µL de *master mix* (miRNA qPCR master mix, 600583, Agilent Technologies, Califórnia, EUA); 0,375 µL de corante de referência passiva ROX (diluído 1:50); 1 µL do iniciador universal antisense (3,125 µM); 1 µL do iniciador senso específico para o miRNA e 9,125 µL de água livre de RNase. A qPCR foi realizada com o seguinte programa: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 10 s (desnaturação), temperatura de anelamento por 15 s (anelamento) e 72°C por 20 s (extensão). Por fim, foi realizada uma curva de dissociação a 95°C por 1 min; temperatura de anelamento por 30 s e 95°C por 1 min.

Quadro 3. Descrição dos iniciadores utilizados.

Iniciadores	Sequências 5' → 3'	Temperatura de anelamento °C
cel-miR-238	TTTGTACTCCGATGCCATTCAGA	54
miR-223-3p	GTGTCAGTTTGCAAATACCCCA	54
miR-20a-5p	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	52
miR-106b-5p	GTAAAGTGCTGACAGTGCAGAT	53
miR-25-3p	GCATTGCACTTGTCTCGGTC	54
miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG	53
miR-1202	CAGCTGCAGTGGGGGAG	54
miR-451a	GGAAACCGTTACCATTACTGAGTT	54
miR-5100	AGATCCCAGCGGTGCCTCT	55
miR-1273g-3p	CACGCACTCCAGCCTGAG	55
miR-6510	AGGGGAGAGAGAGGAGTC	53

Os experimentos foram realizados em duplicatas técnicas e os resultados foram reportados como expressão relativa calculada por $2^{-(\Delta Cq)}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) utilizando o miR-1273g-3p como controle endógeno. O resultado final de $2^{-(\Delta Cq)}$ foi multiplicado por 1000 para melhor visualização das diferenças de expressão entre os grupos.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises provenientes da técnica de microarranjo foram utilizados os programas Genespring GX (G5886AA- Agilent Technologies, Califórnia, EUA) e GraphPad Prism 5 para análise dos resultados. A análise de normalidade foi realizada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Um miRNA detectável foi definido como um miRNA positivo no microarranjo em 70% das amostras em pelo menos uma das condições (Controle x Doente; com ACLF x sem ACLF ou Sobrevivente x Óbito). Além disso, foram considerados apenas miRNAs com *Fold Change*; FC (razão de expressão entre os grupos para cada miRNA) ≥ 4 ou ≥ 10 e com valores de p menores que 0,05. Os miRNAs com expressão alterada foram identificados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney com correção de Benjamini-Hochberg ou Storey com *bootstrapping*.

Para os resultados gerados na RT-qPCR e para as comparações das variáveis clínicas de interesse foi utilizado o programa SPSS v.22 (SPSS, Chicago, IL, EUA). A normalidade da distribuição das variáveis também foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis numéricas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de Student e o teste de Mann-Whitney foi utilizado nos casos de distribuição não-normal. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado. A correlação entre as variáveis numéricas foi calculada pelo coeficiente de correlação de Spearman (ρ Spearman). Análise de regressão logística múltipla foi utilizada para investigar os fatores independentemente associados com ACLF. Análise de regressão

univariada ou multivariada de Cox foi utilizada para investigar a associação da expressão dos miRNAs com a mortalidade dos pacientes em 30 dias. Os melhores pontos de corte para os miRNAs predizerem a mortalidade foram escolhidos pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*). A curva de Kaplan-Meier foi usada para a sobrevida dos pacientes em 30 dias divididos em dois estratos de acordo com o ponto de corte da expressão do miRNA, e as diferenças de sobrevida entre os grupos foram comparadas usando o teste de *log-rank*. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DOS miRNAs ALTERADOS NO SORO DE PACIENTES COM ACLF DETERMINADOS PELA METODOLOGIA DE MICROARRANJO

6.1.1 Características dos controles saudáveis e dos pacientes utilizados no ensaio de microarranjo

No ensaio de microarranjo foram utilizadas 9 amostras de indivíduos controle selecionados na área de Coleta do Hospital Universitário da UFSC (HU-UFSC), que aguardavam para coleta de sangue para exames de rotina. As Tabelas 1 e 2 mostram as características dos controles e dos pacientes incluídos nesta etapa do estudo, respectivamente. No grupo de indivíduos controle havia 5 indivíduos do sexo masculino e 4 do sexo feminino e a média de idade foi $45,9 \pm 14,2$ (média \pm DP). Os resultados laboratoriais de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina, bilirrubina total, razão normalizada internacional (RNI) e proteína C reativa (PCR) estavam dentro da normalidade. No grupo de pacientes com problemas hepáticos, 35 amostras de soro foram utilizadas, a média da idade foi de $53,6 \pm 8,8$ (média \pm DP), com predominância masculina (74,3%). A causa mais comum de cirrose foi o consumo de álcool (62,9%) seguido de hepatite

C (40,0%). Na admissão, ascite foi constatada em 60,0% dos pacientes e infecção nas primeiras 48 h estava presente em 45,7% dos casos. Entre os 35 pacientes avaliados 15 preencheram critérios para ACLF e 7 foram a óbito em 30 dias. Em relação aos parâmetros laboratoriais os pacientes apresentaram valores alterados de AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina, bilirrubina total, RNI, creatinina e PCR.

Tabela 1. Características dos indivíduos controles utilizados do ensaio de microarranjo

Parâmetros	n (%)		Valores	
	Válido	Ausente	Média ± DP	
Idade, anos	9 (100)	0	45,9 ± 14,2	
Sexo	Masculino	5 (55,6)	0	
	Feminino	4 (44,4)	0	
Dados laboratoriais	Valores de referência*			
AST (TGO)	0 - 38 U/L	9 (100)	0	19,3 ± 9,3
ALT (TGP)	0 - 41 U/L	9 (100)	0	27,6 ± 13,7
GGT	11 - 50 U/L	9 (100)	0	35,2 ± 24,0
Fosfatase alcalina	65,0 - 300,0 U/L	9 (100)	0	81,1 ± 20
Bilirrubina total	Até 1,0 mg/dL	9 (100)	0	0,4 ± 0,2
RNI	Aproximadamente 1,0	9 (100)	0	1,0 ± 0,02
PCR	0,0 - 5,0 mg/L	9 (100)	0	3,4 ± 0,1

PCR, proteína C reativa; **GGT**, gama glutamil transpeptidase; **RNI**, razão normalizada internacional; **AST**, aspartato aminotransferase; **ALT**, alanina aminotransferase; **DP**, desvio padrão

* Fonte dos valores de referência dos dados laboratoriais: USP, 2018

Tabela 2. Características dos pacientes utilizados no ensaio de microarranjo
(continua)

Parâmetros	n (%)		Valores	
	Válido	Ausente	Média ± DP	
Idade, anos	35 (100)	0	53,6 ± 8,8	
Sexo	Masculino	26 (74,3)	0	
	Feminino	9 (25,7)	0	
Etiologia da cirrose				
Hepatite B	Não	32 (91,4)	0	
	Sim	3 (8,6)	0	
Hepatite C	Não	21 (60)	0	
	Sim	14 (40)	0	
Álcool	Não	13 (37,1)	0	
	Sim	22 (62,9)	0	
Diagnóstico de HCC	Não	30 (85,7)	0	
	Sim	5 (14,3)	0	
ACLF	Sim	20 (57,1)	0	
	Não	15 (42,9)	0	
Infecção presente nas primeiras 48 h	Não	19 (54,3)	0	
	Sim	16 (45,7)	0	
Ascite na admissão	Não	14 (40)	0	
	Sim	21 (60)	0	
HDA nas primeiras 48 h	Não	26 (74,3)	0	
	Sim	9 (25,7)	0	
Óbito em 30 dias	Não	28 (80)	0	
	Sim	7 (20)	0	
Dados laboratoriais	Valores de referência*			
AST (TGO)	0 - 38 U/L	35 (100)	0	107,0 ± 113,7
ALT (TGP)	0 - 41 U/L	35 (100)	0	50,7 ± 27,8
GGT	11 - 50 U/L	35 (100)	0	410,2 ± 1054,8
Fosfatase alcalina	65,0 - 300,0 U/L	35 (100)	0	183,9 ± 107,6

Tabela 2. Características dos pacientes utilizados no ensaio de miRNA *microarranjo*

Parâmetros		n (%)		(continuação)
		Válido	Ausente	Valores Média ± DP
Bilirrubina total	Até 1,0 mg/dL	35 (100)	0	4,9 ± 7,9
RNI	Aproximadamente 1,0	33 (94,3)	2 (5,7)	1,5 ± 0,3
PCR	0,0 - 5,0 mg/L	28 (80,0)	7 (20,0)	35,0 ± 45,8
Creatinina	0,7 - 1,2 mg/dL	26 (74,3)	9 (25,7)	1,5 ± 0,8
Albumina	3,5 - 4,8 g/dL	34 (97,1)	1 (2,9)	2,4 ± 0,5
Sódio	133,0 - 149,0 mmol/L	33 (94,3)	2 (5,7)	134,4 ± 4,9
Leucometria total	3800 - 11000/mm ³	32 (91,4)	3 (8,6)	7163,8 ±5923,0

PCR. proteína C reativa; **GGT.** gama glutamil transpeptidase; **RNI.** razão normalizada internacional; **AST.** aspartato aminotransferase; **ALT.** alanina aminotransferase; **DP.** desvio padrão; **HDA.** hemorragia digestiva alta; **ACLF.** insuficiência hepática crônica agudizada; **HCC.** carcinoma hepatocelular

* Fonte dos valores de referência dos dados laboratoriais: USP, 2018

6.1.2 Avaliação da qualidade do RNA total

A avaliação da qualidade do RNA foi realizada visualmente pelos eletroferogramas no equipamento Bioanalyzer. Observa-se nos eletroferogramas, demonstrados no Apêndice C, que todas as amostras apresentaram picos na região dos pequenos RNAs (aproximadamente entre 25 a 200 nucleotídeos (nt)). Como pode ser visto, não foram detectados picos altos em aproximadamente 2000 e 4000 nt, região que representa o RNA ribossomal 18S e 28S. Assim, pode-se afirmar que os RNAs extraídos do soro nas amostras estudadas não estavam contaminados por células ou restos celulares. O RNA obtido apresentou

qualidade suficiente para ser submetido à análise de perfil de miRNAs por microarranjo.

6.1.3 Perfil de miRNAs no soro de pacientes com ACLF avaliados pela técnica de microarranjo

Para obtenção dos resultados, foram utilizadas 7 lâminas para avaliação de 35 amostras de pacientes e 9 amostras controle. Entre os 35 pacientes 15 (42,9%) eram ACLF e 7 (20,0%) foram a óbito em 30 dias. Nesta etapa foram realizadas as seguintes comparações: Grupo controle *versus* todos pacientes; Pacientes ACLF *versus* pacientes sem ACLF; pacientes que foram a óbito em 30 dias *versus* pacientes sobreviventes.

Após a varredura das lâminas no equipamento *SureScan microarray Scanner* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), foram gerados relatórios com informações sobre a qualidade do processamento da lâmina. Alguns parâmetros de qualidade foram avaliados tais como: uniformidade do *array*; manipulação adequada das etapas de hibridização, lavagem, secagem; avaliação do sinal do *spike-in* de marcação e hibridização e presença de impurezas fluorescentes indesejáveis. Os relatórios gerados mostraram que todas as leituras apresentaram boa qualidade possibilitando a análise de dados de forma confiável.

Os resultados gerados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (KS), sendo verificado que não apresentam distribuição normal. Conseqüentemente optou-se pela utilização do teste não paramétrico de Mann-Whitney, que não faz pressuposição sobre a distribuição dos dados. Em seguida foram utilizados os testes de correção de Benjamini-Hochberg ou Storey com *bootstrapping* para redução de falsos positivos. Na primeira análise, para comparação da expressão dos miRNAs entre o grupo controle e pacientes foi adotado o critério de *Fold change* (FC) maior igual a 10 e valor de p menor que 0,05. Com esta análise foram identificados 7 miRNAs com expressão diferencial entre os grupos. Entre estes, 6 estavam com diminuição da expressão e 1 com aumento. A Tabela 3 mostra o valor de p, a regulação (*down* ou *up*) e o FC de cada miRNA

alterado nos grupos analisados. Os miRNAs significativamente alterados foram os seguintes: let-7a-5p, let-7f-5p, miR-130a-3p, miR-142-3p, miR-146a-5p, miR-199a-3p e o miR-575. O miRNA com alteração mais significativa nesta análise foi o miR-146a-5p com valor de FC de 22 e valor-p de 0,0001.

Tabela 3. miRNAs com expressão diferencial nos pacientes em relação ao grupo controle.

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-let-7a-5p	0,0010	13	<i>down</i>
hsa-let-7f-5p	0,0024	15	<i>down</i>
hsa-miR-130a-3p	0,0007	17	<i>down</i>
hsa-miR-142-3p	0,0029	22	<i>down</i>
hsa-miR-146a-5p	0,0001	22	<i>down</i>
hsa-miR-199a-3p	0,0009	15	<i>down</i>
hsa-miR-575	0,0024	11	<i>up</i>

FC. Fold Change; **Valor-p.** indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre o grupo controle e doente; **down.** diminuição da expressão, **up.** aumento da expressão. Teste de Mann-Whitney e correção de Benjamini-Hochberg; $p < 0,05$. Expressão diferencial com $FC \geq 10$.

Em seguida, foi realizada análise estatística para comparação dos miRNAs alterados nos pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF. O resultado desta análise encontra-se na Tabela 4. Observa-se que 52 miRNAs estavam alterados nos pacientes com ACLF ($p < 0,05$ e $FC \geq 4$). Os miRNAs, let-7a-5p, let-7g-5p, miR-106b-5p, miR-107, miR-126-3p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-25-3p, miR-451a, destacados em cinza na tabela, apresentaram os maiores valores de FC ($FC \geq 10$) e valores de p que variaram de 0,0012 a 0,0123. É interessante observar que a regulação de todos os miRNAs foi *down*, ou seja, a expressão dos miRNAs foi mais reduzida nos pacientes com ACLF do que nos pacientes sem ACLF. Para complementação dos resultados, a Figura 7 mostra a matriz de expressão dos miRNAs alterados nos pacientes ACLF, sem ACLF e no grupo controle. Cada retângulo representa um paciente e as cores indicam a intensidade de expressão. Os retângulos verdes indicam indução da expressão, os vermelhos repressão, e o preto, sem modulação. É interessante observar uma quantidade maior de

retângulos vermelhos nos pacientes ACLF, principalmente nos miRNAs, let-7a-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, miR-126-3p, miR-142-3p, miR-150-5p, miR-17-5p miR-20a-5p miR-25-3p, miR-27a-3p. Observa-se também que a intensidade de expressão dos miRNAs no grupo controle está mais parecida com o grupo sem ACLF do que com os pacientes com ACLF.

Tabela 4. miRNAs com expressão diferencial em pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF. (continua)

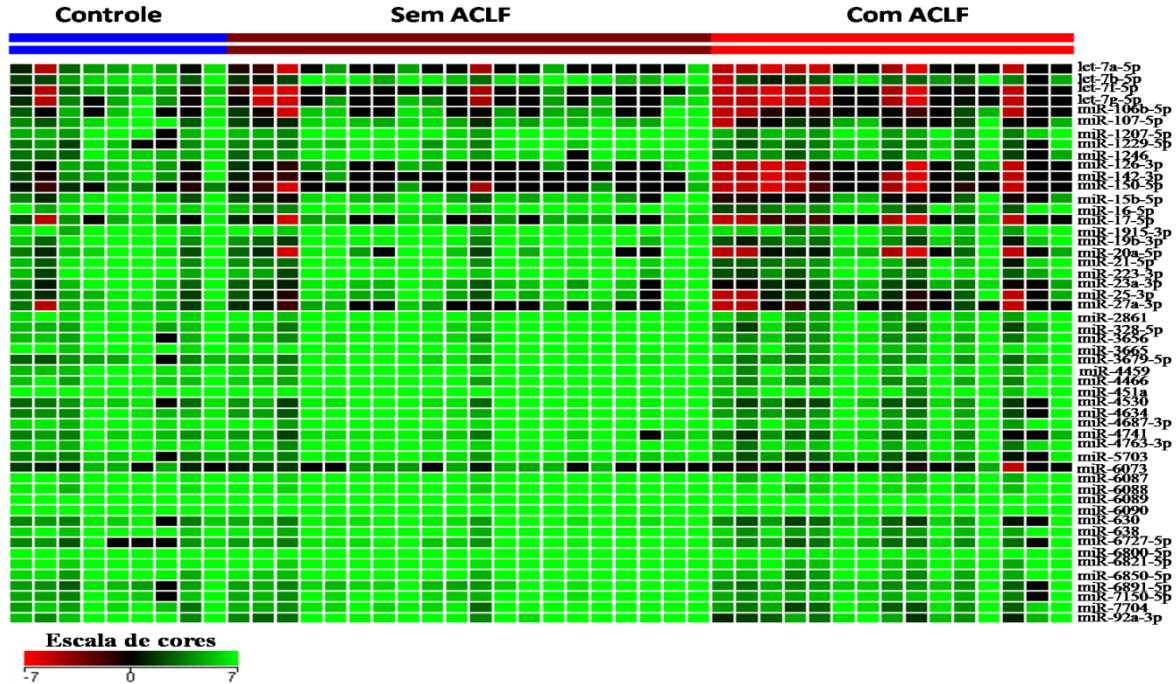
miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-let-7a-5p	0,0041	10	<i>down</i>
hsa-let-7b-5p	0,0069	6	<i>down</i>
hsa-let-7f-5p	0,0108	6	<i>down</i>
hsa-let-7g-5p	0,0092	14	<i>down</i>
hsa-miR-106b-5p	0,0075	10	<i>down</i>
hsa-miR-107	0,0012	11	<i>down</i>
hsa-miR-1207-5p	0,0063	4	<i>down</i>
hsa-miR-1229-5p	0,0027	5	<i>down</i>
hsa-miR-1246	0,0048	4	<i>down</i>
hsa-miR-126-3p	0,0062	14	<i>down</i>
hsa-miR-142-3p	0,0087	8	<i>down</i>
hsa-miR-150-5p	0,0051	7	<i>down</i>
hsa-miR-15b-5p	0,0024	9	<i>down</i>
hsa-miR-16-5p	0,0063	8	<i>down</i>
hsa-miR-17-5p	0,0045	15	<i>down</i>
hsa-miR-1915-3p	0,0093	4	<i>down</i>
hsa-miR-19b-3p	0,0103	5	<i>down</i>
hsa-miR-20a-5p	0,0123	18	<i>down</i>
hsa-miR-21-5p	0,0124	5	<i>down</i>
hsa-miR-223-3p	0,0019	7	<i>down</i>
hsa-miR-23a-3p	0,0028	6	<i>down</i>
hsa-miR-25-3p	0,0046	16	<i>down</i>
hsa-miR-27a-3p	0,0076	7	<i>down</i>
hsa-miR-2861	0,0034	5	<i>down</i>
hsa-miR-328-5p	0,0034	6	<i>down</i>
hsa-miR-3656	0,0030	5	<i>down</i>
hsa-miR-3665	0,0103	5	<i>down</i>
hsa-miR-3679-5p	0,0063	4	<i>down</i>

Tabela 4. miRNAs com expressão diferencial em pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF. (continuação)

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-miR-4459	0,0077	5	<i>down</i>
hsa-miR-4466	0,0046	4	<i>down</i>
hsa-miR-451a	0,0041	10	<i>down</i>
hsa-miR-4530	0,0017	7	<i>down</i>
hsa-miR-4634	0,0093	4	<i>down</i>
hsa-miR-4687-3p	0,0093	4	<i>down</i>
hsa-miR-4741	0,0108	4	<i>down</i>
hsa-miR-4763-3p	0,0069	4	<i>down</i>
hsa-miR-5703	0,0008	7	<i>down</i>
hsa-miR-6073	0,0033	4	<i>down</i>
hsa-miR-6087	0,0063	4	<i>down</i>
hsa-miR-6088	0,0069	4	<i>down</i>
hsa-miR-6089	0,0113	5	<i>down</i>
hsa-miR-6090	0,0069	6	<i>down</i>
hsa-miR-630	0,0006	7	<i>down</i>
hsa-miR-638	0,0046	5	<i>down</i>
hsa-miR-6727-5p	0,0017	5	<i>down</i>
hsa-miR-6800-5p	0,0103	4	<i>down</i>
hsa-miR-6821-5p	0,0041	5	<i>down</i>
hsa-miR-6850-5p	0,0124	5	<i>down</i>
hsa-miR-6891-5p	0,0022	5	<i>down</i>
hsa-miR-7150	0,0093	4	<i>down</i>
hsa-miR-7704	0,0098	4	<i>down</i>
hsa-miR-92a-3p	0,0077	5	<i>down</i>

FC. *Fold Change*; **Valor-p.** indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre os grupos com ACLF e sem ACLF; **down.** diminuição da expressão. Teste de Mann-Whitney e correção de Benjamini-Hochberg; $p < 0,05$. Expressão diferencial com $FC \geq 4$. miRNAs destacados em cinza apresentaram valores de FC maiores ou iguais a 10 ($FC \geq 10$).

Figura 7. Matriz de expressão dos miRNAs significativamente alterados em pacientes sem ACLF, com ACLF e no grupo controle. Os valores de intensidade de expressão variaram de 7 (verde claro) a -7 (vermelho claro).



Por fim, os pacientes com ACLF e sem ACFL foram reagrupados conforme evolução clínica. Um grupo foi constituído pelos pacientes que sobreviveram e outro por aqueles que foram a óbito em 30 dias. Na Tabela 5 estão listados os miRNAs alterados nesta comparação ($p < 0,05$ e $FC \geq 4$). Foram detectados 64 miRNAs com regulação *down* nos pacientes que foram a óbito em relação aos sobreviventes. Entre estes, destacam-se os miRNAs: let-7a-5p, let-7g-5p, miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-17-5p, miR-199a-3p, miR-20a-5p, miR-223-3p, miR-25-3p e miR-575. Estes miRNAs apresentaram valores de FC maiores ou iguais a 10 (destacados em cinza na tabela) e valores de p que variaram de 0,0057 a 0,026.

Tabela 5. miRNAs com expressão diferencial em pacientes sobreviventes em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias. (continua)

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-let-7a-5p	0,0089	13	<i>down</i>
hsa-let-7b-5p	0,0354	4	<i>down</i>
hsa-let-7f-5p	0,0119	9	<i>down</i>
hsa-let-7g-5p	0,0077	18	<i>down</i>
hsa-let-7i-5p	0,0496	5	<i>down</i>
hsa-miR-106b-5p	0,0057	13	<i>down</i>
hsa-miR-1202	0,0224	4	<i>down</i>
hsa-miR-1207-5p	0,0150	4	<i>down</i>
hsa-miR-126-3p	0,0187	14	<i>down</i>
hsa-miR-1281	0,0040	4	<i>down</i>
hsa-miR-146a-5p	0,0119	9	<i>down</i>
hsa-miR-150-3p	0,0119	5	<i>down</i>
hsa-miR-150-5p	0,0133	8	<i>down</i>
hsa-miR-15a-5p	0,0151	6	<i>down</i>
hsa-miR-16-5p	0,0167	8	<i>down</i>
hsa-miR-17-5p	0,0260	12	<i>down</i>
hsa-miR-199a-3p	0,0106	10	<i>down</i>
hsa-miR-19a-3p	0,0092	8	<i>down</i>
hsa-miR-19b-3p	0,0126	7	<i>down</i>
hsa-miR-20a-5p	0,0209	15	<i>down</i>
hsa-miR-21-5p	0,0430	5	<i>down</i>
hsa-miR-22-3p	0,0187	4	<i>down</i>

Tabela 5. miRNAs com expressão diferencial em pacientes sobreviventes em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias. (continuação)

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-miR-223-3p	0,0224	10	<i>down</i>
hsa-miR-23a-3p	0,0034	8	<i>down</i>
hsa-miR-24-3p	0,0112	9	<i>down</i>
hsa-miR-25-3p	0,0245	11	<i>down</i>
hsa-miR-27a-3p	0,0259	6	<i>down</i>
hsa-miR-2861	0,0178	4	<i>down</i>
hsa-miR-29c-3p	0,0392	6	<i>down</i>
hsa-miR-33b-3p	0,0168	5	<i>down</i>
hsa-miR-3656	0,0476	4	<i>down</i>
hsa-miR-3665	0,0288	4	<i>down</i>
hsa-miR-4270	0,0050	4	<i>down</i>
hsa-miR-4327	0,0260	4	<i>down</i>
hsa-miR-4443	0,0168	6	<i>down</i>
hsa-miR-4459	0,0496	5	<i>down</i>
hsa-miR-4466	0,0260	4	<i>down</i>
hsa-miR-4515	0,0199	8	<i>down</i>
hsa-miR-451a	0,0177	8	<i>down</i>
hsa-miR-453	0,0288	7	<i>down</i>
hsa-miR-4534	0,0094	4	<i>down</i>
hsa-miR-4687-3p	0,0150	5	<i>down</i>
hsa-miR-4741	0,0187	7	<i>down</i>
hsa-miR-4763-3p	0,0036	5	<i>down</i>
hsa-miR-486-5p	0,0150	6	<i>down</i>
hsa-miR-5100	0,0433	4	<i>down</i>
hsa-miR-5703	0,0478	4	<i>down</i>
hsa-miR-575	0,0168	10	<i>down</i>
hsa-miR-5787	0,0104	7	<i>down</i>
hsa-miR-6089	0,0186	6	<i>down</i>
hsa-miR-6090	0,0209	7	<i>down</i>
hsa-miR-6125	0,0187	5	<i>down</i>
hsa-miR-630	0,0433	4	<i>down</i>
hsa-miR-634	0,0233	4	<i>down</i>
hsa-miR-642a-3p	0,0260	6	<i>down</i>
hsa-miR-642b-3p	0,0119	4	<i>down</i>
hsa-miR-6749-5p	0,0052	5	<i>down</i>
hsa-miR-6752-5p	0,0187	6	<i>down</i>

Tabela 5. miRNAs com expressão diferencial em pacientes sobreviventes em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias. (continuação)

miRNA	Valor-p	FC	Regulação
hsa-miR-6763-5p	0,0082	4	<i>down</i>
hsa-miR-6821-5p	0,0433	4	<i>down</i>
hsa-miR-6850-5p	0,0354	4	<i>down</i>
hsa-miR-7704	0,0320	4	<i>down</i>
hsa-miR-8069	0,0052	5	<i>down</i>
hsa-miR-92a-3p	0,0478	4	<i>down</i>

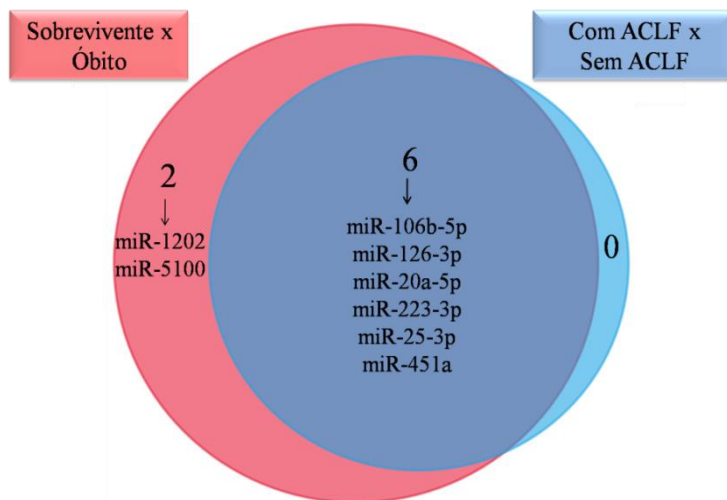
FC. *Fold Change*; **Valor-p.** indica o valor de p no teste estatístico da comparação entre os grupos Sobrevivente e Óbito; *down.* diminuição da expressão. Teste de Mann-Whitney e correção de Storey com *bootstrapping*; $p < 0,05$. Expressão diferencial com $FC \geq 4$. miRNAs destacados em cinza apresentaram valores de FC maiores ou iguais a 10 ($FC \geq 10$).

6.1.4 miRNAs selecionados para validação por RT-qPCR

A seleção dos miRNAs para validação por RT-qPCR foi realizada baseada nos resultados obtidos na análise de microarranjo, pela observação dos miRNAs detectados nas amostras e por dados relatados na literatura. Inúmeros miRNAs que apresentaram altos valores de FC e baixos valores de p não foram selecionados devido a baixa detecção ou ausência de detecção nas amostras em ambos os grupos analisados. Sendo assim, os miRNAs selecionados foram: miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-20a-5p, miR-223-3p, miR-25-3p, miR-451a, miR-1202 e miR-5100. No diagrama de Venn, Figura 8, visualiza-se estes miRNAs nos diferentes grupos analisados. Observa-se que os miRNAs miR-1202 e miR-5100 estavam significativamente alterados somente na comparação sobrevivente em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias. O restante dos miRNAs também estavam expressos na comparação com ACLF *versus* sem ACLF. Não foram escolhidos miRNAs que diferenciaram o grupo controle dos pacientes doentes pois decidiu-se pela não inclusão desse grupo na análise por RT-qPCR. Para melhor visualização da distribuição da intensidade de expressão destes

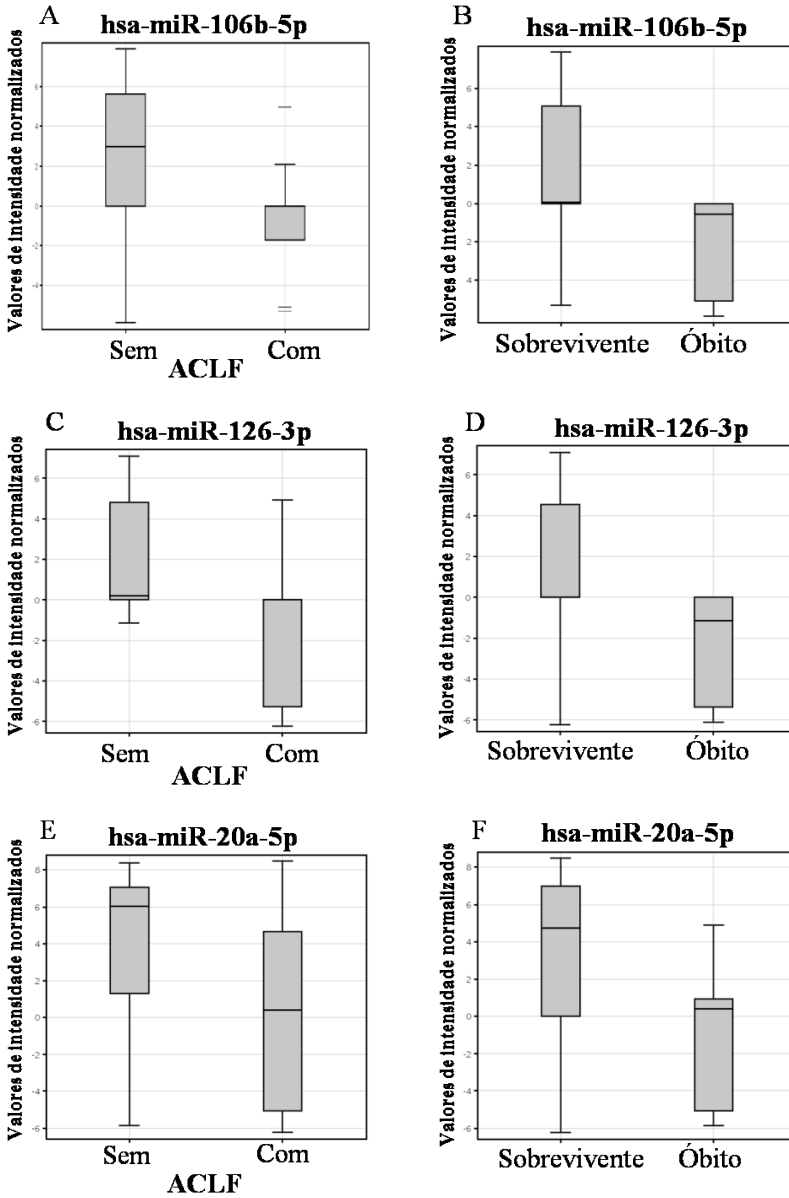
miRNAs, foram criados gráficos do tipo *Box Plot* (Figura 9). Como pode ser visto nestas figuras, a mediana dos valores de intensidade de expressão, representada pela linha preta dentro das caixas no gráfico, é sempre menor nos pacientes ACLF ou nos pacientes que foram a óbito.

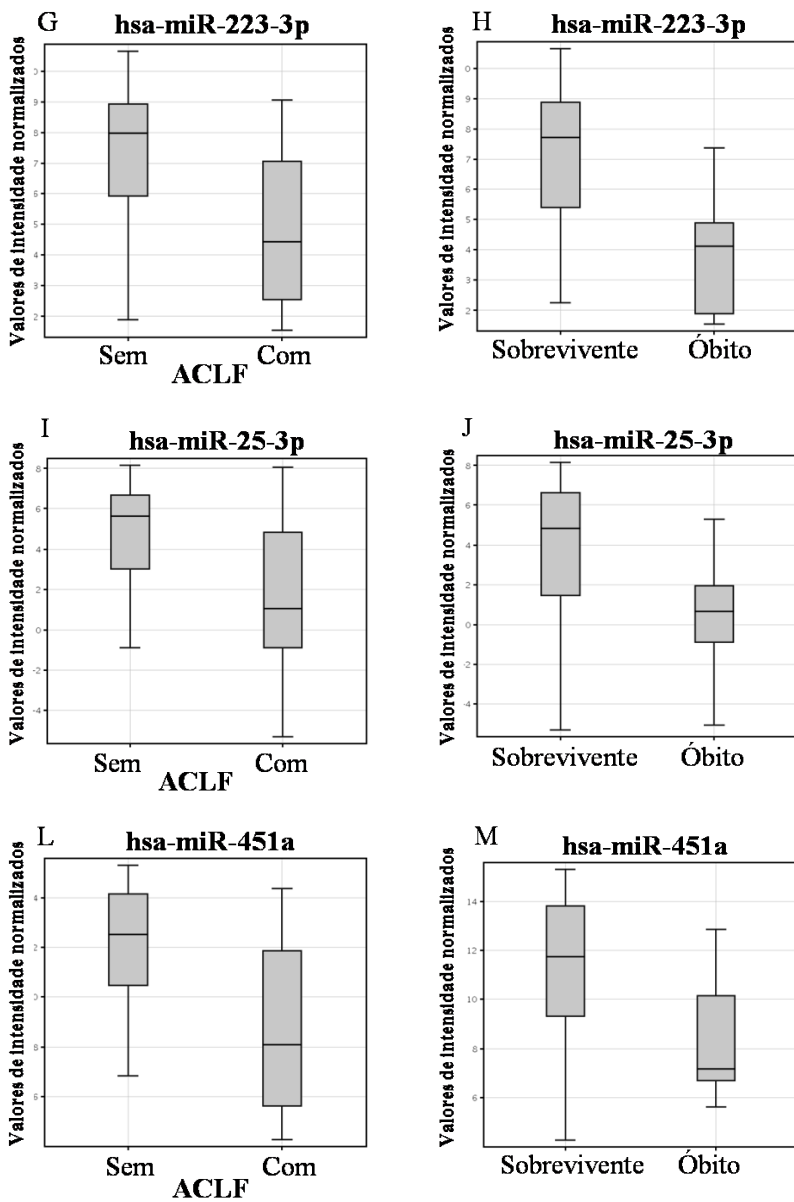
Figura 8. Diagrama de Venn com os miRNAs alterados nos grupos com ausência ACLF \times ACLF presente e Sobrevivente \times Óbito e que foram selecionados para validação por RT-qPCR.

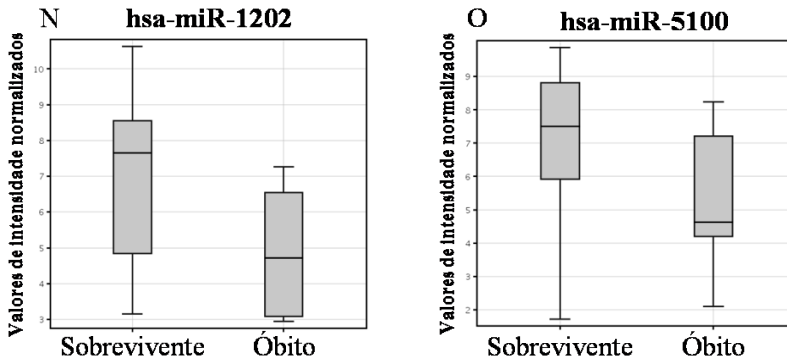


Os números dentro dos círculos representam a quantidade de miRNAs presentes no conjunto.

Figura 9. Gráficos do tipo *Box Plot* dos miRNAs selecionados para validação por RT-qPCR







6.1.5 Escolha dos miRNAs normalizadores endógenos para as reações de RT-qPCR

A escolha dos miRNAs normalizadores endógenos para as reações de RT-qPCR foi realizada utilizando os dados obtidos na análise de microarranjo. Foram selecionados miRNAs com valores de intensidade detectados em todas as amostras e que não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Na Tabela 6 pode-se visualizar a média dos valores de intensidade e o desvio padrão de todos os miRNAs detectados e que não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Observa-se que o desvio padrão da média de intensidade foi similar entre os miRNAs. Sendo assim, optou-se por selecionar os miRNAs miR-1273g-3p e o miR-6510-5p para servirem de normalizadores nas reações de RT-qPCR.

Tabela 6. miRNAs detectados em todas amostras de pacientes e que não apresentaram diferença significativa entre os grupos com e sem ACLF; Sobrevivente e Óbito. Média e desvio padrão dos valores de intensidade normalizados.

miRNAs	Média dos valores de intensidade normalizados	DP
hsa-miR-1273g-3p	7,2	2,1
hsa-miR-197-5p	7,0	2,4
hsa-miR-3663-3p	7,7	1,9
hsa-miR-4281	10,7	1,9
hsa-miR-634	7,9	2,4
hsa-miR-642a-3p	6,8	2,1
hsa-miR-6510-5p	6,4	1,9
hsa-miR-7641	5,2	2,3
hsa-miR-7975	8,7	2,2

DP. desvio padrão

6.2 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS POR RT-qPCR

6.2.1 Características dos pacientes incluídos para validação dos dados por RT-qPCR

Na etapa de validação dos dados, foram avaliadas 139 amostras de pacientes admitidos no HU-UFSC devido à descompensações agudas da cirrose hepática. Na Tabela 7 são apresentadas as principais características dos pacientes bem como os fatores associados à ACLF. A média de idade dos pacientes foi de 55,3 anos, com predominância masculina (70,5%). A etiologia da cirrose foi associada principalmente ao consumo de álcool (50,4%) seguido de hepatite C (37,4%) e hepatite B (7,2%). Na admissão hospitalar, 49,6% dos pacientes estavam com ascite e 45,3% com encefalopatia. Nas primeiras 48 h foi observado hemorragia digestiva alta (HDA) em 34,5% dos pacientes e infecção em 49,6%. O uso de propranolol foi relatado em 36,7% dos pacientes e 40,6% foram classificados com Chil-pugh C (escore no Anexo B). Ainda, a média do escore de MELD (escore no ANEXO B) foi de 17,5 e 22,3% dos pacientes foram a óbito em 30 dias.

6.2.2 Fatores associados à ACLF

Entre os 139 pacientes incluídos no estudo, 35 preencheram critérios para ACLF. Como pode ser visualizado na Tabela 7, 67,6% dos pacientes ACLF apresentaram escore para Child-Pugh C e a etiologia da cirrose estava mais relacionada à hepatite C. Na admissão, pacientes ACLF demonstraram maior prevalência de encefalopatia (74,3 vs. 35,6%, $p<0,001$), ascite (82,9 vs. 38,5%, $p<0,001$) e nas primeiras 48 h, menor prevalência de HDA (14,3 vs. 41,3, $p=0,004$). Em relação aos dados laboratoriais, pacientes com ACLF apresentaram maiores valores de mediana de creatinina ($p<0,001$), bilirrubina total ($p<0,029$), RNI ($p=0,034$) e PCR ($p=0,029$). Além disso, apresentaram menor concentração média de sódio ($p<0,001$) e menor pressão arterial média em relação aos indivíduos sem ACLF. Ainda, a mortalidade em 30 dias dos pacientes ACLF foi de 48,6% e de 13,5% nos demais pacientes do estudo ($p<0,001$). Em relação ao escore MELD, a média foi significativamente superior nos pacientes ACLF ($p<0,001$).

Tabela 7. Características dos pacientes e fatores associados com ACLF.

(continua)

Parâmetro	Todos pacientes (n = 139)	Sem ACLF (n = 104)	Com ACLF (n = 35)	Valor-p
Idade, anos (média ± DP)	55,3±11,2	55,4±11,8	54,8±9,59	0,783
Sexo masculino, n (%)	98 (70,5)	73 (70,2)	25 (71,4)	0,890
Etiologia da cirrose, n (%) Hepatite C	52 (37,4)	34 (32,7)	18 (51,4)	0,048*
Etiologia da cirrose, n (%) Álcool	70 (50,4)	56 (53,8)	14 (40,0)	0,156
Uso de Propanolol, n (%)	51 (36,7)	42 (40,4)	9 (25,7)	0,119
Child-Pugh C, n (%)	56 (40,6)	33 (31,7)	23 (67,6)	<0,001 ***
Complicações na admissão, n (%)				
Ascite (dicotomizada)	69 (49,6)	40 (38,5)	29 (82,9)	<0,001 ***

Tabela 7. Características dos pacientes e fatores associados com ACLF.

(continuação)

Parâmetro	Todos pacientes (n = 139)	Sem ACLF (n = 104)	Com ACLF (n = 35)	Valor-p
Encefalopatia	63 (45,3)	37 (35,6)	26 (74,3)	<0,001 ***
HDA nas primeiras 48 h	48 (34,5)	43 (41,3)	5 (14,3)	0,004 **
Infecção bacteriana presente nas primeiras 48 h	69 (49,6)	48 (46,2)	21 (60)	0,156
Dados laboratoriais				
Creatinina (mg/dL), (mediana)	1,1	1,0	2,4	<0,001 ***
Leucometria total (mm ³) (mediana)	6700,0	6540,0	8450,0	0,072
Bilirrubina total (mg/dL) (mediana)	2,1	2,0	3,5	0,029 *
Albumina (g/dL) (média±DP)	2,4±0,6	2,4±0,6	2,4±0,6	0,893
RNI (mediana)	1,5	1,4	1,6	0,034 *
Sódio (mEq/L) (média ± DP)	134,9±5,5	136,2±5,0	131,5±5,5	<0,001 ***
PCR (mg/L) (mediana)	19,6	18,0	26,4	0,029 *
Pressão arterial média (mmHg) (média ± DP)	83,4±16,9	85,4±15,5	77,5±20,0	0,020 *
Óbito em 30 dias, n (%)	31 (22,3)	14 (13,5)	17 (48,6)	<0,001 ***
Escore MELD (média ± DP)	17,5±6,9	14,8±4,4	25,4±7,2	<0,001 ***

HDA. hemorragia digestiva alta; **PCR.** proteína C reativa; **MELD.** Modelo para doença hepática terminal. **RNI.** relação normalizada internacional. Testes estatísticos utilizados: Teste t de Student; Teste de Mann-Whitney ou Qui-quadrado de Person. **Valor-p.** nível de significância. *<0,05, **<0,01, ***<0,001.

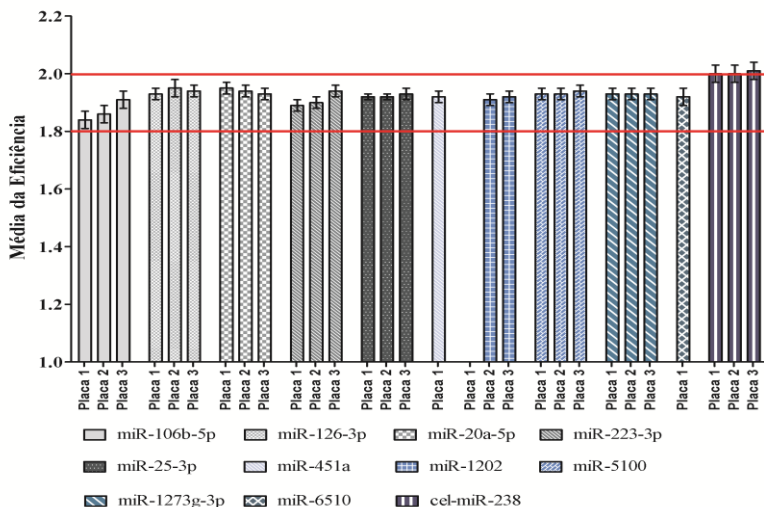
6.2.3 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi realizada no equipamento Nanovue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Conforme a tabela no Apêndice B, a mediana dos valores de RNA total no soro foi de 5,1 ng/μL e a mediana das razões 260/230 e 260/280 foram 1,16 e 0,11, respectivamente, para as 139 amostras utilizadas na etapa de validação. Sabe-se que o espectrofotômetro Nanovue possui um limite de quantificação que varia de 5 – 6000 ng/μL (GE HEALTHCARE, 2017), observa-se que a quantidade de RNA total no soro ficou muito próxima ao limite inferior de quantificação, gerando resultados não confiáveis e limitando a determinação da pureza das amostras. Sendo assim, optou-se pela utilização da mesma quantidade inicial de soro, 500 μL, e pela utilização de 35 μl de RNA total de cada amostra para as reações de RT-qPCR.

6.2.4 Determinação da eficiência da qPCR

A eficiência da qPCR foi determinada utilizando o programa LinRegPCR. A Figura 10 mostra a média da eficiência ± o desvio padrão de cada placa utilizada na qPCR para os diferentes miRNAs avaliados. A média da eficiência variou de 1,84±0,03 a 2,01±0,03. O LinRegPCR considera valores de amplificação eficiente entre 1,8 e 2,0 (aproximadamente 100%) (RAMAKERS *et al.*, 2003). Como a eficiência de todas as placas ficou próxima de 100% a fórmula $2^{-\Delta Cq(\text{miRNA alvo} - \text{miRNA endógeno})}$ foi utilizada para calcular a expressão relativa dos miRNAs na qPCR.

Figura 10. Eficiência da qPCR determinada pelo programa LinRegPCR.



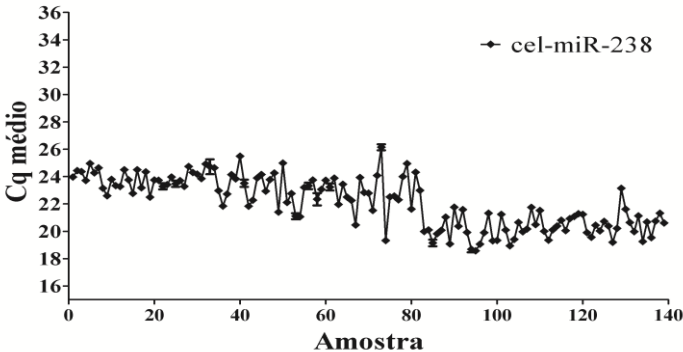
Foi considerada uma amplificação eficiente valores entre 1,8 a 2,0 (entre as linhas vermelhas). Placa 1 – Amostras 1 a 47; Placa 2 – Amostras 48 a 94; Placa 3 – Amostras 95 a 139.

6.2.5 miRNA normalizador; controle de qualidade da extração e cDNA

Para a normalização dos resultados foi utilizado o miR-1273g-3p, pois foi observado uma menor variação dos valores de Cq nas amostras em relação ao miR-6510-5p.

Como controle positivo da extração de RNA total e da RT-qPCR foi utilizado o miRNA exógeno, cel-miR-238, não presente em humanos. Uma quantidade conhecida deste miRNA foi adicionada em cada amostra de soro após a etapa de desnaturação. A Figura 11 exibe os valores médios de Cq para o cel-miR-238 de todas amostras utilizadas neste trabalho. Como houve amplificação semelhante das amostras, pôde-se concluir que a extração de RNA total, a síntese de cDNA e a qPCR ocorreram de maneira eficaz. Além disso, o cel-miR-238 foi detectado em todas amostras de maneira homogênea indicando a possibilidade da ausência de inibidores de RNA no processo de extração de RNA e cDNA.

Figura 11. Ciclo quantitativo (Cq) médio do miRNA exógeno cel-miR-238



6.2.6 Associação entre miRNAs estudados e variáveis de interesse

A Tabela 8 exibe a relação da expressão dos miRNAs miR-106b-5p, miR-126-3p, miR-20a-5p, miR-223-3p, miR-25-3p, miR-1202 e miR-5100 com as diferentes variáveis de interesse estudadas. A expressão do miRNA miR-451a não foi utilizada neste estudo pois de 47 amostras analisadas na primeira placa, apenas 5 amplificaram para o miR-451a.

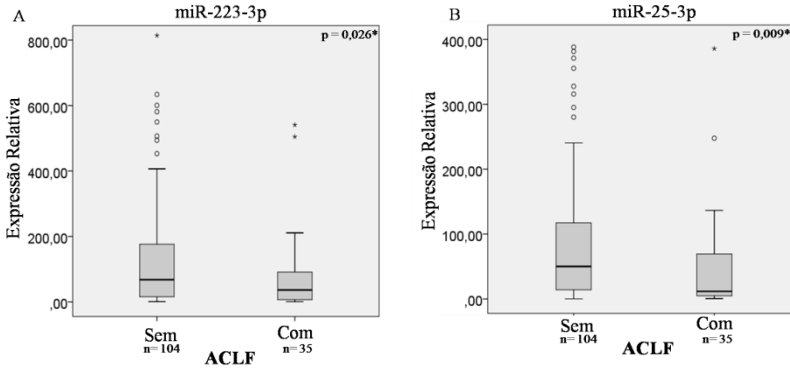
Não foi observada diferença significativa na expressão dos miRNAs quanto aos parâmetros sexo; etiologia relacionada com hepatite B, hepatite C e álcool; diagnóstico de diabetes e HCC; uso de propranolol; pontuação de Child Pugh C; ascite na admissão; infecção e HDA presente nas primeiras 48 h. Por outro lado, a expressão do miR-223-3p e do miR-25-5p estava significativamente diminuída em pacientes com encefalopatia hepática na admissão ($p=0,005$ e $0,034$, respectivamente), naqueles com ACLF ($p=0,026$ e $0,009$, respectivamente) e nos que evoluíram para óbito em 30 dias ($p=0,006$ e $0,008$). Além disso, a expressão do miR-20a-5p, miR-223-3p e miR-25-3p estava diminuída nos pacientes que foram a óbito durante a internação ($n=29$) ($p=0,034$, $0,004$ e $0,004$, respectivamente) (Tabela 8 e Figuras 12-15).

Tabela 8. Expressão de miRNAs relacionados com o sexo dos pacientes e com diferentes parâmetros associados com a doença hepática. (continua)

Parâmetro	Valor-p miR-						
	106b- 5p	126- 3p	20a- 5p	223- 3p	25- 3p	1202	5100
Sexo	0,595	0,963	0,923	0,671	0,339	0,496	0,782
Etiologia Hepatite B	0,218	0,171	0,782	0,328	0,320	0,517	0,767
Etiologia Hepatite C	0,910	0,934	0,931	0,566	0,879	0,069	0,307
Etiologia Álcool	0,374	0,354	0,781	0,940	0,402	0,059	0,590
Diabetes	0,577	0,793	0,245	0,179	0,520	0,147	0,604
Diagnóstico de HCC	0,901	0,362	0,196	0,528	0,255	0,360	0,677
Uso de Propranolol	0,763	0,974	0,979	0,409	0,538	0,261	0,410
Child pugh C	0,615	0,338	0,907	0,150	0,338	0,997	0,934
Infecção presente (primeiras 48h)	0,500	0,587	0,522	0,587	0,794	0,437	0,472
HDA (primeiras 48h)	0,199	0,082	0,199	0,202	0,125	0,538	0,813
Ascite na admissão	0,765	0,833	0,899	0,484	0,333	0,160	0,131
Encefalopatia na admissão	0,402	0,203	0,203	0,005**	0,034*	0,624	0,888
Presença de ACLF	0,597	0,362	0,258	0,026*	0,009**	0,403	0,614
Óbito na internação	0,191	0,446	0,034*	0,004**	0,004**	0,661	0,816
Óbito em 30 dias	0,290	0,376	0,063	0,006**	0,008**	0,224	0,685

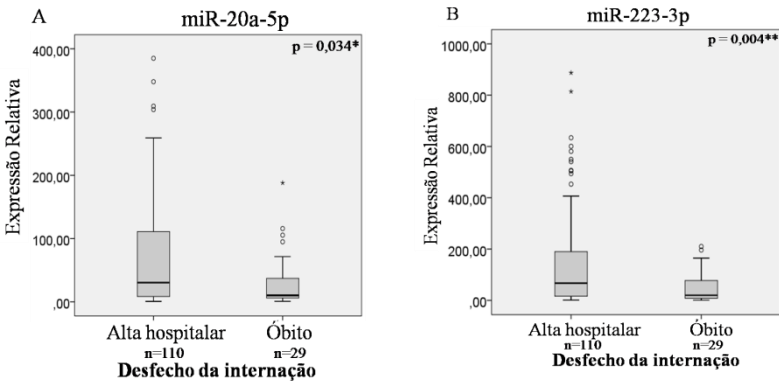
HDA. hemorragia digestiva alta; **ACLF.** insuficiência hepática crônica agudizada; **HCC.** carcinoma hepatocelular. **Valor-p.** nível de significância. * $<0,05$, ** $<0,01$. Teste de Mann-Whitney.

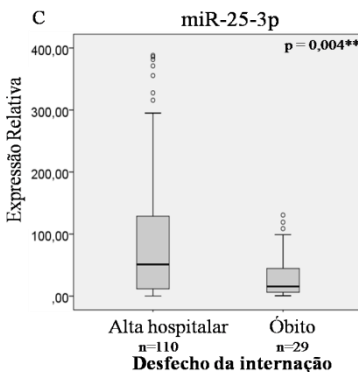
Figura 12. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes com ou sem ACLF.



Número de pacientes com presença ou ausência de ACLF está indicado na figura. \circ e \star representam os *outliers*. Teste de Mann-Whitney. $^* < 0,05$, $^{**} < 0,01$.

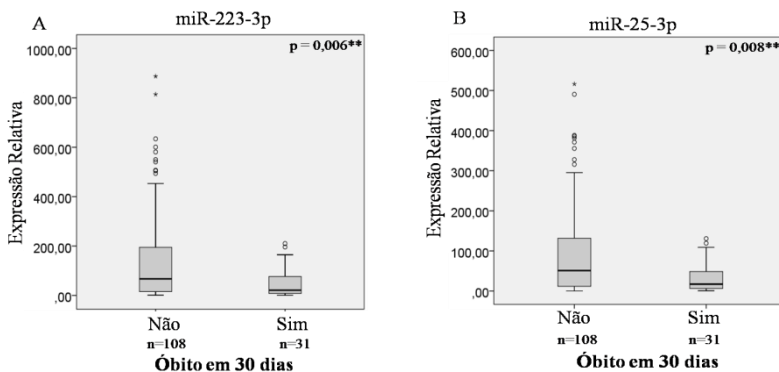
Figura 13. Expressão relativa dos miRNAs miR-20a-5p, miR-223-3p e miR-25-3p em relação ao desfecho da internação (alta hospitalar ou óbito).





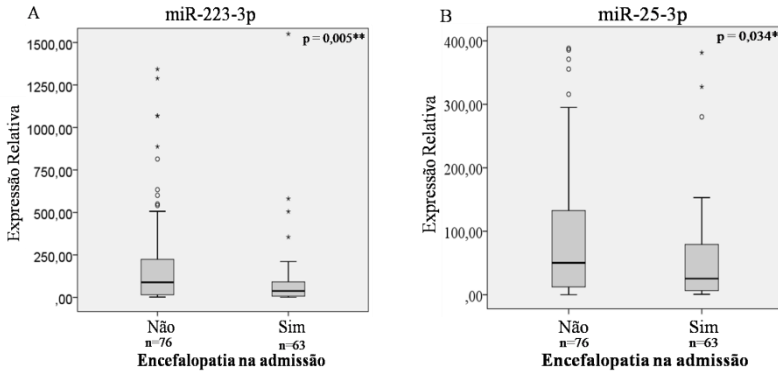
Número de pacientes que receberam alta hospitalar e que foram a óbito na internação está indicado na figura. ° representa os *outliers*. Teste de Mann-Whitney. * $<0,05$, ** $<0,01$.

Figura 14. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes que foram a óbito em 30 dias



Número de pacientes que foram a óbito em 30 dias está indicado na figura. ° e * representam os *outliers*. Teste de Mann-Whitney. ** $<0,01$.

Figura 15. Expressão relativa dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p em relação aos pacientes com encefalopatia hepática na admissão



Número de pacientes com encefalopatia hepática na admissão está indicado na figura. ° e * representam os *outliers*. Teste de Mann-Whitney. * $<0,05$, ** $<0,01$.

A expressão dos miRNAs também foi correlacionada com a idade dos pacientes e com parâmetros laboratoriais associados à doença hepática. Como pode ser visualizado na Tabela 9, a expressão do miR-223-3p foi correlacionada negativamente com a idade dos pacientes ($\rho=-0,19$; $p=0,02$) e somente a expressão do miR-106b-5p foi correlacionada negativamente com valores de leucometria total ($\rho=-0,21$; $p=0,01$). Correlação negativa foi observada entre o miR-1202 e dosagem sódio ($\rho=-0,23$; $p=0,03$), por outro lado, este miRNA apresentou uma correlação positiva com PCR ($\rho=0,26$; $p=0,02$) e escore MELD ($\rho=0,22$; $p=0,03$). A expressão do miR-20a-5p se correlacionou negativamente com valores de creatinina ($\rho=-0,21$; $p=0,01$), bem como, a expressão do miR-223-3p e do miR-25-3p ($\rho=-0,30$; $p<0,001$; $\rho=-0,34$; $p<0,001$, respectivamente). A expressão do miR-223-3p e miR-25-3p foram negativamente associadas com a pontuação de CLIF-SOFA ($\rho=-0,19$; $p=0,03$) ainda, o miR-25-3p se correlacionou negativamente com a escala MELD ($\rho=-0,19$; $p=0,03$).

Tabela 9. Análise de correlação entre miRNAs e parâmetros laboratoriais relacionados com doença hepática. (continua)

Correlações	miR-							
		106b-5p	126-3p	20a-5p	223-3p	25-3p	1202	5100
Idade, anos	ρ	-0,17	-0,13	-0,13	-0,19*	-0,11	-0,11	-0,16
	Spearman Valor-p	0,06	0,13	0,14	0,02	0,22	0,29	0,06
Creatinina	ρ	-0,14	-0,10	-0,21*	-0,30**	-0,34**	0,14	-0,02
	Spearman Valor-p	0,10	0,26	0,01	<0,001	<0,001	0,17	0,80
Leucometria total	ρ	-0,21*	-0,07	-0,17	-0,02	-0,15	-0,04	-0,07
	Spearman Valor-p	0,01	0,38	0,05	0,80	0,07	0,73	0,45
AST (TGO)	ρ	-0,06	0,05	0,01	-0,04	-0,08	-0,11	0,04
	Spearman Valor-p	0,47	0,53	0,92	0,68	0,33	0,30	0,61
ALT (TGP)	ρ	-0,05	0,04	-0,04	-0,09	-0,05	-0,02	-0,01
	Spearman Valor-p	0,58	0,64	0,62	0,28	0,53	0,84	0,93
Fosfatase alcalina	ρ	-0,01	0,02	0,10	0,06	0,02	-0,07	-0,01
	Spearman Valor-p	0,90	0,84	0,25	0,47	0,82	0,52	0,95
GGT	ρ	-0,13	0,03	-0,04	0,06	-0,03	-0,16	0,01
	Spearman Valor-p	0,14	0,76	0,62	0,52	0,74	0,13	0,87
Bilirrubina Total	ρ	-0,05	-0,03	-0,05	-0,06	-0,11	0,12	0,01
	Spearman Valor-p	0,56	0,74	0,59	0,45	0,20	0,24	0,87
Albumina	ρ	0,06	0,03	0,05	0,05	0,03	0,03	0,07
	Spearman Valor-p	0,52	0,76	0,54	0,53	0,77	0,76	0,45
RNI	ρ	0,06	0,07	0,05	0,06	0,03	0,16	0,04
	Spearman Valor-p	0,52	0,41	0,56	0,49	0,73	0,14	0,61
Sódio	ρ	-0,04	-0,10	-0,05	-0,01	0,02	-0,23*	-0,11
	Spearman Valor-p	0,64	0,25	0,56	0,95	0,86	0,03	0,20
PCR	ρ	-0,08	-0,04	-0,06	0,01	-0,06	0,26*	0,001
	Spearman Valor-p	0,37	0,67	0,51	0,89	0,53	0,02	0,98
Pressão arterial média	ρ	-0,001	-0,09	-0,01	0,06	0,09	0,10	-0,04
	Spearman Valor-p	0,99	0,33	0,87	0,51	0,29	-0,34	0,63
CLIF-SOFA	ρ	-0,08	-0,09	-0,11	-0,19*	-0,19*	0,06	0,01
	Spearman Valor-p	0,37	0,30	0,22	0,03	0,03	0,56	0,89
Pontuação total de Child-Pugh	ρ	-0,05	-0,09	-0,07	-0,13	-0,13	0,10	0,04
	Spearman Valor-p	0,56	0,31	0,45	0,13	0,13	0,34	0,63

Tabela 10. Análise de correlação entre miRNAs e parâmetros laboratoriais relacionados com doença hepática. (continuação)

Correlações	miR-							
	106b-5p	126-3p	20a-5p	223-3p	25-3p	1202	5100	
MELD	ρ Spearman	-0,07	-0,05	-0,09	-0,15	-0,19*	0,22*	0,04
	Valor-p	0,41	0,57	0,30	0,08	0,03	0,03	0,60

PCR. proteína C reativa; **GGT.** γ -glutamil transpeptidase; **RNI.** razão normalizada internacional; **AST.** aspartato aminotransferase; **ALT.** alanina aminotransferase; **ρ Spearman.** coeficiente de correlação de Spearman. **Valor-p.** nível de significância para cada coeficiente de correlação, * $<0,05$ e ** $<0,01$, respectivamente.

6.2.7 Fatores independentemente associados à ACLF

Análise de regressão logística foi realizada para investigar fatores independentemente associados à ACLF, incluindo as seguintes variáveis que apresentaram diferença estatística na análise bivariada: hepatite C como etiologia, Child-Pugh C, sódio, miR-223-3p e miR-25-3p. Variáveis presentes nos modelos Child-Pugh, ACLF e MELD não foram incluídas e a quantificação de proteína C reativa (PCR) foi excluída da análise, pois inúmeros casos estavam sem este dado laboratorial. A Tabela 10 exibe os resultados da regressão logística multivariada com os valores de *Odds ratio* (OD), intervalo de confiança para OD (IC95%) e os valores de significância (Valor-p). Nesta análise, ACLF na admissão foi associada de forma independente a menores valores de sódio (OR 0,82; IC95% 0,74 - 0,91; $p<0,001$), Child-Pugh C (OR 3,48; IC95% 1,34 - 9,01; $p=0,010$), hepatite C (OR 3,69; IC95% 1,35 - 10,04; $p=0,011$) e miR-25-3p (OR 0,99; IC95% 0,99 - 1,00; $p=0,040$). Como observado, das variáveis incluídas na análise, apenas a expressão do miR-223-3p não se relacionou de maneira independente à ACLF.

Tabela 11. Regressão logística múltipla para avaliação dos fatores independentemente associados à ACLF

Variável	Regressão logística múltipla		
	OR	IC 95%	Valor-p
Sódio	0,82	0,74 - 0,91	<0,001***
miR-25-3p	0,99	0,98 - 0,99	0,040*
Child-Pugh C	3,48	1,34 - 9,01	0,010*
Hepatite C	3,69	1,35 - 10,04	0,011*

OR. Odds ratio. **IC.** Intervalo de confiança para **OD.** **Valor-p.** nível de significância *<0,05;***<0,001.

6.2.8 Análise de sobrevida

Neste trabalho também foi realizada análise de sobrevida para verificar o envolvimento da expressão dos miRNAs com a mortalidade em 30 dias dos pacientes. Na Tabela 11 pode ser visualizado os resultados da análise univariada e multivariada de Cox com os valores de *hazard ratio* (HR), IC95% e valores de p. A análise univariada de Cox mostrou que somente os miRNAs miR-223-3p (HR 0,99; IC95% 0,98 – 0,99; p=0,030) e miR-25-3p (HR 0,99; IC95% 0,98 – 0,99; p=0,013) foram associados à menor sobrevida em 30 dias. Os demais miRNAs estudados não foram associados ao prognóstico, bem como a presença de ACLF. Na regressão múltipla de Cox foram incluídas as variáveis idade, ACLF, Child-Pugh C, miR-223-3p e miR-25-3p. O escore MELD não foi incluído pelo fato de suas variáveis estarem presentes na pontuação de Child-Pugh e ACLF. Na análise multivariada, mortalidade em 30 dias foi associada de forma independente à presença de ACLF (HR 2,69; IC95% 1,25 – 5,80; p= 0,012), Child-Pugh C (HR 2,92; IC95% 1,28 – 6,66; p= 0,011) e menor expressão do miR-25-3p (HR 0,99; IC95% 0,99 – 1,00; p= 0,044) (Tabela 11).

A área sob a curva ROC (AUROC) do miR-25-3p, para prever a mortalidade em 30 dias, foi de $0,657 \pm 0,052$ (AUROC \pm erro padrão) (Figura 16). A partir da curva ROC foram escolhidos pontos de corte da expressão do miRNA para melhor prever a mortalidade. O melhor desempenho para expressão do miR-25-3p foi observado com um ponto de corte de 50 (expressão relativa do miR-25-3p menor, maior ou igual a

50). A sobrevida foi significativamente menor em pacientes com expressão relativa do miR-25-3p <50 (25,1 dias; IC95% 23,2 – 27,0) em relação aos que apresentaram expressão relativa do miR-25-3p ≥ 50 (28,9 dias; IC95% 27,7 – 30,0; $p=0,012$; Figura 17).

Tabela 12. Influência de variáveis selecionadas na sobrevida dos pacientes (Regressão de Cox)

Variável	Análise univariada			Análise multivariada		
	HR	IC 95%	Valor-p	HR	IC 95%	Valor-p
miR-106b-5p	0,98	0,95 – 1,00	0,051			
miR-126-3p	0,98	0,95 – 1,02	0,279			
miR-20a-5p	0,99	0,99 – 1,00	0,052			
miR-223-3p	0,99	0,98 – 0,99	0,030*			
miR-25-3p	0,99	0,98 – 0,99	0,013*	0,99	0,98 – 0,99	0,044*
miR-1202	1,00	0,96 – 1,05	0,978			
miR-5100	1,01	0,97 – 1,07	0,399			
Child-Pugh C	3,99	1,83 – 8,72	0,001**	2,92	1,28 – 6,66	0,011*
ACLF	4,78	2,35 – 9,73	<0,001***	2,69	1,25 – 5,80	0,012*

HR. hazard ratio. **IC.** intervalo de confiança. **Valor-p.** nível de significância.
 * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$

Figura 16. Curva ROC (Receive Operator Curve) do miR-25-3p

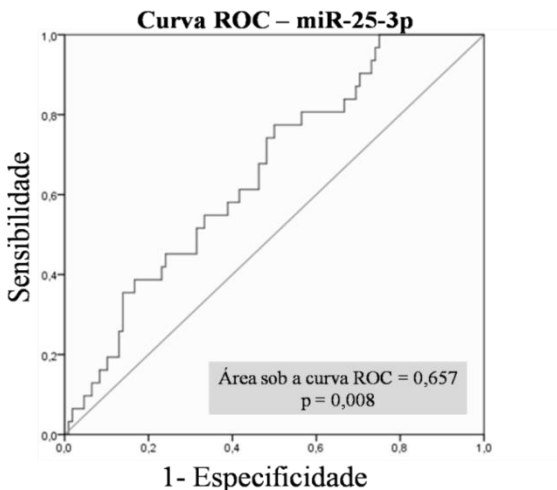
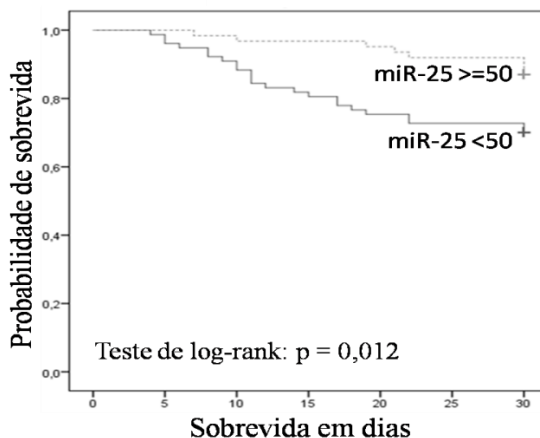


Figura 17. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para análise da relação da expressão relativa do miR-25-3p com a sobrevida dos pacientes.



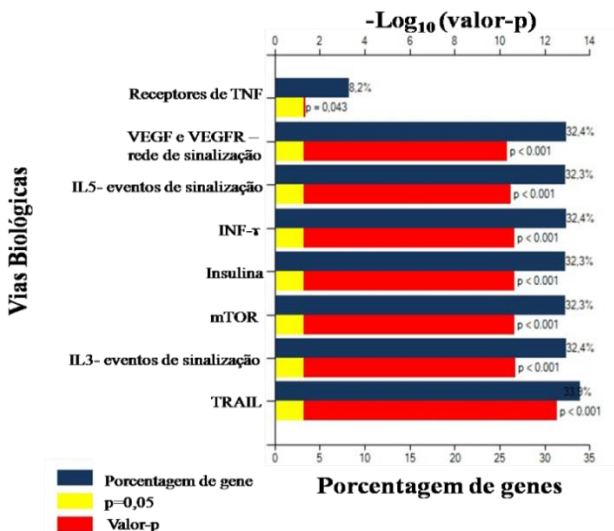
Foi utilizado o teste de log-rank para comparação da sobrevida entre os grupos: expressão relativa do miR-25-3p $<$ 50 (linha contínua inferior) e expressão relativa do miR-25-3p \geq 50 (linha tracejada superior). No período de 10 dias de acompanhamento o HR entre o grupo de pacientes com expressão relativa do miR-25-3p $<$ 50 e aqueles com expressão \geq 50 ($HR_{10} = \text{grupo miR-25-3p} < 50 / \text{grupo miR-25-3p} \geq 50$) foi de aproximadamente 0,92. No período de 25 dias de acompanhamento o HR entre o grupo de pacientes com expressão relativa do miR-25-3p $<$ 50 e aqueles com expressão \geq 50 ($HR_{25} = \text{grupo miR-25-3p} < 50 / \text{grupo miR-25-3p} \geq 50$) foi de aproximadamente 0,78; demonstrando que o grupo de pacientes com expressão do miRNA $<$ 50 apresentaram menor sobrevida.

6.3 PREDIÇÃO DE ALVOS DO miR-25-3p

Para determinar os possíveis genes alvos do miR-25-3p foi utilizado o programa computacional StarBase versão 2.0 (LI *et al.*, 2014). Este programa compila os dados de interação miRNA-RNA a partir de cinco programas de predição: TargetScan, PicTar, PITA, miRanda e RNA22. Os resultados mostraram 1873 alvos preditos para o miR-25-3p. Entre os genes alvos, alguns estavam relacionados com inflamação, tais como, molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1 ou CADM1); quimiocina 5 C-X-C (CXCL5); fator 3 associado ao receptor

de TNF (TRAF3); interleucina 8 (IL8); transdutor de sinal da interleucina 6 (IL6ST); receptor D da interleucina 17 (IL17RD) e intercelucina 15 (IL15). Após a predição de alvos, foi realizada análise de enriquecimento das vias biológicas referentes aos genes alvos do miR-25-3p no programa FunRich (versão 3.1.3). A Figura 18 exibe algumas vias significantes dentro da lista dos genes relacionados com o miR-25-3p. Entre os 1873 genes, 32,4% estão envolvidos com a rede de sinalização do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o receptor do VEGF (VEGFR); 32,3 e 32,4 % com eventos de sinalização envolvendo a interleucina 5 (IL5) e 3 (IL3), respectivamente; 32,4% com interferon gama (INF- γ); 33,9% com o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e 8,2% com os receptores do fator de necrose tumoral (TNF).

Figura 18. Análise de enriquecimento das vias biológicas referentes aos genes alvos do miR-25-3p.



TNF. fator de necrose tumoral, **VEGF.** fator de crescimento vascular endotelial, **VEGFR.** receptor do VEGF; **IL5.** interleucina 5; **INF- γ .** interferon gama; **mTOR.** alvo mecanicista da rapamicina; **IL3.** interleucina 3; **TRAIL.** ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral.

7 RESUMO DOS RESULTADOS

Pela técnica de microarranjo os miRNAs let-7a-5p; let-7g-5p; miR-106b-5p; miR-107; miR-126-3p; miR-17-5p; miR-20a-5p; miR-25-5p e miR-451a apresentaram valores de FC maiores ou iguais a 10 na comparação de pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF. Quando a expressão dos miRNAs foi comparada entre os pacientes que foram a óbito em 30 dias e os sobreviventes os seguintes miRNAs apresentaram valores de FC maiores ou iguais a 10: let-7a-5p let-7g-5p; miR-106b-5p; miR-126-3p; miR-17-5p; miR-199a-3p; miR-20a-5p; miR-223-3p; miR-25-3p e miR-575.

Na etapa de validação dos dados por RT-qPCR foi possível identificar que os seguintes miRNAs apresentaram diferenças significativas entre as comparações avaliadas:

miR-25-3p

- Diferenciou pacientes com ACLF dos sem ACLF;
- Diferenciou pacientes que foram a óbito em 30 dias dos sobreviventes;
- Correlacionou-se negativamente com o escore MELD, CLIF-SOFA e valores de creatinina;
- A baixa expressão foi associada de maneira independente à ACLF e a mortalidade em 30 dias.

miR-223-3p

- Diferenciou pacientes com ACLF dos sem ACLF;
- Diferenciou pacientes que foram a óbito em 30 dias dos sobreviventes;
- Correlacionou-se negativamente com a pontuação CLIF-SOFA e valores de creatinina;
- A baixa expressão foi associada à presença ACLF e a mortalidade em 30 dias.

miR-20a-5p

- diferenciou pacientes que foram a óbito na internação e correlacionou-se negativamente com os valores de creatinina no soro;

miR-1202

- correlacionou-se positivamente com MELD e PCR e negativamente com sódio;

miR-106b-5p

- correlacionou-se negativamente com valores de leucometria total;

8 DISCUSSÃO

ACLF pode ser definida como uma complicação da cirrose, caracterizada pelo aumento de falências orgânicas e alta mortalidade em curto prazo. A definição de ACLF foi proposta somente em 2013 e 2014 pelos consórcios EASL-CLIF (*European Association for the Study of the Liver Chronic Liver Failure Consortium*) (MOREAU *et al.*, 2013) e pelo NACSELD (*North American Consortium for the Study of End-Stage Liver Disease*) (BAJAJ *et al.*, 2014). A ausência de uma definição, antes deste período, limitou o uso da aplicação clínica e pesquisas relacionadas ao termo ACLF. Mesmo após a definição de ACLF pelos consórcios ainda há necessidade da caracterização de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para melhor elucidação dos fatores que predispõe ACLF e a mortalidade em curto período. Além disso, a identificação precoce dos pacientes com alto risco de morte pode facilitar a decisão médica por tratamentos ou acompanhamento mais específicos. Neste trabalho, os miRNAs foram escolhidos para serem estudados como possíveis biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de ACLF pelo fato de circularem nos fluídos biológicos de maneira estável, pela expressão diferenciada dependendo do estado clínico dos pacientes e por serem identificados por metodologias relativamente simples como a RT-qPCR com especificidade e sensibilidade alta.

No presente trabalho, ACLF foi definida conforme critérios do consórcio EASL-CLIF, pois o consórcio norte americano (NACSELD) considerou somente os pacientes com cirrose e com alguma infecção

limitando o uso para os pacientes não infectados. Ainda, a definição de ACLF, proposta por EASL-CLIF, foi validada no ano de 2015 em 192 pacientes com cirrose, com descompensação aguda da doença, hospitalizados no HU-UFSC (SILVA *et al.*, 2015). A prevalência de pacientes ACLF no presente estudo foi de 25,2% (n=35) e entre estes 48,6% (n=17) foram a óbito em 30 dias. A prevalência de ACLF foi similar ao encontrado no estudo *CANONIC* do consócio EASL-CLIF (22,6%), porém a mortalidade em 30 dias (33,9%) foi superior. Silva e colaboradores (2015) também observaram uma quantidade maior de pacientes que foram a óbito em 30 dias e justificaram que, assim como neste estudo, foram incluídos pacientes recentemente hospitalizados e que muitos pacientes demoram a conseguir atendimento médico na região do estudo, o que poderia culminar em um diagnóstico e tratamento tardio aumentando a mortalidade em 30 dias.

Os resultados aqui obtidos são de extrema importância, pois até o momento, não foram publicados trabalhos envolvendo a identificação de miRNAs em pacientes ACLF. Os estudos já publicados envolvem somente pacientes ACLF com carga viral positiva para o vírus da hepatite B (HBV), chamados de ACLF-HBV. Estes estudos são de pesquisadores Asiáticos, em que a principal causa que leva a cirrose é a infecção pelo HBV. E como comentado, as causas que levaram os pacientes do presente estudo à cirrose foram principalmente o consumo de álcool (50,4%) e a infecção pelo vírus da hepatite C (37,4%). Sendo assim, na primeira etapa do trabalho, optou-se pela identificação dos miRNAs utilizando a tecnologia de microarranjo, a qual possibilita a avaliação simultânea da expressão de inúmeros miRNAs. Foi possível identificar 52 miRNAs alterados em pacientes com ACLF em relação aos sem ACLF e 64 miRNAs com expressão diferenciada nos pacientes que foram a óbito em 30 dias em relação aos sobreviventes ($p < 0,05$ e $FC \geq 4$). Entre estes, 8 miRNAs (miR-106b-5p; miR-126-3p; miR-20a-5p; miR-223-3p; miR-25-3p; miR-451a; miR-1202 e miR-5100) foram selecionados para validação por RT-qPCR.

A seleção dos miRNAs para validação foi realizada baseada nos resultados obtidos na análise de microarranjo, pela observação dos miRNAs detectados nas amostras e por dados relatados na literatura.

Neste trabalho, apenas 5 amostras (5/47 amostras) amplificaram para o miR-451a, assim, este miRNA não foi incluído nas análises posteriores. Devido a baixa concentração de RNA no soro, alguns trabalhos utilizaram o método de pré-amplificação, para avaliar a expressão de miRNAs (GUI *et al.*, 2011; RODERBURG *et al.*, 2012). Sendo assim, para avaliação da expressão do miR-451a nas amostras de soro do presente estudo há possibilidade da utilização da pré-amplificação antes da realização da qPCR. No entanto, em outro trabalho, sem a utilização de pré-amplificação, a expressão do miR-451a já foi detectada no plasma de pacientes com cirrose. Jin e colaboradores (2015), mostraram que os miRNAs miR-451a e miR-106b-5p foram detectados com baixa expressão no plasma de pacientes com cirrose hepática (n=100) em relação aos com hepatite B crônica (n=100) ($p < 0,0001$). Ainda, foi observada uma baixa expressão do miR-106b-5p nos pacientes com cirrose e com Child-Pugh B/C (n=47) em relação aos com Child-Pugh A (n=53) ($p < 0,05$). Diferente do trabalho de Jin *et al.* (2015), aqui a expressão do miR-106b-5p não diferenciou os pacientes Child-Pugh C ($p = 0,615$). Foi demonstrado neste trabalho que a expressão do miR-20a estava baixa nos pacientes que foram a óbito na internação, no entanto, a baixa expressão não se manteve de maneira significativa nos pacientes que foram a óbito em 30 dias. Na literatura já foi demonstrado que a superexpressão do miR-20a em células T CD4⁺ resultou na diminuição das citocinas IL2, IL6 e IL8 e inibiu a secreção de IL10 (REDDYCHERLA *et al.*, 2015). E outro trabalho mostrou expressão aumentada do miR-20a no plasma de pacientes com infecção crônica e aguda de HCV quando comparados com indivíduos sem a doença (SHRIVASTAVA *et al.*, 2013). Neste trabalho, a expressão do miR-126-3p não foi detectada de maneira diferente nos grupos e parâmetros analisados. Por outro lado, Chen *et al.* (2018) detectaram baixa expressão do miR-126-3p em pacientes com sepse em relação aos controles saudáveis. A baixa expressão no soro correlacionou-se com a gravidade dos pacientes com sepse. Além disso, a expressão do miR-126-3p foi correlacionada com marcadores de inflamação (PCR, procalcitonina), disfunção renal (ureia no sangue) e hepática (bilirrubina total) (CHEN *et al.* 2018).

Neste estudo, na etapa de validação dos resultados apenas o miR-223-3p e o miR-25-3p estavam com baixa expressão nos pacientes ACLF e naqueles que foram a óbito em 30 dias. O motivo para os outros miRNAs não estarem alterados pode ser devido ao aumento significativo do tamanho amostral na etapa de validação e pela técnica de RT-qPCR ser mais sensível do que a técnica de microarranjo. Outro estudo também comentou que o baixo número de casos na etapa de triagem de miRNAs pode gerar resultados que não são observados na etapa de validação (WANG, H. *et al.*, 2012). Além disso, conforme discutido no trabalho de Mestdagh e colaboradores (2014) em que foram comparadas 12 plataformas comerciais para detecção de miRNAs, as técnicas de qPCR foram as mais sensíveis em relação as metodologias de sequenciamento e hibridização (microarranjo). O miR-223-3p e o miR-25-3p também foram capazes de diferenciar os pacientes com encefalopatia na admissão. Além disso, o miR-223-3p e o miR-25-3p estavam com expressão mais baixa nos pacientes que foram a óbito durante a internação. Conforme observado no estudo de Wasmuth e colaboradores (2005) pacientes ACLF e com sepse severa mostram um grau similar de depressão imunológica celular. Assim, a função celular imune deficiente nos indivíduos ACLF contribui para o aumento da mortalidade dos pacientes. Interessante que a baixa expressão do miR-25-3p e do miR-223-3p já foi demonstrada em pacientes com sepse e relacionada com o prognóstico. Wang et al. (2012) avaliaram a expressão de miRNAs em 214 amostras de soro de pacientes com sepse (117 sobreviventes e 97 pacientes que foram a óbito em 28 dias). Seis miRNAs estavam com a expressão alterada nos pacientes que foram a óbito, entre eles o miR-223 ($p < 0,001$). A sensibilidade e especificidade para distinguir pacientes que sobreviveram daqueles que foram a óbito em 28 dias do miR-223-3p foi similar ao escore SOFA (avaliação da falha multiorgânica sequencial), com valores de área sob a curva ROC (AUROC) de 0,748 e 0,782, respectivamente. Li e colaboradores (2017) observaram que a deleção do miR-223-3p em camundongos alimentados cronicamente com etanol aumentou a infiltração hepática de neutrófilos, a produção de espécies reativas de oxigênio e o dano hepático. Em neutrófilos isolados de indivíduos alcoólicos a expressão

do miR-223-3p estava mais baixa enquanto que a concentração da interleucina 6 (IL6) estava mais alta quando comparado com amostras de indivíduos saudáveis. Já no estudo de Yao et al. (2015), a baixa expressão do miR-25-3p foi relacionada com a mortalidade em 28 dias de pacientes com sepse. Conforme a gravidade dos pacientes (sepse, sepse severa e choque séptico) a expressão do miR-25-3p estava mais reduzida. Ainda, a baixa expressão foi correlacionada negativamente com o escore SOFA, PCR e procalcitonina (PCT). Por fim, a curva ROC mostrou que a acurácia clínica do miR-25 para diagnóstico de sepse foi melhor que PCR e PCT (AUROC = 0,806, 0,676, 0,726, respectivamente). Em outro estudo, foi demonstrado que a expressão do miR-25 estava reduzida no soro e em células musculares cardíacas de camundongos com sepse enquanto que IL6 e TNF- α estavam aumentados. Os autores observaram que a superexpressão do miR-25 aumentou a taxa de sobrevivência, diminuiu a apoptose das células musculares cardíacas e reduziu IL6 e TNF- α . Foi concluído que o miR-25 poderia amenizar as lesões miocárdicas causadas por sepse por meio da inibição da reação inflamatória (YAO *et al.*, 2018).

Neste trabalho, a expressão do miR-223-3p e do miR-25-3p foi correlacionada negativamente com a pontuação CLIF-SOFA e valores de creatinina, ou seja, com a diminuição da expressão dos miRNAs espera-se um aumento destes parâmetros. A correlação dos miRNAs com a creatinina pode ser justificada pelo fato da maioria dos pacientes ACLF apresentarem aumento de creatinina no soro. Lembrando que estes miRNAs diferenciaram de maneira significativa pacientes com ACLF dos sem ACLF. Disfunção (valores de creatinina no soro entre 1,5 a 1,9 mg/dL) ou falência renal (creatinina no soro \geq 2 mg/dL) são comumente presente em pacientes ACLF (MAIWALL *et al.*, 2016). Neste trabalho este dado não foi diferente, entre os pacientes ACLF, 68,6% estavam com falência renal (dados não apresentados nos resultados). A correlação negativa destes miRNAs com CLIF-SOFA é interessante pois esta pontuação é utilizada para definir falência orgânica em pacientes ACLF. Com a diminuição da expressão destes miRNAs espera-se observar um aumento da pontuação CLIF-SOFA, ou seja, um aumento da falência orgânica nos pacientes e

consequentemente uma diminuição da sobrevida. Neste estudo, não foi encontrada uma explicação para o miR-1202 estar correlacionado positivamente com PCR e escore MELD e negativamente com sódio. Valores de PCR e MELD estavam mais altos e sódio mais baixo nos pacientes ACLF, no entanto, a expressão deste miRNA não foi significativamente diferente entre os pacientes ACLF e naqueles que foram a óbito.

Ainda, no presente trabalho, ACLF na admissão foi associada de forma independente a menor expressão do miR-25-3p. A regressão univariada de Cox mostrou que os miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p foram associados à menor sobrevida em 30 dias. Enquanto que na regressão múltipla de Cox a mortalidade em 30 dias foi associada de forma independente à menor expressão de miR-25-3p. Estes resultados mostram que o miR-25-3p pode servir como um biomarcador prognóstico para pacientes ACLF.

A análise computacional de predição de alvos identificou que o miR-25-3p pode controlar a expressão de genes envolvidos em vias relacionadas com processos inflamatórios. Como exemplo, o miR-25-3p pode ligar-se no RNAm de ICAM-1, IL6ST (interleucina-6 transdutora de sinal), IL15 e controlar a tradução das respectivas proteína. Além disso, foi observado que os genes preditos do miR-25 estão envolvidos com vias relacionadas à inflamação tais como a rede de sinalização para VEGF, receptores para o TNF, vias para mTOR e TRAIL. Um estudo publicado em 2016 avaliou a presença de diferentes citocinas em pacientes ACLF em relação aos sem ACLF. Nos pacientes ACLF, 12 citocinas estavam alteradas, entre elas: VCAM-1, VEGF-A, Fractalkina, MIP-1 α , eotaxina, IP-10, RANTES, GM-CSF, IL-1 β , IL-2, ICAM-1, e MCP-1. Além disso, VCAM-1 (p=0,001), ICAM-1 (p=0,001), MIP-1 α (0,028) e IP-10 estavam significativamente aumentadas nos pacientes que foram a óbito em 90 dias (SOLE *et al.*, 2016). Como mencionado, nos pacientes ACLF e naqueles que foram a óbito em 30 dias foi observado uma redução da expressão do miR-25 e como consequência pode estar ocorrendo uma desregulação da tradução de algumas citocinas, tais como, IL6ST e ICAM-1 além de outras relacionadas com o processo inflamatório. O aumento de IL6ST ainda não foi descrito em

pacientes ACLF, somente foi verificado por Fischer e colaboradores (2017) o aumento da interleucina IL6 nos pacientes ACLF ($p=0,039$) e nos pacientes ACLF com infecção ($p<0,001$) em relação aos pacientes sem ACLF. No entanto, a IL6 utiliza a IL6ST, também conhecida como gp130, nos complexos de sinalização. A IL6 liga-se ao receptor e em seguida ocorre a dimerização de IL6ST, o qual pode iniciar uma cascata de sinalização, ativando Janus-cinases (JAK) e fatores de transcrição da família STAT (HEINRICH *et al.*, 1998). Baseados nos resultados aqui demonstrados, concluímos que a baixa expressão dos miR-25 pode estar influenciando no estado inflamatório dos pacientes ACLF. O miR-25 pode funcionar como um regulador da resposta imune, no entanto, há necessidade de mais estudos para comprovar este efeito. Até o momento, pode-se concluir que a baixa expressão deste miRNA (expressão relativa <50) indica um mau prognóstico para os pacientes ACLF.

Algumas limitações do presente estudo merecem ser comentadas. O custo para realização dos experimentos é elevado, o que limitou o número de casos incluídos na etapa de avaliação do perfil de miRNA por microarranjo. O conjunto para detecção da RT-qPCR utiliza um iniciador reverso universal e isso diminui a especificidade para detecção do miRNA de interesse. Este fato restringiu a escolha dos miRNAs para validação pois muitos apresentam nucleotídeos idênticos na porção 3'. Além disso, alguns miRNAs não foram selecionados para validação pois quando foi utilizada a técnica de microarranjo muitos miRNAs que apresentaram altos valores de FC e baixos valores de p entre os grupos estavam como “não detectados” na maioria das amostras. A não detecção no microarranjo poderia resultar em uma amplificação tardia na RT-qPCR limitando a quantificação do miRNA.

9 CONCLUSÃO

Em pacientes hospitalizados por descompensação aguda da cirrose, as expressões dos miRNAs miR-223-3p e miR-25-3p associaram-se à presença de ACLF e ao prognóstico. Destes, o miR-25-3p relacionou-se de forma independente à ACLF na admissão e evolução para óbito em 30 dias. Esses resultados sugerem que o miR-25-3p apresenta potencial como biomarcador prognóstico em portadores de cirrose admitidos por complicações da doença.

CAPÍTULO 2 – EXPERIMENTAÇÃO MOLECULAR PARA
ENTENDIMENTO DA FUNÇÃO DOS miRNAs: VALIDAÇÃO DE
UM ALVO PREDITO DO miR-20a PELO ENSAIO DA
LUCIFERASE

10 OBJETIVO PRINCIPAL DO CAPÍTULO 2

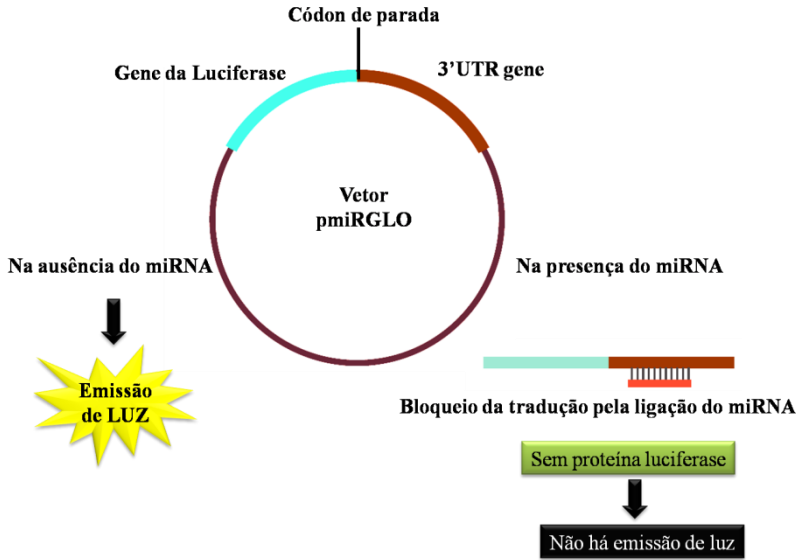
Validar a predição computacional de um alvo do miR-20a pelo ensaio da Luciferase.

11 INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO 2

Para exercer as respectivas funções, os miRNAs são incorporados a um complexo de riboproteínas, chamado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Via RISC, os miRNAs medeiam dois modos principais de silenciamento gênico: inibição da tradução ou clivagem do RNAm. No entanto, em animais, usualmente ocorre hibridização de bases imperfeitas entre o miRNA e o RNAm, causando a inibição da tradução (AMERES e ZAMORE, 2013). O grande número de miRNAs conhecidos, bem como os diferentes modos de reconhecimento de alvos, resultam em uma grande quantidade de genes preditos para serem reprimidos por miRNAs. Estima-se que mais que 60% dos genes codificadores de proteínas em humanos são alvos conservados de miRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Como comentado no Capítulo 1, a compreensão da função dos miRNAs depende muito da identificação dos respectivos alvos, que pode ser feita pela predição computacional de alvos ou pela experimentação molecular. Entre as metodologias de experimentação o ensaio da Luciferase bioluminescente, comumente utilizado como repórter para avaliar a atividade transcricional, foi adaptado para o estudo da função de miRNAs e tornou-se um método recomendado entre os pesquisadores (ANKASHA *et al.*, 2018). Neste ensaio, a região 3'UTR do gene predito pode ser clonada ao lado (*downstream*) do gene codificador da Luciferase (*Firefly luciferase*). Assim, com a cotransfecção deste plasmídeo junto ao miRNA espera-se obter uma redução do sinal luminescente, evidenciando que o miRNA interagiu com a 3'UTR do gene predito interrompendo a tradução da proteína luciferase (JIN *et al.*, 2013). A Figura 19 exibe de forma esquemática como este processo ocorre.

Figura 19. Mecanismo de ação do ensaio da Luciferase.



Fonte: Promega, 2018.

O ensaio da Luciferase bioluminescente permite avaliar de forma moderadamente rápida se um determinado alvo é realmente regulado por um miRNA. Porém, este método permite baixa escalabilidade, desta forma, torna-se inviável testar inúmeros alvos preditos através deste sistema. Outro método que pode ser utilizado é a superexpressão do miRNA seguido de análise por DNA em microarranjo. Com a superexpressão de um miRNA espera-se uma repressão de seus alvos nas células ou tecidos analisados. Assim, os genes reprimidos no microarranjo são selecionados como candidatos a alvo. Para redução de falsos-positivos pode-se utilizar miRNAs mutados, sequências de miRNAs alteradas em regiões importantes do processo de clivagem. Assim, os genes reprimidos nestes controles podem ser retirados da análise. Mesmo assim, a quantidade de possíveis alvos pode ser ainda muito alta (PEREIRA, 2015).

Quando a expressão de um miRNA é reduzida (*downregulated*), teoricamente, a expressão do gene predito está regulada positivamente

(*upregulated*), e vice e versa. Portanto, a funcionalidade inversa entre o miRNA e o RNAm pode ser validada por diferentes métodos. O miRNA pode ser transfectado e em seguida pode-se avaliar a expressão do gene predito por RT-qPCR. Se o RNAm foi alvo de um miRNA, a quantidade de proteína também pode ser alterada. Da mesma maneira, o miRNA pode ser transfectado e a quantidade de proteínas pode ser avaliada por Western blot, ELISA ou imunocitoquímica. Uma vez que a interação é confirmada experimentalmente, a regulação das vias de sinalização pode ser demonstrada (ANKASHA *et al.*, 2018). Por exemplo, no trabalho de Yao e colaboradores (2009) foi demonstrado que a expressão do miRNA-21 estava aumentada na linhagem humana de carcinoma cervical (HeLa). Para determinação da função biológica do miR-21, o anti-miR-21 (inibidor do miR-21) foi transfectado na linhagem HeLa. Foi demonstrado que a inibição do miR-21 reduziu a proliferação celular, a formação de colônias e aumentou a concentração da proteína PDCD4 (supressora tumoral). Foi verificado pelo ensaio da Luciferase que a PDCD4 é alvo do miR-21, portanto, foi sugerido que a expressão aumentada do miR-21 neste tipo de câncer pode estar contribuindo para diminuição da proteína PDCD4, favorecendo a proliferação das células tumorais. Em outro estudo foi verificado que a expressão do miR-26a é baixa em linhagens celulares de melanoma humano. Sendo assim, este miRNA foi transfectado nas linhagens de melanoma sendo verificado redução da viabilidade celular. Além disso, a superexpressão inibiu a migração, invasão e aumentou a apoptose nestas células. Os autores mostraram que MITF (fator de transcrição de microftalmia) é alvo do miR-26a, ou seja, a baixa expressão deste miRNA favoreceu o aumento da expressão de MITF. E sabe-se que MITF tem um papel importante no desenvolvimento do melanoma, pois ativa a proliferação celular dos melanócitos e estimula a expressão de genes antiapoptóticos (QIAN *et al.*, 2017).

A validação molecular de alvos é essencial para explorar o grande impacto da interação miRNA-RNAm envolvido nos processos biológicos. Inúmeras ferramentas de predição de alvos estão disponíveis, porém, uma pequena porção de interações tem sido validada. Embora existam limitações de alguns métodos moleculares, a

validação dos alvos biologicamente relevantes, pode auxiliar na compreensão de determinadas patologias e auxiliar futuramente no desenvolvimento de medicamentos baseados em miRNA (ANKASHA *et al.*, 2018). Sendo assim, neste capítulo serão demonstrados os resultados obtidos da validação de um alvo predito do miR-20a-5p. A escolha deste miRNA foi baseada nos resultados obtidos no Capítulo 1 deste trabalho. Na análise por microarranjo foi observado baixa expressão deste miRNA nos pacientes com ACLF em relação aos pacientes sem ACLF. No entanto, a expressão deste miRNA não foi confirmada por RT-qPCR. A escolha do miR-20a-5p para experimentação molecular foi realizada antes da validação dos dados de microarranjo. O alvo predito selecionado foi a quimicina pro-inflamatória CCL1 (quimiocina C-C-Motif ligante 1), também conhecida como I-309. Foi pensado que a expressão reduzida do miR-20a em pacientes ACLF poderia influenciar no aumento de algumas citocinas, como a CCL1, favorecendo o processo inflamatório nos pacientes. No entanto, apesar de não ter sido comprovada a diminuição do miR-20a nestes indivíduos por RT-qPCR os resultados obtidos no Capítulo 2 deste trabalho podem contribuir com outras situações fisiológicas relacionadas com inflamação em que o miR-20a está diminuído ou a CCL1 aumentada.

12 MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 PREDIÇÃO DE ALVOS DO mir-20a-5p

A predição de alvos do miR-20a-5p foi realizada nos programas Targetscan (www.targetscan.org), PITA (https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html) e Diana-microT_CDS (www.microrna.gr/microT-CDS).

12.2 CLONAGEM

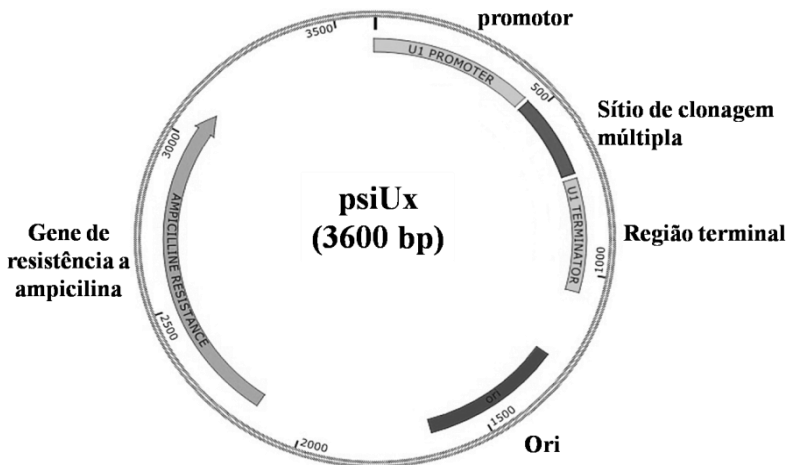
Para validação da interação do miR-20a-5p com o gene CCL1 primeiramente foram realizadas as etapas de clonagem. O precursor do miR-20a, o pre-miR-20a, foi clonado no vetor psiUx (Figura 20). Este vetor de superexpressão foi desenvolvido pela professora Michela Alessandra Denti (DENTI *et al.*, 2004) e estava disponível em seu laboratório. O vetor psiUx contém tanto o promotor como o terminador do pequeno RNA nuclear humano U1 (snRNA U1), que é altamente transcrito pela RNA Polimerase II em células eucarióticas. O promotor e o terminador são separados por um sítio de clonagem múltipla contendo os locais de reconhecimento para as enzimas de restrição, incluindo a BglIII e XhoI. Este plasmídeo também contém a região de início da replicação (Ori) e o gene que confere resistência a ampicilina.

A região 3'UTR do gene CCL1 foi clonada no plasmídeo pmirGLO (Promega, Wisconsin, EUA). O vetor pmirGLO (Figura 21) é projetado para avaliar a atividade de miRNAs pela inserção da região 3'UTR do gene de interesse na extremidade 3' do gene da luciferase (luc2). O vetor é baseado na tecnologia *dual luciferase* da empresa Promega, com a luciferase bioluminescente usada como o principal repórter e Renilla luciferase atuando como repórter de controle para normalização. Este vetor contém:

- O promotor universal não viral fosfoglicerato cinase (PGK) que funciona em linhagens celulares humanas, de leveduras e de ratos;
- O gene repórter da luciferase bioluminescente (luc2) que relata inversamente a atividade dos miRNAs;

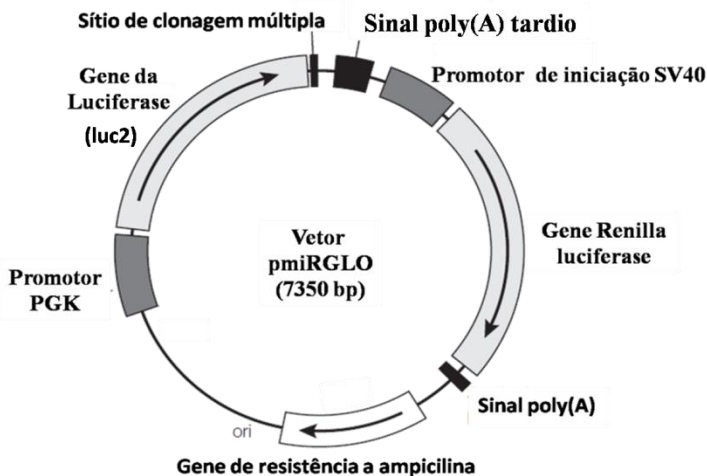
- O sítio de clonagem múltipla que está localizado a 3' do gene repórter da luciferase;
- O gene Renilla luciferase que é utilizado como um repórter de controle para normalização dos dados;
- O gene de resistência à ampicilina que permite a seleção bacteriana para amplificação de vetores;
- A sequência do sinal poli (A) tardia do SV40 que está posicionada próximo de luc2 para fornecer uma terminação eficiente da transcrição e poliadenilação do RNAm;
- Sítio de parada/transcrição de poli (A).

Figura 20. Vetor psiUx para inserção do pre-miR-20a



Fonte: DENTI, *et al.* 2004

Figura 21. Vetor pmirGLO para inserção da região 3'UTR de CCL1



Fonte: PROMEGA, 2018

12.2.1 Amplificação dos insertos pre-miR-20a e CCL1 3'UTR

Para amplificação dos insertos (pre-miR-20a e CCL1 3'UTR) foram utilizados iniciadores com locais de clivagem para as enzimas de restrição BglII, XhoI e SalI conforme descrito no Quadro 4. A PCR foi realizada utilizando DNA genômico (Human Genomic DNA, G152A, Promega, Wisconsin, EUA) e a enzima DNA polimerase Phusion® High-Fidelity (M05305, New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Os reagentes e concentrações utilizadas para reação estão descritos no Quadro 5. Enquanto que o protocolo para amplificação está demonstrado no Quadro 6. Foram utilizadas diferentes temperaturas de anelamento para verificar a melhor amplificação. Os produtos de PCR foram corridos em eletroforese de gel de agarose 1,5% conforme descrito na seção 13.2.2.

12.2.2 Preparo dos géis de agarose

Os géis (1,5%), utilizados neste trabalho, foram preparados com tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X e 2 μ l de intercalante de DNA (Atlas Clear Sight DNA stain, Bioatlas LTD, Tartu, Estônia). Cada poço do gel foi preenchido com 3 μ L de amostra, 7 μ L de água e 2 μ L de corante de carregamento (6x DNA loading Dye, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). A eletroforese ocorreu durante 30-40 min a 90 mA. Os resultados foram visualizados no equipamento ChemiDoc (BIO-RAD, Califórnia, EUA) utilizando um comprimento de onda de 260 nm. Foram utilizados padrão de tamanho molecular de 100 pb ou de 1000 pb (New England Biolabs, Massachusetts, EUA).

Quadro 4. Iniciadores utilizados para amplificação do inserto

Nome	Sequência (5'->3')	Locais de clivagem para as enzimas de restrição
Senso hsa-miR-20a	ACTGAGATCTATGCA AAACTGATGGTGGCC	BglII (AGATCT)
Antisenso hsa-miR-20a	ACTGCTCGAGAACAC AGCATTGCAACCGAT	XhoI (CTCGAG)
Senso CCL1	ACTGCTCGAGGCAGA TTTCTTTCCATTGTG	XhoI (CTCGAG)
Antisenso CCL1	AAATGTCGACCACCT CTCAATGCCAATC	SalI (GTCGAC)

Quadro 5. Componentes utilizados para amplificação do inserto

Componentes	Reação com 25 μ L (μ L)
Tampão 5x Phusion	5
10 mM dNTPs	0,5
10 μ M iniciador senso	1,25
10 μ M iniciador antisenso	1,25
Enzima DNA polimerase <i>Phusion</i>	0,25
DNA genômico 100 ng	1
Água	15,75

Quadro 6. Condições para PCR convencional

Passos	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Ciclo
Desnaturação inicial	98	30	1
Desnaturação	98	10	30
Anelamento	70; 68; 66; 62 ou 60 (pre-miR-20a) 68; 66 ou 64 (CCL1 3'UTR)	30	30
Extensão	72	15	30
Extensão final	72	420	1

12.2.3 Purificação dos produtos da PCR e digestão com as enzimas de restrição

Para um melhor desempenho das enzimas de restrição primeiramente os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit PCR purification QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme descrito nas instruções do fabricante. Este protocolo baseia-se no uso de colunas de troca iônica capazes de ligar o DNA. São realizadas etapas de lavagem e em seguida eluição do DNA em água. A digestão do pre-miR-20a foi realizada com as enzimas BglII e XhoI enquanto que o gene CCL13'UTR foi digerido com XhoI e SalI (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Os reagentes e concentrações utilizadas na digestão estão descritos no Quadro 7. A reação foi mantida por 90 min a 37°C seguido de inativação de 20 min a 65°C.

Quadro 7. Reagentes para digestão com as enzimas de restrição

Reagentes	Volume (µL)
Produto da PCR (1500 ng)	30
Enzima 1 (20.000 U/mL)	0,8
Enzima 2 (20.000 U/mL)	0,8
Tampão Cutsmart® (XhoI e SalI) ou NEBuffer™ 3.1 (BglII e XhoI) (New England Biolabs)	4
Água	4,4

12.2.4 Preparação dos vetores psiUx e pmirGLO

Os vetores psiUx e pmirGLO foram digeridos com as enzimas de restrição para formação de extremidades coesivas, permitindo assim a ligação do inserto na direção correta. O plasmídeo psiUx foi digerido com BglIII e XhoI e o pmirGLO com as enzimas XhoI e SalI. As reações foram realizadas conforme descrito no Quadro 8 com incubação de 90 min a 37°C seguido de inativação de 20 min a 65°C. Para verificar se a digestão ocorreu corretamente foi realizado eletroforese em gel de agarose com os plasmídeos digeridos (conforme descrito na seção 13.2.2).

Quadro 8. Reagentes para digestão com as enzimas de restrição

Reagentes	Volume (µL)
Plasmídeo (2500 ng)	1,6
Enzima 1 (20.000 U/mL)	1,25
Enzima 2 (20.000 U/mL)	1,25
Tampão Cutsmart® (XhoI e SalI) ou NEBuffer™ 3.1 (BglIII e XhoI) (New England Biolabs)	4
Água	31,9

12.2.5 Ligação do inserto ao vetor

A ligação do inserto ao vetor foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). As concentrações utilizadas do vetor e do inserto estão descritas no Quadro 9. As reações foram mantidas a 16°C *overnight* seguido de inativação a 65°C por 10 min.

Quadro 9. Reagentes e concentrações utilizadas para ligação do inserto ao vetor.

	psiUx + pre-miR-20a (37 ng/μL + 49,3 ng/μL)	pmirGLO + CCL1 3'UTR (4,5 ng/μL + 12,6 ng/μL)
Volume (μL)		
Inserto	1	0,3
Vetor	4,1	8,9
T4 DNA ligase	2	2
Tampão 10x	2	2
Água	10,9	6,8

12.3 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS

Para as bactérias aceitarem DNA do meio circulante é necessária a utilização de bactérias competentes para viabilizar a introdução do DNA. Sendo assim, foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* XL-1 *Blue*. Primeiramente, as células foram descongeladas em banho com gelo e 10 μL de DNA (plasmídeo) foi misturado com 100 μL de KCM (100 mM KCl, 30 mM de CaCl₂ e 50 mM MgCl₂). Foram misturados 100 μL das células competentes com a mistura DNA/KCM. A mistura foi incubada em gelo por 20 min, aquecida a 42°C por 1 min e incubada em gelo por 1 min. Em seguida foram adicionados 800 μL do meio LB (meio com 0,05 mg/mL de ampicilina) e a mistura foi deixada em agitador horizontal (150 rpm) a 37°C por 1 h. Após, 60 μL da mistura foi plaqueada em placas contendo meio ágar LB solidificado contendo 0,05 mg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C e no dia seguinte 1 colônia bacteriana foi removida e adicionada em um tubo cônico do tipo *falcon* contendo meio LB com 0,05 mg/mL de ampicilina. Os tubos foram incubados *overnight* a 37°C em agitador horizontal (150 rpm). Após este período, os tubos foram centrifugados a 8000 ×g por 4 min e o sobrenadante foi removido. Em seguida, os plasmídeos foram isolados e purificados utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (27106, Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante. A quantificação

dos plasmídeos foi realizada em espectrofotômetro nanodrop (ThermoFisher, Massachusetts, EUA).

12.4 DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO E DO PLASMÍDEO

Os plasmídeos purificados foram digeridos com as enzimas de restrição para verificar a presença do inserto. O plasmídeo psiUx+pre-miR-20a foi digerido com BglII e XhoI e o pmirGLO+CCL13'UTR com as enzimas XhoI e SalI. As reações foram realizadas conforme descrito no Quadro 8 com incubação de 90 min a 37°C seguido de inativação de 20 min a 65°C. As amostras de DNA digeridas foram corridas em eletroforese de gel de agarose (1,5%). Um plasmídeo correto deve apresentar 2 bandas, uma correspondendo ao vetor e outra à inserção.

Para confirmação da correta construção, os plasmídeos foram enviados para sequenciamento de DNA do tipo Sanger. O sequenciamento foi realizado pela empresa BMR Genomics, na cidade de Padova, Itália.

Após o sequenciamento, as amostras positivas foram inoculadas e purificadas com o kit Plasmid Maxi (12162, Qiagen, Hilden, Alemanha) para se obter um DNA mais concentrado.

12.5 TRANSFECCÃO

A linhagem celular humana de adecarcinoma cervical (HeLa) foi utilizada para transfecção dos plasmídeos. Foram plaqueadas 60.000 células por poço em placa de 24 poços e após 70-90% de confluência foi realizada a transfecção. Primeiramente os plasmídeos foram diluídos em meio Opti-MEM e em seguida misturados com o reagente Lipofectamine® LTX (1:1) (ThermoFisher, Massachusetts, EUA). A Lipofectamine® é um lipídeo catiônico que permite a interação com os grupos fosfatos do DNA facilitando a transfecção para o interior das células. O complexo lipídico contendo os plasmídeos foi adicionado sobre as células e após 4 horas de incubação foi adicionado um novo

meio de cultura. Após 24 e 48 h foi realizada a RT-qPCR e o ensaio da Luciferase conforme descrito a seguir.

12.6 EXTRAÇÃO DO RNA E RT-qPCR PARA CONFIRMAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Após a transfecção, o RNA das células HeLa foi extraído com o reagente TRIzol® (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) conforme instruções do fabricante. O cDNA e a qPCR foram realizados com o kit miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Starter Kit (203351, Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme orientações do fabricante. Além dos reagentes para o cDNA e para qPCR, este kit fornece os iniciadores para detecção do miRNA de interesse e do controle endógeno U6 (pequeno RNA nuclear). A qPCR foi realizada com um volume de reação de 10 µL em placas de 384 poços e a leitura foi realizada no equipamento CFX384 *Real Time System* (BIO-RAD, Califórnia, EUA). Para verificar a superexpressão do miRNA-20a-5p e dos controles negativos miR-29a-5p e miR-29a-3p foi utilizado o cálculo $2^{-(\Delta Cq)}$ utilizando o controle endógeno U6 como normalizador. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas.

12.7 ENSAIO DA LUCIFERASE

Após a transfecção, as células foram lavadas com tampão PBS 1×, tripsinizadas e centrifugadas a 2000 ×g por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 35 µL de meio Opti-MEM (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) e foram adicionados 35 µL do reagente Dual-Glo® Luciferase (E2920, Promega, Wisconsin, EUA) para. Após incubação a temperatura ambiente por 15 min, 20 µL da mistura foi adicionado em placa de 384 poços e foi realizada leitura da Luciferase bioluminescente em luminômetro. Em seguida, foram adicionados 20 µL do reagente Dual-Glo® Stop & Glo® (diluído 1:100). Após 10 min de incubação a temperatura ambiente foi realizada leitura para verificar a luminescência da Renilla luciferase. O cálculo da

atividade da Luciferase foi realizado por meio da razão da luminescência da Luciferase pelo controle Renilla. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas.

13 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para identificar os alvos preditos do miR-20-5p três programas computacionais foram utilizados. Os resultados preditos derivados dos programas Targetscan, PITA e microT_CDS foram integrados para aumentar a especificidade. Cada *software* previu inúmeros alvos, para o miR-20a-5p. Como pode ser observado na Figura 22, 649 genes foram preditos nos 3 programas. Entre estes foram verificados os que estivessem relacionados com inflamação. Sendo assim, a quimiocina pro-inflamatória CCL1, também conhecida como I-309, foi selecionada. As quimionas formam uma grande família de citocinas que são capazes de controlar a residência e a migração das células imunológicas. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias, cuja liberação pode ser induzida durante uma resposta imune em um foco de infecção (PALOMINO e MARTI, 2015). A CCL1 possui especificidade para o receptor CCR8 e é secretada pelas células de Langerhans, endoteliais, epiteliais, linfócitos, monócitos e mastócitos. Esta quimiocina estimula principalmente a quimiotaxia de células T helper do tipo II (Th2), sugerindo que ela desempenha um papel fundamental na progressão de doenças do tipo Th2, como a asma, colite ulcerativa, câncer, entre outras (ZINGONI *et al.*, 1998; MIYAGAKI *et al.*, 2009). Neste sentido, a validação de CCL1 como alvo do miR-20a pode ser útil na compreensão do envolvimento deste miRNA nestas doenças.

O local de interação do miR-20a-5p com o gene CCL1 pode ser observada na Figura 23. O tipo de ligação na região *seed* foi de 8mer, ou seja, uma exata hibridização nas posições 2-8 do miRNA, seguida por uma adenina 'A' na posição 1. Conforme verificado por Nielsen e colaboradores (2007) a interação 8mer com adenina na primeira posição, gera um silenciamento gênico mais pronunciado quando comparado com interações 7 mer (7mer1A e 7mer-m8).

Figura 22. Diagrama de Venn para demonstração da distribuição do número de alvos preditos para o miR-20a-5p pelos programas DIANA microT_CDS (<http://www.microna.gr/microT-CDS>), PITA (<https://omictools.com/pita-tool>) e Targetscan (<http://www.targetscan.org/>).

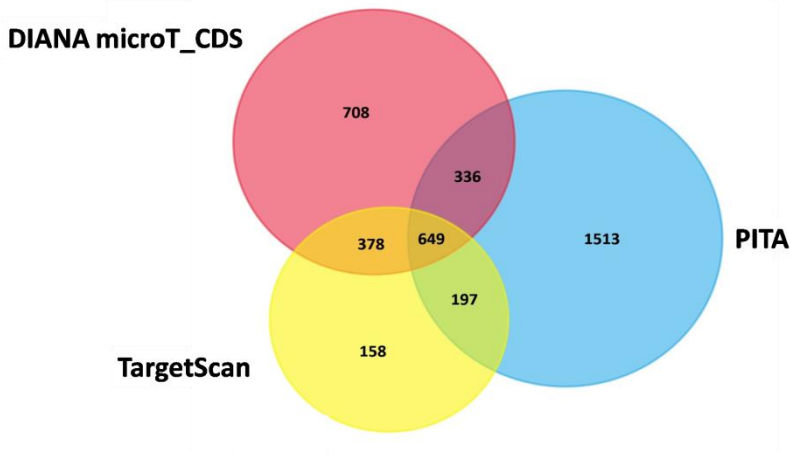


Figura 23. Pareamento entre o miR-20a-5p e a região 3'UTR do gene CCL1.

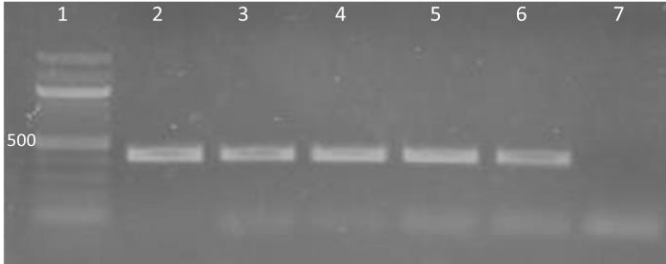
Posição 139-146 do gene CCL1 (3'UTR)	5'	...AUAAGCUAUGUUGUUGCACUUUA...
hsa-miR-20a-5p	3'	GAUGGACGUGAUUU CGUGAAAU

Fonte: TARGETSCAN, 2018.

Para realização do ensaio da Luciferase, primeiramente o miR-20a e a região 3'UTR do gene CCL1 foram clonados nos vetores psiUx e pmirGLO, respectivamente. Para o miRNA, especificamente os iniciadores foram desenhados para amplificar a região flanqueadora do pre-miR-20a, delimitando assim uma região de aproximadamente 400 nucleotídeos (nt). Por outro lado, para o gene CCL1, os iniciadores foram desenhados para amplificação de toda região 3'UTR do gene (aproximadamente 230 nt). Na extremidade 5' de cada iniciador foram adicionados nucleotídeos que correspondem aos locais para as enzimas

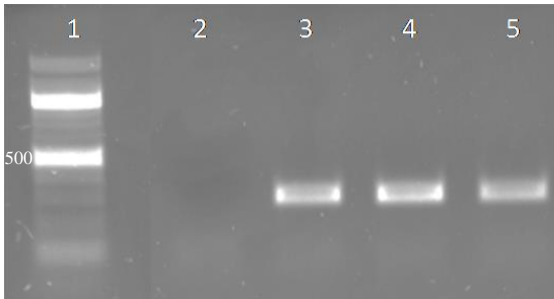
de restrição. Como é possível observar nas Figuras 24 e 25, o pre-miR-20a e a região 3'UTR do gene CCL1 foram amplificadas em todas temperaturas de anelamento testadas.

Figura 24. Amplificação do pre-miR-20a



1 Padrão de tamanho molecular (100 pb); **2** pre-miR-20a (70°C); **3** pre-miR-20a (68°C); **4** pre-miR-20a (66°C); **5** pre-miR-20a (62°C); **6** pre-miR-20a (60°C); **7** Controle negativo

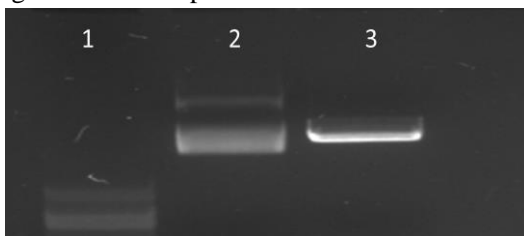
Figura 25. Amplificação da região 3'UTR do gene CCL1



1 Padrão de tamanho molecular (100 pb); **2** Controle negativo; **3** CCL1 64°C; **4** CCL1 66°C; **5** CCL1 68°C

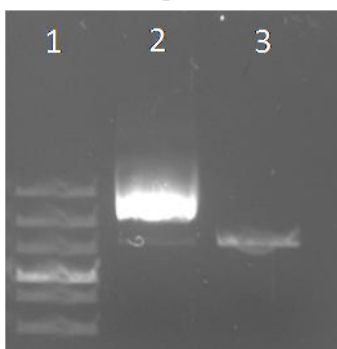
Em seguida, os vetores foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição. Como pode ser observado nas Figuras 26 e 27, a digestão nos vetores psiUx e pmirGLO, resultou em uma forma de DNA plasmidial linear (coluna 3), diferentemente do vetor que não foi digerido (coluna 2). A linearidade do plasmídeo é essencial para que ocorra a ligação do inserto (pre-miR-20a e CCL13'UTR). O vetor e inserto foram ligados pela enzima T4 ligase e em seguida transformados em *E. coli* competentes.

Figura 26. Digestão do vetor psiUx



1 Padrão de tamanho molecular (100 pb); **2** psiUx não digerido; **3** psiUx digerido com BglII e XhoI

Figura 27. Digestão do vetor pmirGLO

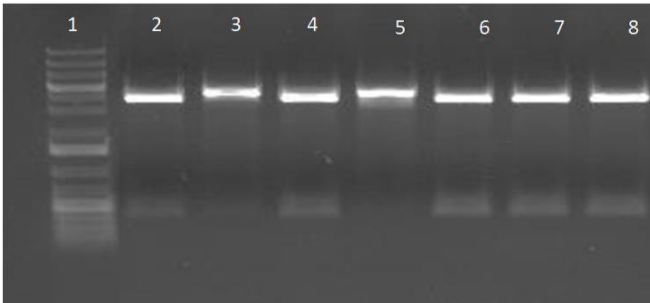


1 Padrão de tamanho molecular (1000 pb); **2** pmirGLO não digerido; **3** pmirGLO digerido com xhoI e SalI

Em seguida, algumas colônias resistentes foram inoculadas, os plasmídeos foram isolados, purificados e digeridos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem. Este procedimento foi realizado para verificar a presença do inserto no vetor. Como pode ser verificado na Figura 28 todos os plasmídeos psiUx+pre-miR-20a isolados de diferentes colônias continham o inserto. Já na Figura 29 observa-se que somente o plasmídeo (pmirGLO+CCL1) número 6 (retângulo vermelho) continha o inserto. Neste caso, pode ter ocorrido uma digestão ineficiente com as enzimas de restrição ou a presença do vetor vazio. No entanto, os plasmídeos positivos foram enviados para

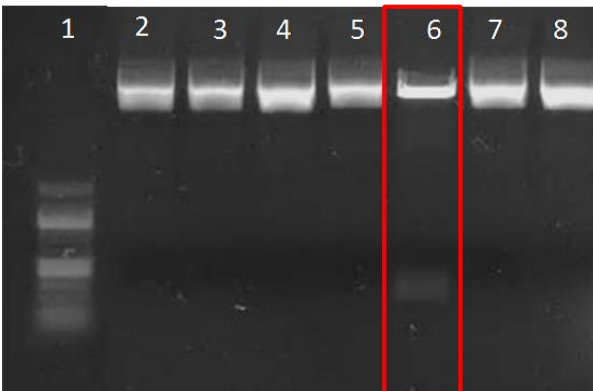
sequenciamento para confirmação da correta orientação do inserto e ausência de mutações. O resultado do sequenciamento comprovou a presença dos insertos e não foram observadas mutações na região sequenciada (Figuras 30 e 31). Sendo assim, após confirmação as amostras positivas foram novamente inoculadas e purificadas para obter-se uma concentração maior do plasmídeo.

Figura 28. Digestão do plasmídeo psiUx+pre-miR-20a após transformação em bactérias competentes



1 Padrão de tamanho molecular (1000 pb); **2 – 8** plasmídeos isolados de diferentes colônias bacterianas

Figura 29. Digestão do plasmídeo pmirGLO+CCL1 3'UTR após transformação em bactérias competentes



1 Padrão de tamanho molecular (100 pb); **2 – 8** plasmídeos isolados de diferentes colônias bacterianas. Retângulo vermelho mostra o único plasmídeo isolado contendo o inserto.

Figura 30. Sequenciamento de aproximadamente 900 nucleotídeos do vetor psiUx com a inserção do pre-miR-20a

GAGGCTGTGTCGGGGCANANCCNNNANCT**ATGCAAACTGATGGTGG
CCTGCTATTTCTTCAAATGAATGATTTTTACTAATTTTGTGTACTTT
TATTGTGTCGATGTAGAATCTGCCTGGTCTATCTGATGTGACAGCTT
CTGTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTTAGTTATCTAC
TGCATTATGAGCACTTAAAGTACTGCTAGCTGTAGAACTCCAGCTTC
GGCCTGTCGCCAATCAAAGTCTCCTGTTACTGAACACTGTTCTATG
GTTAGTTTTGCAGTTTTGCATCCAGCTGTGTGATATTCTGCTGTGCA
AATCCATGCAAACTGACTGTGGTAGTGAAGAGTCTGTAGAAAAGTA
AGGGAACTCAAACCCCTTTCTACACAGGTTGGGATCGGTTGCAATG
CTGTGTTCTCGAGCTGACTTTCTGGAGTTTCAAAGTAGACTGTACGCT
AACCGGATCCCCGGCGAGCTCGAATTCCGTGTATTCTATAGTGTACCT
AAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCGTT
CTAACGACAATATGTACAAGCCTAATTGTGTAGCATCTGGCTTACTGAAG
CAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTAGAGTCGGTTTTGGTTGG
ACGAACCTTCTGAGTTTCTGGTAACGCCGTCCCGCACCCGAAAATGGTCA
GCGAACCAATCAGCAGGGTCATCGCTAGCCAGATCCTCTACGCCGGACG
CATCGTGGCCGGCATACCCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTAT
ATCGCCGACATACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCA
TGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGCCAGCCCCGTGGCCGGGG**
Os nucleotídeos destacados em vermelho são referentes ao pre-miR-20a

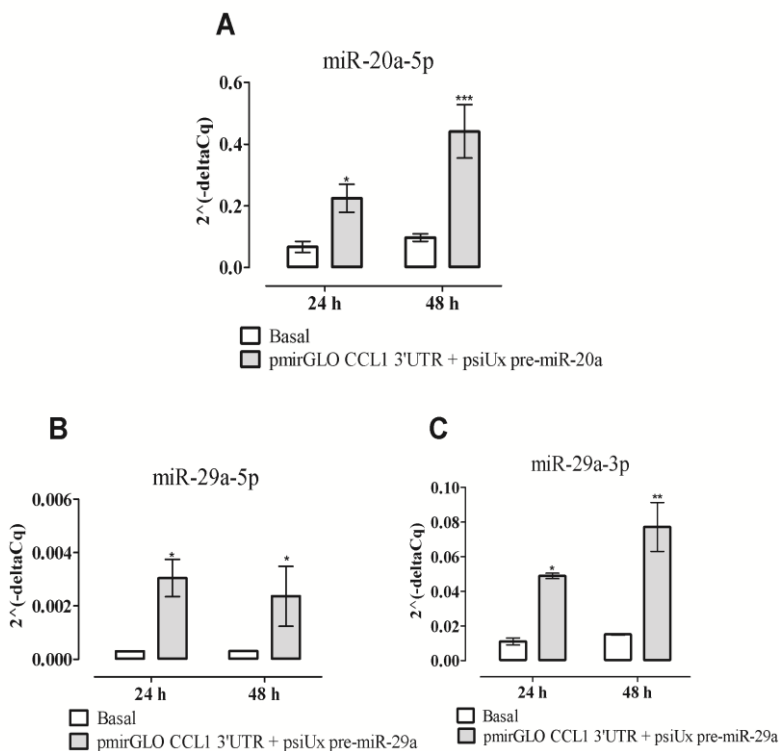
Figura 31. Sequenciamento de aproximadamente 900 nucleotídeos do pmiRGL0 com CCL1 3'UTR

**TGGCTTNCCTGTCCCCGAAACTACNNGCCCTACACCATTCCTTCTGC
CCTGCTTTTGTAGGTACAGAGGATCTGCTTGGTCTTGATAAGCTA
TGTGTGCACTTTAAACATTTAAATTATACAATCATCAACCCCAAC
CCTCTGGTCTCTTGGATTTAGAGTGAAAACCTGATTGGCATTGAG
AGGTG**GTGAGCTGCAGGCATGCAAGCTGATCCGGCTGCTAACAAAGCC
CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT
AACCCCTTGGGGCGGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATG
AGTTTGGACAAAACCAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCCTTATTG
TGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTGTAACCATTATAAGCTGCAATA
AACAAGTTAACAACAATTGCATTCAATTTATGTTTCAGGTTACAGGG
GAGATGTGGGAGGTTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTA
AAATCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTACAATTCCTGATGCGGTAT
TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGCGGATCTGC
GCAGCACCATGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTA
CCTCTGANGCGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGGT
GTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCA
TCTCAATTAGTCAGCAACNAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA
GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCCATAGTC
Os nucleotídeos destacados em vermelho referem-se a região 3'UTR do gene CCL1

A co-transfecção dos plasmídeos foi realizada na linhagem celular HeLa. Esta linhagem foi selecionada, pois ela é comumente utilizada neste tipo de ensaio e a eficiência de transfecção de DNA nesta célula é alta quando comparado com outras linhagens celulares (HORIBE *et al.*, 2014). Após a transfecção, 24 e 48 h, o RNA total foi extraído e amplificado em RT-qPCR. Na Figura 32 é possível observar a superexpressão dos miRNAs miR-20a-5p, miR-29a-5p e miR-29a-3p em relação aos níveis basais. A expressão dos miRNAs aumentou significativamente, ou seja, a transfecção dos plasmídeos foi eficiente. O plasmídeo psiUx com miR-29a estava disponível no laboratório da professora Michela A. Denti e foi verificado nos programas de predição de alvos que CCL1 não é um alvo predito deste miRNA. Por este motivo, a superexpressão do miR-29a foi também analisada pois ele servirá como controle negativo no ensaio da Luciferase.

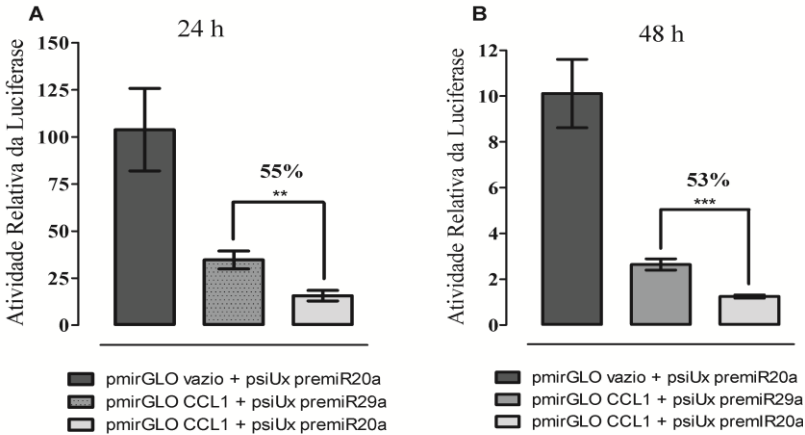
Por fim, para analisar a interação do miR-20a-5p com o gene CCL1 foi realizado o ensaio da Luciferase após a transfecção dos plasmídeos (24 e 48 h). A Figura 33 exibe os resultados da atividade relativa da Luciferase em comparação com o controle negativo (psiUx miR-29a). A co-transfecção dos plasmídeos (plasmídeo com CCL1 e plasmídeo com miRNA) levou a uma redução da atividade da Luciferase de 55% após 24 h e de 53% após 48 h. No trabalho de Chang e colaboradores (2018) também foi demonstrado que o miR-20a pode se ligar a CCL1 e bloquear a tradução da proteína. Os autores observaram uma redução de aproximadamente 20% na atividade relativa da luciferase e também foi demonstrado que a superexpressão do miR-20a leva a diminuição da expressão do gene CCL1 e da proteína. Em comparação com outros trabalhos a redução de aproximadamente 50% na atividade da Luciferase foi expressiva para este tipo de ensaio. No trabalho de Piscopo e colaboradores (2016) foi avaliado diferentes interações entre miRNA e RNAm pelo ensaio da Luciferase utilizando os vetores psiUx e pmirGLO. A redução da atividade foi inferior ao observado no nosso estudo (redução média de 27%). E em outro trabalho foi obtido uma redução da Luciferase de aproximadamente 34% quando pmirGLO SDF1- α e miR-27a foram transfectados na linhagem HEK293 (LÜ *et al.*, 2012).

Figura 32. Superexpressão dos miRNAs (A) miR-20a-5p, (B) miR-29a-5p e (C) miR-29a-3p.



Cq foi normalizado com U6 para o cálculo de $2^{-(\Delta Cq)}$. Os dados representam a média \pm DP. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas.

Figura 33. Atividade relativa da Luciferase após (A) 24 h e (B) 48 h. Transfecção com os plasmídeos pmirGLO sem inserto ou com CCL1 3'UTR e plasmídeos com os miRNAs.



A atividade relativa da Luciferase foi calculada pela razão da luminescência da Luciferase (LU) pela luminescência de Renilla luciferase (RL) (LU/RL). O miR-29a foi utilizado como controle negativo. Foi utilizada uma proporção de 1:30 (ng/ μ L) do plasmídeo pmirGLO CCL1 ou vazio e psiUx premiR-20a ou premiR-29a, respectivamente. Os dados representam a média \pm DP. One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e duplicatas biológicas.

Os resultados obtidos no presente estudo podem contribuir com pesquisas futuras em que o miR-20a está diminuído ou CCL1 aumentada. Por exemplo, no estudo de Jia *et al.* (2013) foi demonstrado que a expressão do miR-20a estava diminuída no plasma de mulheres com endometriose. E em outro estudo foi verificado superexpressão de CCR8 (receptor de CCL1) no tecido endometriótico e aumento da secreção de CCL1 (I-309) por estímulo das células endometriais estromais (SHI *et al.*, 2007). Além disso, a baixa expressão do miR-20a também já foi demonstrada em alguns tumores sólidos, tais como, carcinoma hepatocelular (FAN *et al.*, 2013), carcinoma pancreático (YAN *et al.*, 2010) e câncer de mama (VOLINIA *et al.*, 2006). No

entanto, não é de nosso conhecimento se a quimiocina CCL1 pode estar contribuindo com o processo inflamatório nestes tipos de tumores. O aumento da concentração de CCL1 já foi verificado no fluido broncoalveolar de pacientes asmáticos (MONTES-VIZUET *et al.*, 2006), em macrófagos isolados de alcoólicos com infecções oportunistas (translocação de enterobactérias e *Klebsiella pneumoniae*) e em doença auto-imune da pele (MIYAGAKI *et al.*, 2009). Ainda, em outro estudo foi comentado que a função da quimiocina CCL1 e seu receptor em diversas doenças ainda requer esclarecimentos. Foi sugerido que novas abordagens químicas, bioquímicas e biológicas ainda são necessárias para investigar o papel deste alvo em doenças humanas (MARRO *et al.*, 2006).

Como neste trabalho foi validado a regulação do gene CCL1 pelo miR-20a-5p, é interessante verificar, em estudos futuros, se a superexpressão deste miRNA poderia auxiliar na redução do processo inflamatório nos casos citados acima e também auxiliar no entendimento da função biológica de CCL1 em determinadas doenças.

14 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados descritos, foi possível validar a interação do miR-20a-5p com CCL1 pelo ensaio da Luciferase. Apesar de sabermos a importância da utilização de outros experimentos para complementação dos resultados, este trabalho pode incentivar pesquisas futuras para o estudo do mecanismo de ação deste miRNA em uma condição inflamatória.

15 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos dados obtidos pela técnica de microarrajado novos estudos podem ser realizados para exploração das alterações de outros miRNAs em pacientes ACLF. Também é possível estudar as alterações dos miRNAs em grupos mais específicos de pacientes, como aqueles com pacientes com falência renal, sepse ou peritonite bacteriana espontânea.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a expressão do miR-223-3p e do miR-25-3p estava diminuída em pacientes ACLF e naqueles que foram a óbito. O miR-25-3p relacionou-se de forma

independente à ACLF na admissão e evolução para óbito em 30 dias. O miR-25-3p poderá auxiliar no diagnóstico e no prognóstico dos pacientes ACLF. Ainda, os resultados demonstrados neste trabalho podem contribuir com a caracterização dos pacientes ACLF e com os mecanismos fisiológicos que levam as falências orgânicas, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas.

No capítulo 2 foi validado pelo ensaio da Luciferase que o miR-20a-5p participa da regulação pós-transcricional da quimiocina CCL1. Estes resultados encorajam pesquisas futuras para explorar o mecanismo de ação deste miRNA em uma condição inflamatória. Ainda, pode incentivar a realização de trabalhos de experimentação molecular para comprovação de alvos preditos de outros miRNAs.

16 PERSPECTIVAS GERAIS

As perspectivas deste trabalho são:

- Requerer autorização ao CTNBio e CIBio-UFSC para realização de experimentos com organismos geneticamente modificados.
- Transfectar o plasmídeo de superexpressão psiUx+premiR-20a em linhagens celulares estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e verificar as concentrações da proteínas CCL1 por meio da técnica de Western blot;
- Transfectar o plasmídeo de superexpressão psiUx+premiR-20a em células estimuladas com LPS e verificar outras citocinas alteradas por meio da técnica de ELISA;
- Clonar o miR-25, o miR-223 e os genes de interesse nos plasmídeos;
- Validar pelo ensaio da Luciferase os principais genes preditos para o miR-25-3p e miR-223-3p;
- Superexpressar o miR-25-3p e miR-223-3p em células estimuladas com LPS e avaliar as proteínas de interesse alteradas.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 8, p. 475-88, 2013.

ANKASHA, S. J. *et al.* Post-transcriptional regulation of microRNAs in cancer: From prediction to validation. **Oncol Rev**, v. 12, n. 1, p. 344, 2018.

ARROYO, V. *et al.* Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16041, 2016.

ARVANITI, V. *et al.* Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1246-56, 1256.e1-5, 2010.

BAJAJ, J. S. *et al.* Survival in infection-related acute-on-chronic liver failure is defined by extrahepatic organ failures. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 250-6, 2014.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-97, 2004.

BEG, M. S. *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. **Invest New Drugs**, v. 35, n. 2, p. 180-188, 2017.

CARDOSO, A. R. *et al.* Novel and simple electrochemical biosensor monitoring attomolar levels of miRNA-155 in breast cancer. **Biosens Bioelectron**, v. 80, p. 621-630, 2016.

CERMELLI, S. *et al.* Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23937, 2011.

CHANG, R. *et al.* MicroRNA-20a-5p suppresses IL-17 production by targeting OSM and CCL1 in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. **Br J Ophthalmol**, v. 102, n. 2, p. 282-290, 2018.

CHEN, C. *et al.* Serum miR-126-3p level is down-regulated in sepsis patients. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 11, p. 2605-2612, 2018.

CHEN, W. *et al.* Genome-wide microarray-based analysis of miRNAs expression in patients with acute-on-chronic liver failure. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 1, p. 32-39, 2014.

CHEN, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res**, v. 18, n. 10, p. 997-1006, 2008.

CREEMERS, E. E.; TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M. Circulating MicroRNAs. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 483, 2012.

D'AMICO, G.; GARCIA-TSAO, G.; PAGLIARO, L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. **J Hepatol**, v. 44, n. 1, p. 217-31, 2006.

DAI, Y.; ZHOU, X. Computational methods for the identification of microRNA targets. **Open access bioinformatics**, v. 2, p. 29-39, 2010.

DELEVE, L. D.; WANG, X.; GUO, Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 920-30, 2008.

DENTI, M. A. *et al.* A new vector, based on the PolIII promoter of the U1 snRNA gene, for the expression of siRNAs in mammalian cells. **Mol Ther**, v. 10, n. 1, p. 191-9, 2004.

DING, W. *et al.* Characterisation of peripheral blood mononuclear cell microRNA in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. **Sci Rep**, v. 5, p. 13098, 2015.

DO AMARAL, A. E. *et al.* Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274-287, 2018.

DURAND, F.; VALLA, D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. **J Hepatol**, v. 42 Suppl, n. 1, p. S100-7, 2005.

ETHERIDGE, A. *et al.* Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. **Mutat Res**, v. 717, n. 1-2, p. 85-90, 2011.

- FAN, M. Q. *et al.* Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 32, n. 1, p. 21, 2013.
- FEDE, G. *et al.* Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. **J Hepatol**, v. 56, n. 4, p. 810-8, 2012.
- FISCHER, J. *et al.* From stable disease to acute-on-chronic liver failure: Circulating cytokines are related to prognosis in different stages of cirrhosis. **Cytokine**, v. 91, p. 162-169, 2017.
- FRIEDMAN, R. C. *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.
- GARCIA-PAGAN, J. C.; GRACIA-SANCHO, J.; BOSCH, J. Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. **J Hepatol**, v. 57, n. 2, p. 458-61, 2012.
- GARG, H. *et al.* Hepatic and systemic hemodynamic derangements predict early mortality and recovery in patients with acute-on-chronic liver failure. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 8, p. 1361-7, 2013.
- GINES, P. *et al.* Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. **Hepatology**, v. 7, n. 1, p. 122-8, 1987.
- GRASEDIECK, S. *et al.* Impact of serum storage conditions on microRNA stability. **Leukemia**, v. 26, n. 11, p. 2414-6, 2012.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Database issue, p. D140-4, 2006.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl_1, p. D154-D158, 2008.

GUI, J. *et al.* Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 5, p. 183-93, 2011.

HEINRICH, P. C. *et al.* Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem J**, v. 334 (Pt 2), p. 297-314, 1998.

HORIBE, T. *et al.* Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging. **Luminescence**, v. 29, n. 1, p. 96-100, 2014.

JALAN, R. *et al.* Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. **J Hepatol**, v. 60, n. 6, p. 1310-24, 2014.

JALAN, R. *et al.* Acute-on chronic liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 6, p. 1336-1348, 2012.

JALAN, R.; WILLIAMS, R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. **Blood Purif**, v. 20, n. 3, p. 252-61, 2002.

JANSSEN, H. L. *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. **N Engl J Med**, v. 368, n. 18, p. 1685-94, 2013.

JIA, S. Z. *et al.* Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 28, n. 2, p. 322-30, 2013.

JIN, B. X. *et al.* MicroRNA panels as disease biomarkers distinguishing hepatitis B virus infection caused hepatitis and liver cirrhosis. **Sci Rep**, v. 5, p. 15026, 2015.

JIN, Y. *et al.* Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. **Methods Mol Biol**, v. 936, p. 117-27, 2013.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 5, p. 376-85, 2005.

KOBERLE, V. *et al.* Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75184, 2013.

LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-8, 2001.

LAU, N. C. *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-62, 2001.

LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862-4, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, 1993.

LI, J.-H. *et al.* starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D92-D97, 2014.

LI, M. *et al.* MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47^{phox}-oxidative stress pathway in neutrophils. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 705, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-128, 2012.

LÜ, M.-H. *et al.* microRNA-27b suppresses mouse MSC migration to the liver by targeting SDF-1 α in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 2, p. 389-395, 2012.

MAIWALL, R.; SARIN, S. K.; MOREAU, R. Acute kidney injury in acute on chronic liver failure. **Hepatol Int**, v. 10, n. 2, p. 245-57, 2016.

MARRO, M. L. *et al.* In vitro selection of RNA aptamers that block CCL1 chemokine function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, n. 1, p. 270-276, 2006.

MARTÍN-LLAHÍ, M. *et al.* Prognostic Importance of the Cause of Renal Failure in Patients With Cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 140, n. 2, p. 488-496.e4, 2011.

MEHTA, G. *et al.* Systemic inflammation is associated with increased intrahepatic resistance and mortality in alcohol-related acute-on-chronic liver failure. **Liver Int**, v. 35, n. 3, p. 724-34, 2015.

MENDEZ-SANCHEZ, N. *et al.* Etiology of liver cirrhosis in Mexico. **Ann Hepatol**, v. 3, n. 1, p. 30-3, 2004.

MESTDAGH, P. *et al.* Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. v. 11, n. 8, p. 809-15, 2014.

MIYAGAKI, T. *et al.* Increased CCL1 levels in the sera and blister fluid of patients with bullous pemphigoid. **J Dermatol Sci**, v. 54, n. 1, p. 45-7, 2009.

MONTES-VIZUET, R. *et al.* CC chemokine ligand 1 is released into the airways of atopic asthmatics. **Eur Respir J**, v. 28, n. 1, p. 59-67, 2006.

MOREAU, R. *et al.* Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1426-37, 1437 e1-9, 2013.

NIELSEN, C. B. *et al.* Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. **Rna**, v. 13, n. 11, p. 1894-910, 2007.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.

PELLICORO, A. *et al.* Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 181-94, 2014.

PISCOPO, P. *et al.* Reduced miR-659-3p Levels Correlate with Progranulin Increase in Hypoxic Conditions: Implications for Frontotemporal Dementia. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, p. 31, 2016.

QIAN, H.; YANG, C.; YANG, Y. MicroRNA-26a inhibits the growth and invasiveness of malignant melanoma and directly targets on MITF gene. **Cell Death Discovery**, v. 3, p. 17028, 2017.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RECZKO, M. *et al.* Functional microRNA targets in protein coding sequences. **Bioinformatics**, v. 28, n. 6, p. 771-6, 2012.

REDDYCHERLA, A. V. *et al.* miR-20a inhibits TCR-mediated signaling and cytokine production in human naive CD4+ T cells. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125311, 2015.

RIFFO-CAMPOS, A. L.; RIQUELME, I.; BREBI-MIEVILLE, P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, 2016.

RODERBURG, C. *et al.* Micro-RNA profiling in human serum reveals compartment-specific roles of miR-571 and miR-652 in liver cirrhosis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32999, 2012.

ROMERO-GOMEZ, M.; MONTAGNESE, S.; JALAN, R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. **J Hepatol**, v. 62, n. 2, p. 437-47, 2015.

RUAN, Q. *et al.* MicroRNA-21 regulates T-cell apoptosis by directly targeting the tumor suppressor gene Timp2. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1095, 2014.

SARIN, S. K.; CHOUDHURY, A. Acute-on-chronic liver failure: terminology, mechanisms and management. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 3, p. 131-49, 2016.

SCAGLIONE, S. *et al.* The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. **J Clin Gastroenterol**, v. 49, n. 8, p. 690-6, 2015.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **The Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-51, 2008.

SHAH, P. P.; HUTCHINSON, L. E.; KAKAR, S. S. Emerging role of microRNAs in diagnosis and treatment of various diseases including ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 2, p. 11-11, 2009.

SHI, Y. L. *et al.* Combination of 17beta-estradiol with the environmental pollutant TCDD is involved in pathogenesis of endometriosis via up-regulating the chemokine I-309-CCR8. **Fertil Steril**, v. 88, n. 2, p. 317-25, 2007.

SHRIVASTAVA, S. *et al.* Up-regulation of circulating miR-20a is correlated with hepatitis C virus-mediated liver disease progression. **Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 863-71, 2013.

SILVA, P. E. *et al.* Single-centre validation of the EASL-CLIF consortium definition of acute-on-chronic liver failure and CLIF-SOFA for prediction of mortality in cirrhosis. **Liver Int**, v. 35, n. 5, p. 1516-23, 2015.

SOHEL, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 175-186, 2016.

SOLE, C. *et al.* Characterization of Inflammatory Response in Acute-on-Chronic Liver Failure and Relationship with Prognosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 32341, 2016.

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 9, p. 542-552, 2013.

TRANG, P. *et al.* Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. **Mol Ther**, v. 19, n. 6, p. 1116-22, 2011.

TSOCHATZIS, E. A.; BOSCH, J.; BURROUGHS, A. K. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 383, n. 9930, p. 1749-61, 2014.

VOLINIA, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2257-2261, 2006.

WAIMMANN, O. *et al.* Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45652, 2012.

WANG, H. *et al.* Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38885, 2012.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 1, p. 25-30, 2016.

WANG, K. *et al.* Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41561, 2012.

WASMUTH, H. E. *et al.* Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. **J Hepatol**, v. 42, n. 2, p. 195-201, 2005.

WATANABE, Y.; TOMITA, M.; KANAI, A. Computational methods for microRNA target prediction. **Methods Enzymol**, v. 427, p. 65-86, 2007.

WEBER, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clin Chem**, v. 56, n. 11, p. 1733-41, 2010.

WIEGAND, J.; BERG, T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. **Dtsch Arztebl Int**, v. 110, n. 6, p. 85-91, 2013.

WIEST, R.; LAWSON, M.; GEUKING, M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 197-209, 2014.

WITKOS, T. M.; KOSCIANSKA, E.; KRZYZOSIAK, W. J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. **Curr Mol Med**, v. 11, n. 2, p. 93-109, 2011.

YAN, H. *et al.* MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. **Hum Gene Ther**, v. 21, n. 12, p. 1723-34, 2010.

YAO, L. *et al.* Clinical evaluation of circulating microRNA-25 level change in sepsis and its potential relationship with oxidative stress. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 7, p. 7675-84, 2015.

YAO, Q. *et al.* MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 3, p. 539-542, 2009.

YAO, Y.; SUN, F.; LEI, M. miR-25 inhibits sepsis-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting PTEN. **Biosci Rep**, v. 38, n. 2, 2018.

ZHENG, Q. F. *et al.* Upregulation of miRNA-130a Represents Good Prognosis in Patients With HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure: A Prospective Study. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 6, p. e2639, 2016.

ZINGONI, A. *et al.* The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. **J Immunol**, v. 161, n. 2, p. 547-51, 1998.

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CCS - DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DE MARCADORES PROGNÓSTICOS EM PORTADORES DE CIRROSE HEPÁTICA DESCOMPENSADA

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa: *Avaliação de marcadores prognósticos em portadores de cirrose hepática descompensada*. Este projeto tem o objetivo de identificar dados da avaliação médica ou de exames laboratoriais que possam nos ajudar a identificar os pacientes com doença mais grave. Os resultados desta pesquisa poderão permitir a criação de ferramentas para a identificação rápida dos pacientes com doença mais grave, permitindo assim um tratamento mais adequado.

Caso você concorde em participar deste estudo, será feita uma avaliação clínica (entrevista e exame físico) no primeiro dia da sua internação e 48 horas depois. Além disso, uma coleta de sangue será realizada por punção periférica na veia do antebraço também nestes dois momentos. Parte do material será destinada aos exames de rotina (que são necessários para avaliação do seu caso durante a internação) e uma outra porção será armazenadas em freezer a -80° C para a posterior dosagem dos exames referentes a este estudo, que são: óxido nítrico, apelina, dimetilarginina assimétrica, 6-keto-PGF1 alfa, sCD40L, coceptina, pentaxina 3, fator de Von Willebrand, E-selectina, P-selectina, Ativador do plasminogênio tecidual, lecitina ligadora de manose, pro-peptídeo natriurético amino-terminal tipo-C, citocinas relacionadas à resposta inflamatória (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α e VEGF), Troponina I, troponina T, pro-BNP e pro-ANP, Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrofílica (NGAL), Cistatina C, molécula de injúria renal tipo 1 (KIM-1), microRNAs, Neopterin, proteína induzida por interferon gama 10 (IP-10), receptor ativador de uroquinase plasminogênio solúvel (suPAR), proteína ligadora de lipopolissacarídes (LBP), apolipoproteína A1, ST2, Fibrinogênio, produtos de degradação de fibrina (PDF), D-dímero, ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), inibidor de ativação do plasminogênio (PAI-1), tempo de lise de euglobulina, Adiponectina, visfatina, Ensaio Cometa, Teste de Micronúcleo, Neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células NK e dendríticas, expressão de receptores de superfície celular. Serão também realizados os seguintes exames em amostra de urina coletada durante sua internação: Sódio, potássio, creatinina, proteína total, albumina, NGAL, KIM-1, Cistatina C, microRNAs. Caso seja necessária realização de uma punção para retirada de líquido ascítico (água da barriga) durante o seu tratamento no hospital, uma pequena parte deste líquido será utilizada para pesquisa de Neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células NK e dendríticas, expressão de receptores de superfície celular, citocinas. Dados do seu exame de eletrocardiograma realizado durante a internação também serão avaliados (Variabilidade da frequência cardíaca e intervalo QT).

Não existem riscos importantes relacionados a tais procedimentos, podendo ocorrer, como consequência da coleta de sangue, dor no local da punção e/ou formação de hematoma local.

Não há benefício direto para o participante. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores envolvidos são a Dra. Dariana Carla Maggi, Dra. Ariane Borgonovo, Dra. Janaína Luz Narciso Schiavon e o Dr. Leonardo de Lucca Schiavon que podem ser encontrados no endereço: Departamento de Clínica Médica, Hospital Universitário/Campus Universitário – Trindade - Cep 88040-970 - Florianópolis – SC Fone (48) 37219149/37219014; e-mail: gastro.hu@uol.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Universidade Federal de Santa Catarina;

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CCS - DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão - Campus Universitário - Trindade - Florianópolis/SC; Tel: (48) 3721-9206.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Para retirada do consentimento basta entrar em contato com um dos pesquisadores através dos telefones e do e-mail fornecido acima.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, assim que os mesmos forem de conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo "**Avaliação de marcadores prognósticos em portadores de cirrose hepática descompensada**".

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do participante	Assinatura	Data
----------------------	------------	------

ou

Responsável legal	Assinatura	Data
-------------------	------------	------

Responsável pelo estudo	Assinatura	Data
-------------------------	------------	------

ANEXO B – Escore CLIF-SOFA, Child-Pugh e MELD

Escore CLIF-SOFA

Órgão/sistema	0	1	2	3	4
Fígado (Bilirrubina,mg/dL)	<1,2	≥1,2 até ≤2,0	≥2,0 até <6,0	≥6,0 até < 12,0	≥12,0
Rins (Creatinina, mg/dL)	<1,2	≥1,2 até < 2,0	≥2,0 até <3,5 ou hemodiálise	≥3,5 até <5,0 ou hemodiálise	≥5,0 ou hemodiálise
Cérebro (Grau de encefalopatia)	Sem encefalopatia	I	II	III	IV
Coagulação (razão normalizada internacional)	<1,1	≥1,1 até <1,25	≥1,25 até < 1,5	≥1,5 até < 2,5	≥2,5 ou plaq. ≤ 20x10 ⁹ /L
Circulação (pressão media arterial, em mmHg)	≥70	<70	Dopa≤5 ou dobuta ou terli	Dopa>5 ou E≤0,1 ou NE≤0,1	Dopa>15 ou E>0,1 ou NE>0,1
Pulmões (SpO ₂ /FiO ₂)	>512	>357 até ≤512	> 214 até ≤357	>89 até≤214	≤89

O escore CLIF-SOFA inclui escores variando de 0 a 4 para cada um dos componentes. Escores maiores indicam disfunção orgânica mais severa. Os retângulos em cinza indicam os critérios diagnósticos para disfunções orgânicas. **Dopa.** dopamina; **Dobuta.** dobutamina; **Terli.** terlipressina; **E.** epinefrina; **NE.** norepinefrina; **SpO₂.** saturação periférica de oxigênio; **FiO₂.** fração inspirada de oxigênio.

Fonte: MOREAU *et al.* (2013).

Escore Child-Pugh

Critério	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina total (µmol/L)	<34	34-51	>51
Albumina sérica (g/L)	>35	28-35	<28
RNI	<1,7	1,7-2,3	>2,3
Ascite	Ausente	Controlada	Refratária
Encefalopatia hepática	Nenhuma	Mínimo	Avançada (coma)

Pontuação entre 5-6 Child-Pugh A; entre 7-9 Child-Pugh B e entre 10-15 Child-Pugh. RNI, razão de normatização internacional

Fonte: DURAND e VALLA (2005)

Pontuação de MELD (Modelo para doença hepática terminal)**Fórmula de MELD:**

MELD = $3,8 \times \log_e$ da bilirrubina sérica (mg/dL) + $11,2 \times \log_e$ de RNI + $9,6 \times \log_e$ da creatinina sérica (mg/dL) + 6,43

Interpretação da pontuação de MELD

MELD	Mortalidade em 3 meses (%)
<9	1,9
10-19	6,0
20-29	19,6
30-39	52,6
≥40	71,3

Fonte: DURAND e VALLA (2005)

Anexo C – Artigos publicados durante o período de doutorado (2014-2018)

Cisilotto, J., Sandjo, L. P., Faqueti, L. G., Fernandes, H., Joppi, D., Biavatti, M. W., & Creczynski-Pasa, T. B. (2018). Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS(2) chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. *J Pharm Biomed Anal*, 149, 502-511.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 149 (2018) 502–511



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS² chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids



Júlia Cisilotto, Louis P. Sandjo, Larissa G. Faqueti, Heloísa Fernandes, Débora Joppi, Maique W. Biavatti, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa*

Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

Cisilotto, J., Ferreira, M., Filippin-Monteiro, F. B., Bortoluzzi, A. J., Sa, M. M., & Creczynski-Pasa, T. B. (2015). Isothiuronium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 15(3), 353-362.

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2015, 15, 353-362

353

Isothiuronium Salts Reduce NRAS Expression, Induce Apoptosis and Decrease Invasion of Melanoma Cells

Júlia Cisilotto¹, Misael Ferreira², Fabíola Branco Filippin-Monteiro³, Adailton João Bortoluzzi², Marcus Mandolesi Sá² and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1,*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil; ²Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil;

³Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

do Amaral, A. E., **Cisilotto, J.**, Creczynski-Pasa, T. B., & de Lucca Schiavon, L. (2018). Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. *Pharmacological Research*, 128, 274-287.

Pharmacological Research 128 (2018) 274–287



Review

Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases



Alex Evangelista do Amaral^a, Júlia Cisilotto^a, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{a,*},
Leonardo de Lucca Schiavon^{b,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Delfino Conti Street, 88040-370 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Federal University of Santa Catarina, Maria Flora Pausewang Street, 88036-800 Florianópolis, SC, Brazil

Amaral, A. E. D., Rode, M. P., **Cisilotto, J.**, Silva, T. E. D., Fischer, J., Matiollo, C., . . . Creczynski-Pasa, T. B. (2018). MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA-21 as a predictor of transplant-free survival. *Pharmacol Res*, 134, 179-192.

Accepted Manuscript

Title: MicroRNA profiles in serum samples from patients with stable cirrhosis and miRNA-21 as a predictor of transplant-free survival

Authors: Alex Evangelista do Amaral, Michele Patrícia Rode, Julia Cisilotto, Telma Erotides da Silva, Josiane Fischer, Camila Matiollo, Elayne Cristina de Moraes Rateke, Janafina Luz Narciso-Schiavon, Leonardo Lucca Schiavon, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

PII: S1043-6618(18)30433-X
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.019>
Reference: YPHRS 3926

To appear in: *Pharmacological Research*

Received date: 27-3-2018
Revised date: 14-6-2018
Accepted date: 19-6-2018



Zingue, S., Michel, T., **Cisilotto, J.**, Tueche, A. B., Ndinteh, D. T., Mello, L. J., . . . Creczynski-Pasa, T. B. (2018). The hydro-ethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem barks induced death in an ER-negative breast cancer cell line by the intrinsic pathway of apoptosis and inhibited cell migration. *J Ethnopharmacol*, 223, 41-50.

Journal of Ethnopharmacology 223 (2018) 41-50



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



The hydro-ethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem barks induced death in an ER-negative breast cancer cell line by the intrinsic pathway of apoptosis and inhibited cell migration



Stephane Zingue^{a,b,h,c,*}, Thomas Michel^d, Julia Cisilotto^c, Alain Brice Tueche^a, Derek Tantoh Ndinteh^b, Leônidas João Mello, Jr^e, Dieudonné Njamen^{b,e}, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{c,*}

^a Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, P.O. Box 55, Maroua, Cameroon

^b Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, University of Johannesburg, Doornfontein 2028, South Africa

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Institute of Chemistry of Nice, Faculty of Science, University Côte d'Azur, UMR CNRS 7272, Valrose Park, Nice Cedex 2, France

^e Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

Pollo, L. A. E., de Moraes, M. H., **Cisilotto, J.**, Creczynski-Pasa, T. B., Biavatti, M. W., Steindel, M., & Sandjo, L. P. (2017). Synthesis and *in vitro* evaluation of Ca(2+) channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: SAR analysis. *Parasitol Int*, 66(6), 789-797.

Parasitology International 66 (2017) 789-797



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint



Synthesis and *in vitro* evaluation of Ca²⁺ channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: SAR analysis



Luiz A.E. Pollo^a, Milene H. de Moraes^b, Júlia Cisilotto^a, Tânia B. Creczynski-Pasa^a, Maique W. Biavatti^a, Mario Steindel^{b,*}, Louis P. Sandjo^{b,*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Zingue, S., Michel, T., Nde, C. B. M., Njuh, A. N., **Cisilotto, J.**, Ndinteh, D. T., . . . Njamen, D. (2017). Estrogen-like and tissue-selective effects of 7-methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): an in vitro and in vivo study. *BMC Complement Altern Med*, 17(1), 383.

Zingue et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:383
DOI 10.1186/s12906-017-1895-9

BMC Complementary and
Alternative Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Estrogen-like and tissue-selective effects of 7-methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): an in vitro and in vivo study



Stéphane Zingue^{1,2,3*}, Thomas Michel⁴, Chantal Beatrice Magne Nde⁵, Armstrong Nang Njuh¹, Julia Cisilotto², Derek Tantoh Ndinteh^{1,3}, Colin Clyne⁵, Xavier Fernandez⁴, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa² and Dieudonné Njamen^{3,6*}

Zingue, S., J. Tchoumtchoua, D. M. Ntsa, L. P. Sandjo, **J. Cisilotto**, C. B. M. Nde, E. Winter, C. F. Awounfack, D. T. Ndinteh, C. Clyne, D. Njamen, M. Halabalaki and T. B. Creczynski-Pasa (2016). Estrogenic and cytotoxic potentials of compounds isolated from *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae): towards a better understanding of its underlying mechanisms. *BMC Complement Altern Med* 16(1): 421.

Zingue et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2016) 16:421
DOI 10.1186/s12906-016-1385-5

BMC Complementary ar
Alternative Medicin

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Estrogenic and cytotoxic potentials of compounds isolated from *Millettia macrophylla* Benth (Fabaceae): towards a better understanding of its underlying mechanisms



Stéphane Zingue^{1,2,3,4*}, Job Tchoumtchoua^{2,3}, Dieudonnée Mireille Ntsa², Louis Pergaud Sandjo⁴, Julia Cisilotto⁴, Chantal Beatrice Magne Nde⁵, Evelyn Winter⁴, Charline Florence Awounfack², Derek Tantoh Ndinteh⁵, Colin Clyne Dieudonné Njamen^{2,6}, Maria Halabalaki³ and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{4*}

Zingue, S., **Cisilotto, J.**, Tueche, A. B., Bishayee, A., Mefegue, F. A., Sandjo, L. P., . . . Njamen, D. (2016). *Crateva adansonii* DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity *in vitro* and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*. *J Ethnopharmacol*, 190, 183-199.

Journal of Ethnopharmacology 190 (2016) 183–199



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep



Crateva adansonii DC, an African ethnomedicinal plant, exerts cytotoxicity *in vitro* and prevents experimental mammary tumorigenesis *in vivo*



Stéphane Zingue^{a,b,c,*}, Julia Cisilotto^c, Alain Brice Tueche^a, Anupam Bishayee^d, Francine Azegha Mefegue^a, Louis Pergaud Sandjo^e, Chantal Beatrice Magne Nde^c, Evelyn Winter^c, Thomas Michel^f, Derek Tantoh Ndinteh^g, Charline Florence Awounfack^b, Kevine Kanga Silihe^b, Tito Tresor Melachio Tanekou^b, Tânia Beatriz Crezynski-Pasa^c, Dieudonné Njamen^{b,g,*}

^a Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, Maroua, Cameroon

^b Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Noundi 1, Yaoundé, Cameroon

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Larkin Health Sciences Institute, Miami, FL 33169, USA

^e Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Victoria 3168, Australia

^f Institute of Chemistry of Nice, Faculty of Sciences, University Nice Sophia-Antipolis, UMR CNRS 7272, Valrose Park, Nice Cedex 2, France

^g Department of Applied Chemistry, Faculty of Sciences, University of Johannesburg, Doornfontein 2028, South Africa

APÊNDICE A - Soluções

Água livre de RNase

A água livre de RNase, utilizada em todos os experimentos desse estudo, foi preparada com Dietilpirocarbonato (DPEC) 0,1% (Sigma-Aldrich). Primeiramente, foi adicionado 0,1 mL de DPEC em 100 mL de água ultrapura Milli-Q® (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). A solução foi homogeneizada e incubada *overnight* à 37°C. Após esse período, a água foi autoclavada a 120°C por 15 min para inativação do DPEC.

Solução para limpeza de bancadas

Uma solução contendo 0,1 M de NaOH e 1 mM de EDTA foi preparada para limpeza de bancadas e outros materiais utilizados nos experimentos. Essa solução tem a capacidade de remover as RNases evitando a degradação do RNA. Para o preparo, 20 g de NaOH e 1,86 g de EDTA foram dissolvidos em 500 mL de água livre de RNase, em seguida, a solução foi homogeneizada e armazenada a temperatura ambiente.

REFERÊNCIA

Qiagen Protocols. miRNeasy Serum/Plasma Handbook, p. 33 e 34.

Disponível em:

<https://www.qiagen.com/ca/resources/resourcedetail?id=710c0168-e408-408b-95af-91df5b5b1dd6&lang=en>. Acesso em: 10 de jan de 2017.

APÊNDICE B – Concentrações de RNA total verificadas no espectrofotômetro NanoVue Plus® (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK)

Concentração de RNA total de todas as amostras utilizadas na RT-qPCR.

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
*A1	5,8	1,18	0,15
*A2	5,0	1,14	0,13
*A3	5,1	1,80	0,14
*A4	1,5	0,68	0,09
*A5	8,3	1,11	0,09
*A6	3,9	1,12	0,14
*A7	10,1	1,34	0,10
*A8	3,4	0,59	0,09
*A9	1,2	0,60	0,08
*A10	6,0	1,78	0,14
*A11	6,7	1,42	0,13
*A12	0,6	0,64	0,02
*A13	0,6	0,44	0,02
*A14	7,0	1,66	0,16
*A15	7,6	1,03	0,09
*A16	2,4	0,89	0,13
*A17	6,3	1,57	0,18
*A18	2,4	0,68	0,07
*A19	9,7	1,30	0,11
*A20	1,4	1,13	0,09
*A21	3,5	1,06	0,10
*A22	5,5	1,08	0,17
*A23	0,6	0,47	0,02
*A24	10,8	1,57	0,13
*A25	2,7	0,89	0,08
*A26	16,8	1,41	0,17

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
*A27	5,5	1,18	0,09
*A28	16,8	1,47	0,17
*A29	2,8	0,60	0,10
*A30	3,7	1,43	0,02
*A31	1,5	0,58	0,09
*A32	2,7	1,15	0,06
*A33	13,2	1,45	0,14
*A34	0,3	0,28	0,04
*A35	5,0	0,80	0,12
A36	7,2	1,33	0,11
A37	11,2	1,57	0,16
A38	5,0	1,16	0,07
A39	8,0	1,36	0,13
A40	90,0	1,63	0,40
A41	7,2	1,11	0,05
A42	11,9	1,88	0,09
A43	2,0	0,88	0,07
A44	6,8	1,39	0,09
A45	16,8	1,11	0,13
A46	5,1	1,22	0,07
A47	12,5	1,64	0,19
A48	1,1	0,62	0,16
A49	3,2	1,44	0,04
A50	7,4	1,06	0,09
A51	8,8	1,29	0,14
A52	2,4	1,69	0,02
A53	16,4	1,21	0,13
A54	10,9	1,35	0,11
A55	6,3	1,47	0,12
A56	12,4	1,16	0,12
A57	7,6	1,35	0,03

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
A58	4,6	1,18	0,19
A59	14,8	1,38	0,14
A60	5,8	1,69	0,16
A61	5,7	1,34	0,10
A62	6,8	1,25	0,08
A63	9,2	1,35	0,11
A64	10,5	1,67	0,11
A65	23,6	1,48	0,19
A66	9,8	1,09	0,11
A67	4,2	1,43	0,13
A68	56,4	1,42	0,20
A69	5,4	1,28	0,04
A70	1,1	0,42	0,06
A71	1,0	0,69	0,08
A72	3,8	0,93	0,10
A73	8,8	2,08	0,07
A74	3,2	1,36	0,02
A75	7,9	1,05	0,11
A76	1,3	0,73	<0,01
A77	5,4	1,09	0,14
A78	1,4	0,97	0,09
A79	3,8	1,12	1,18
A80	5,5	1,19	0,13
A81	2,8	1,00	0,08
A82	1,6	0,63	0,05
A83	0,8	0,61	0,01
A84	2,4	1,02	0,18
A85	1,4	1,13	0,07
A86	7,5	0,96	0,08
A87	2,8	1,02	0,17
A88	4,7	1,38	0,03

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
A89	3,2	1,09	0,13
A90	4,0	0,93	0,08
A91	13,0	1,51	0,13
A92	7,8	1,41	0,16
A93	3,0	1,17	0,28
A94	4,3	1,00	0,16
A95	2,6	1,09	0,13
A96	7,4	1,46	0,13
A97	2,8	0,74	0,10
A98	2,0	1,00	0,04
A99	5,9	1,09	0,10
A100	2,6	0,99	0,06
A101	2,2	0,95	0,25
A102	17,2	1,49	0,17
A103	9,4	0,93	0,03
A104	7,2	1,65	0,14
A105	2,9	1,26	0,19
A106	0,4	0,34	0,06
A107	6,8	1,26	0,09
A108	3,6	1,14	0,07
A109	5,4	1,13	0,14
A110	15,2	1,54	0,17
A111	8,5	1,48	0,09
A112	1,7	0,82	0,05
A113	3,4	1,09	0,15
A114	10,8	1,29	0,15
A115	3,0	0,52	0,04
A116	8,5	1,33	0,12
A117	2,2	1,32	0,23
A118	12,1	1,41	0,12
A119	1,9	1,12	0,22

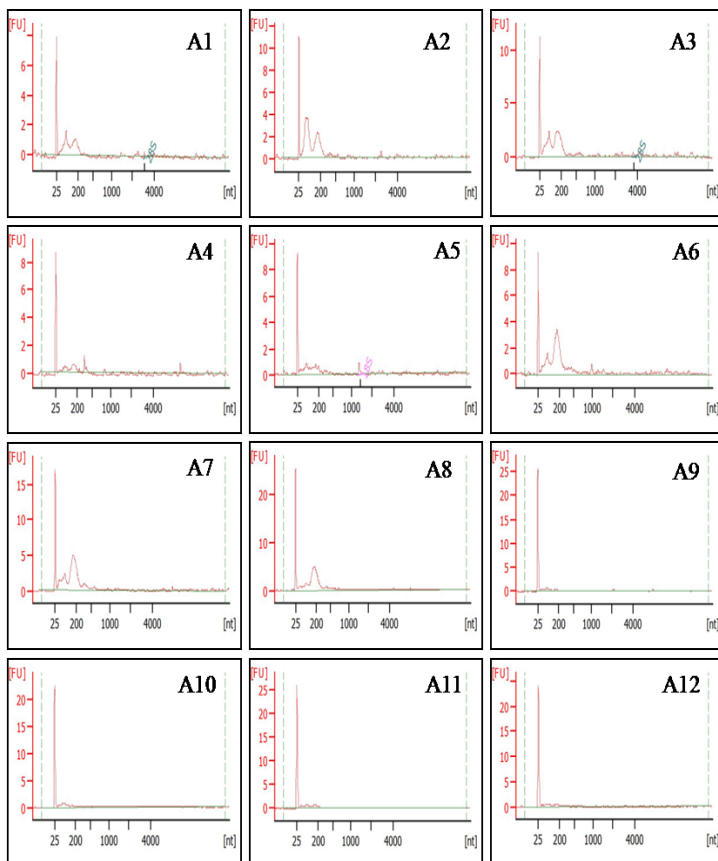
Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
A120	3,1	0,87	0,09
A121	5,7	1,18	0,15
A122	5,9	1,70	0,16
A123	7,1	1,31	0,09
A124	4,0	1,24	0,17
A125	14,0	1,39	0,16
A126	2,9	1,20	0,07
A127	8,0	1,08	0,10
A128	15,2	1,27	0,17
A129	1,0	0,73	0,03
A130	2,8	1,37	0,34
A131	11,9	1,20	0,11
A132	0,2	0,23	0,06
A133	1,7	0,82	0,04
A134	11,4	1,55	0,13
A135	13,6	1,20	0,16
A136	1,7	1,16	0,15
A137	3,2	1,01	0,19
A138	4,3	0,69	0,13
A139	3,2	1,14	0,22
Mediana	5,1	1,16	0,11

***Amostras utilizadas na avaliação da expressão de miRNAs por microarranjo**

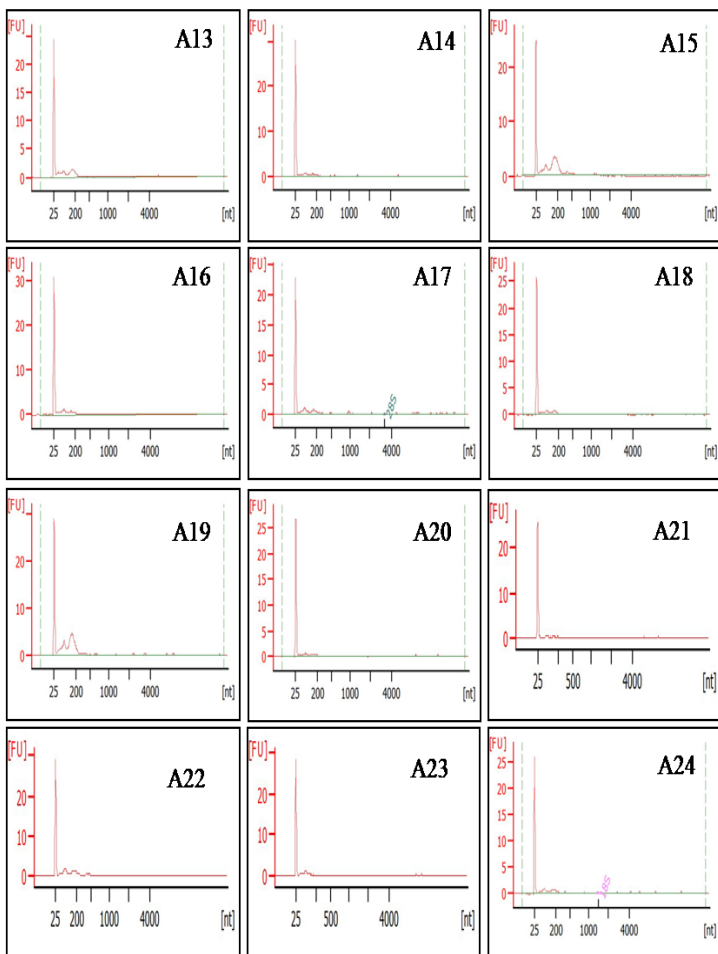
Concentração de RNA total das amostras controles utilizados no ensaio de miRNA por microarranjo

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
C1	3,1	0,94	0,08
C2	9,7	1,33	0,09
C3	0,3	0,53	0,003
C4	-0,2	-0,46	-0,02
C5	2,3	0,98	0,27
C6	3,8	1,26	0,21
C7	3,7	1,22	0,26
C8	3,0	1,10	0,22
C9	2,0	1,14	0,029
Mediana	3	1,10	0,09

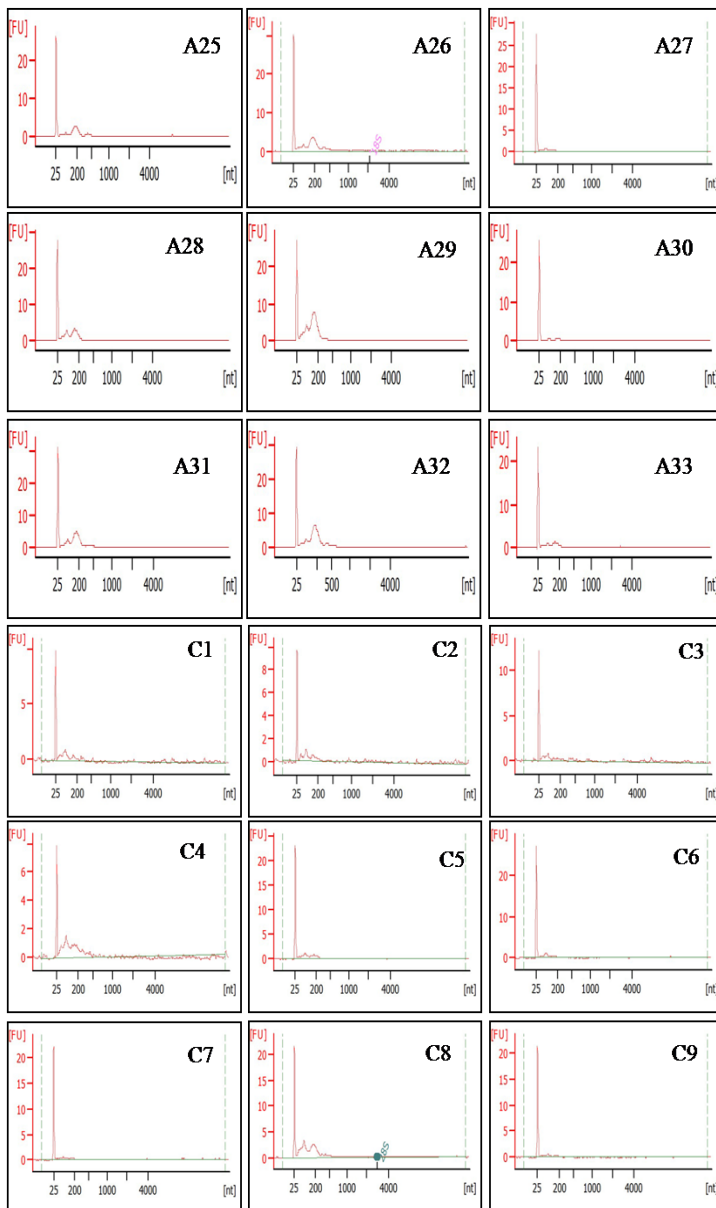
APÊNDICE C – Eletroferogramas do equipamento Bioanalyzer das amostras utilizadas no microarranjo



[FU] Unidade de Fluorescência



[FU] Unidade de Fluorescência



[FU] Unidade de Fluorescência