



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Carina de Fátima de Síbia

**Perfil de expressão de microRNAs em pacientes
com Doença Inflamatória Intestinal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Saad Hossne
Coorientadora: Profa Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientadora: Profa Dra. Lígia Yukie Sassaki
Colaboradora: Dra Jovita Ariede

Botucatu
2017

Carina de Fátima de Síbia

**Perfil de expressão de microRNAs em pacientes com
Doença Inflamatória Intestinal**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Saad Hossne
Coorientadora: Profa Dra. Patricia Pintor dos Reis
Coorientadora: Profa Dra. Lígia Yukie Sasaki
Colaboradora: Dra Jovita Ariede

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Síbia, Carina de Fátima de.

Perfil de expressão de microRNAs em pacientes com Doença
Inflamatória Intestinal / Carina de Fátima de Síbia. -
Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rogério Saad Hossne
Coorientador: Patricia Pintor dos Reis
Coorientador: Lígia Yukie Sasaki
Capes: 20804008

1. MicroRNAs. 2. Intestinos - Doenças. 3. Doenças
inflamatórias intestinais. 4. Crohn, Doença de.
5. Proctocolite.

Palavras-chave: Doença Inflamatória intestinal; Perfil de
expressão; Retocolite; MicroRNA.

Dedico este trabalho a minha Vó Maria e meu Tio Marcelo, que muitas vezes se doaram e renunciaram seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

Muitíssimo obrigada

*Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem
a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão.*

Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua.

*Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos
montes.*

*Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando
atravessarem os vales das perdas e das frustrações.*

*Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão
além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que
rompe a regra da lógica.*

*Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir,
só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber,
quando aprende a se doar.*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a **Deus**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, em especial ao Programa de Pós-Graduação Bases Gerais da Cirurgia.

Ao Dr Rogério Saad Hosnne, pela oportunidade de tê-lo como orientador.

À Dr. Patricia Reis, pela dedicação, disponibilidade, compreensão e paciência frente as minhas limitações, confiança e grande apoio em todos os momentos.

À Dr Ligia Yukie Sasaki, pelos ensinamentos e colaboração.

À Dra. Jovita Ariede pela disponibilidade e colaboração na elaboração das analyses..

Ao Dr. Fábio Severino, pelo apoio e colaboração nas análises de bioinformática.

À minha chefe Dra. Maria Salete Sartori, pelo incentive, apoio e compreensão.

Ao meu namorado Alexandre Tsukada, pelo cuidado, carinho e paciência dedicado a mim, principalmente neste período.

Ao grupo de Doença Inflamatória Intestinal (DII), Elen Farinelli, Fernanda Lofiego, Rosemary Lino e Robertha Biondi, pela amizade, conselhos e pelo grande apoio e incentivo durante todo esse período.

À minha amiga Isabel Cristina pela amizade e por me apresentar ao grupo de DII.

Ao Ricardo Lopes do CIMED, pela disponibilidade, amizade e apoio.

RESUMO

Introdução: A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) são as duas principais doenças que compõem a doença inflamatória intestinal (DII). Estudos indicam que vários genes estão diferencialmente expressos em DC. vs. RCU. Entretanto, os mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão das diferentes formas da DII ainda não foram elucidados. Considerando que os microRNAs (miRNAs) são potentes reguladores da expressão gênica e têm papel importante em várias doenças humanas, estes podem constituir biomarcadores com potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico em DII. **Objetivos:** Identificar miRNAs desregulados em DII, distinguindo DC e RCU; identificar genes-alvo dos miRNAs alterados e redes de interação entre miRNAs e genes-alvo em DII. **Materiais e Métodos:** Foi utilizada estratégia de meta-análise para identificação de dados de expressão de miRNAs em DII. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 10 estudos para extração dos dados. Desses estudos, foram identificados miRNAs significativamente desregulados (nível de alteração ou $FC \geq 2$ e $p < 0,05$) e coletadas informações sobre o tipo e o número de amostras analisadas (soro, plasma ou tecido) de pacientes com DC ou RCU, plataformas utilizadas para análise de expressão de miRNAs e validação dos dados, entre outras. A seguir, foram aplicadas as ferramentas de bioinformática mirwalk 2.0 para predição de genes-alvo regulados pelos miRNAs e STRING e BiNGO para identificação de redes de interação entre miRNAs e genes-alvo e funções biológicas, respectivamente. **Resultados:** Entre os miRNAs com expressão aumentada, foram identificados 17 em DC e 62 em RCU. Entre os miRNAs com expressão diminuída, foram identificados 18 em DC e 31 em RCU. Os miRNAs que mostraram o maior número de interações com genes-alvo na DC foram: let-7a-5p, let-7b-5p, miR-199a-5p, miR-150-5p, miR-362-3p e miR-224-5p. Em RCU, os miRNAs desregulados e com maior número de interações foram miR-155-5p, miR-24-5p, miR-335-5p e miR-16-5p. **Conclusões e Perspectivas Futuras:** Foram identificadas redes de interação entre miRNAs e genes-alvo associados a processos biológicos de inflamação e resposta imune. Os miRNAs identificados modulam vias moleculares potencialmente envolvidas na patogênese da DII. Estudos como esse podem contribuir para a melhoria do diagnóstico e no desenvolvimento de tratamentos direcionados e mais precisos para pacientes com DC e RCU.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Delineamento do estudo de meta-análise.

FIGURA 2: Diagrama de Venn mostrando os miRNAs com expressão aumentada, comuns e exclusivos a Doença de Crohn ou Retocolite Ulcerativa.

FIGURA 3: Diagrama de Venn mostrando os miRNAs com expressão diminuída, comuns e exclusivos a Doença de Crohn ou Retocolite Ulcerativa.

FIGURA 4 Rede de interação entre miRNAs identificados com expressão aumentada e seus genes-alvo em DC, os quais possuem funções associadas à regulação do sistema imune. Na figura, podemos observar que os miRNAs let-7b-5p e miR 199a-5p interagem com um grande número de genes. Os triângulos vermelhos representam expressão aumentada.

FIGURA 5: Rede de interação entre miRNAs identificados com expressão diminuída e respectivos genes-alvo em DC, os quais atuam principalmente em mecanismos de resposta inflamatória e na regulação do sistema imune. Na figura podemos observar que os miRNAs miR-150-5p e miR-362-3p regulam um grande número de genes. Os triângulos verdes representam expressão diminuída.

FIGURA 6: Rede de interação entre miRNAs identificados com expressão aumentada e genes-alvo em RCU, os quais estão associados à mecanismos de resposta inflamatória e regulação do sistema imune. Na figura podemos observar que os miRNAs miR-155-5p e miR-24-3p regulam um grande número de genes. Os triângulos vermelhos representam expressão aumentada.

FIGURA 7: Rede de interação entre miRNAs com expressão diminuída e seus genes-alvo em RCU, os quais atuam em mecanismos de regulação da resposta inflamatória do sistema imune. Na figura podemos observar que o miR-335-5p interage com um grande número de genes. Os triângulos verdes representam expressão diminuída.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Descrição dos artigos utilizados na meta-análise.

TABELA 2: miRNAs desregulados nas amostras de pacientes com Doença de Crohn.

TABELA 3: miRNAs desregulados nas amostras de pacientes com Retocolite
Ulcerativa.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada em DC.

GRÁFICO 2: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída em DC.

GRÁFICO 3: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada em RCU.

GRÁFICO 4: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída em RCU .

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

ADA	Adalimumabe
API5	Inibidor da apoptose -5
BCL2	Linfoma de células B - 2
BCLXL	Linfoma de células B extra-grande
CRC	Câncer de colorretal
CXC	Receptor de quimiocina
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	cido desorribonucleico
IFN-γ	Interferon gama
IFX	Infliximabe
IKBa	Fator nuclear kappa inibidor de células B, alfa
IRS-1	Substrato do receptos de insulina-1
K-RAS	Kisrten rat sarcoma viral oncogene
miR(s),miRNA(s)	Micro cido ribonucleico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MMP9	Matrix metalopeptidase 9
NF-kB	Fator Nuclear-Kappa B
NOS2	xido nitrico sintase
qPCR	PCR quantitativo
RCU	Retocolite Ulcerativa
RNAs	cido Ribonucleico
SNPs	Polimorfismo de nucleotide nico

STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
Th1	Células <i>T-helper</i> tipo 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
pré-miRNA	MiRNA precursor
pri-miRNA	Transcrito primário longo
GO	Gene Ontology
UTR	Região não traduzida

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença Inflamatória Intestinal	1
1.2 Doença de Crohn	3
1.3 Retocolite Ulcerativa	5
1.4 Mirnas: Biogênese e papel em doenças humana.....	8
1.5 Mirnas em doença inflamatória intestinal	10
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Estratégias de busca	15
3.2 Critérios de inclusão e exclusão	15
3.3 Extração dos dados.....	16
3.4 Análise dos dados	20
3.4.1 Análise de predição dos genes-alvo e redes de interação mirna- mrna em doença inflamatória intestinal	20
4. RESULTADOS	22
4.1 Perfil de expressão de mirnas desregulados na doença inflamatória intestinal	22
4.2 Predição de genes-alvo regulados por miRNAs	26
4.3 Processos biológicos	31
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são as duas principais doenças que compõem a doença inflamatória intestinal (DII). As principais manifestações clínicas ocorrem no trato gastrointestinal, em especial no intestino delgado e no cólon (1).

A prevalência e incidência destas doenças variam muito de acordo com a região e os métodos empregados no diagnóstico. Em países ocidentais, a prevalência fica entre 8 e 214 casos/1000,000 habitantes para RCU e 21 e 294/1000,000 para DC (2).

No Brasil os estudos epidemiológicos são escassos e de modo geral restritos a determinadas regiões do país. Dados do Governo Federal mostram que a região Norte é a que apresenta o menor número de internações relacionadas à DII (1,16/1000.000 habitantes/ano), seguida pelas regiões Nordeste (2,17/1000.000 habitantes/ano), Sudeste (2,42/1000.000 habitantes/ano), Sul (3,07/1000.000 habitantes/ano) e Centro-Oeste (3,32/1000.000 habitantes/ano) (3).

As DIIs ocorrem em ambos os sexos, embora exista uma discreta predominância do sexo feminino nos pacientes com DC, sugerindo a influência de fatores hormonais (3). Já na RCU essa predominância parece ser discretamente a favor do sexo masculino (4). Ambas as doenças apresentam predominância em indivíduos caucasianos, indicando uma correlação com as influências ambientais como estilo de vida e alimentação, além de características genéticas desses indivíduos. Esses fatores podem levar à modificação da resposta imune padrão e à formação de resposta inflamatória alterada (3).

A distribuição das DIIs é bimodal, sendo que o primeiro pico incide na faixa dos 15 aos 28 anos e o segundo entre 50 e 80 anos(1). Por ocasião do diagnóstico, observa-se que a média de idade dos pacientes portadores de RCU é aproximadamente 10 anos maior quando comparada com os pacientes com DC, sendo que a maioria desses últimos é diagnosticada no primeiro pico de incidência (1).

Com relação à distribuição anatômica, nos pacientes jovens, a DC tende a localizar-se mais frequentemente no intestino delgado, principalmente na região do íleo. Por outro lado, nos pacientes tardios, ou seja, no segundo pico, a doença localiza-se preferencialmente nos segmentos colônicos (5).

Acredita-se que a etiopatogenia da DII está relacionada à resposta imunológica anormal à microbiota bacteriana da luz intestinal, associada a alterações na função de barreira mucosa. Isso ocorre, pois o epitélio intestinal representa uma barreira física para a entrada de bactérias. Suas células revestidas por receptores de membrana específicos são capazes de distinguir entre bactérias comensais e invasoras, orientando sua destruição e mantendo a homeostasia do sistema imune intestinal (6).

Porém, para o desenvolvimento da DII, observa-se que não basta apenas alteração da barreira da mucosa intestinal. Há fatores socioambientais, microbiológicos, imunológicos e genéticos que também estariam envolvidos como fatores de risco, de início e de manutenção da doença (6).

O risco de desenvolvimento de DC em um familiar de primeiro grau de um paciente com DC é de 5-8%, enquanto o risco de desenvolvimento de RCU em familiar de primeiro grau de um paciente com RCU é de 2-5%. O risco relativo de DC em familiares de primeiro grau é de 4 a 15 vezes superior comparado com a população em geral, sendo que um em cada cinco pacientes com DC tem um familiar com DC (1).

A elucidação das bases genéticas da DC e da RCU poderá esclarecer os mecanismos moleculares e fisiopatogênicos envolvidos, ajudar a compreender as diferenças fenotípicas observadas, compreender as diferentes formas de apresentação, intensidade, extensão e respostas terapêuticas¹. Além disso, poderá contribuir para alcançar avanços terapêuticos direcionados a mecanismos moleculares específicos em DC vs. RCU.

1.2 Doença de Crohn (DC)

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, mas os locais mais comumente envolvidos na apresentação são o íleo terminal, a válvula ileocecal e o ceco (7). A doença é limitada ao intestino delgado em cerca de 40% dos pacientes; o intestino delgado e cólon estão ambos envolvidos em 30% e somente o cólon nos outros 30% dos pacientes (7). A presença de áreas múltiplas, separadas e nitidamente delineadas da doença, resultando em lesões em salto, é característica comum da DC e pode ajudar na diferenciação da RCU (7).

É causada por alterações nas células *T-helper* tipo 1 (Th 1), a qual tem um padrão de resposta imune que inclui aumento da produção de interleucina 2 e interferon gama (IFN- γ), os quais ativam os linfócitos citotóxicos e macrófagos (8). Esses atuam sobre as citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e consequentemente ativam as interleucinas 12 e 18. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e tem papel crítico na inflamação. Pacientes com DC têm aumento na produção de TNF- α , o qual resulta em concentrações elevadas de TNF- α nas fezes, sangue e mucosa (8).

Como a DC geralmente inicia-se na idade adulta precoce, causa grande impacto na qualidade de vida e capacidade laboral dos pacientes, devido à ocorrência de complicações como abscessos, fístulas, obstrução do intestino delgado e infecções, as quais podem levar à hospitalização e/ou cirurgias. O alto índice de complicações também contribui para gastos elevados com saúde (9). Além disso, pacientes com DC ativa têm maior nível de estresse, angústia, ansiedade e qualidade de vida inferior, em relação aos pacientes com doença inativa (10)

Clinicamente, a DII caracteriza-se por inflamação e ulcerações da mucosa intestinal. A inflamação transmural, acometendo todas as camadas da parede, predispõe ao desenvolvimento de fístulas com penetração a órgãos adjacentes, tecidos e pele. Aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolve fístulas e 70% desses necessitam de cirurgia devido a abscessos resultantes da evolução natural da doença (10).

São visualizadas ulcerações mucosas superficiais (úlceras aftosas), acompanhado de edema mucoso e submucoso e um aumento do número de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (7). Verifica-se, muito frequentemente, a destruição da arquitetura da mucosa, com alterações regenerativas nas criptas e distorção vilosa. São, também, visualizadas longas úlceras profundas semelhantes a fissuras e a hialinização vascular e a fibrose tornam-se evidentes (7). A principal característica é a visualização de agregados linfóides nodulares transmuralis, acompanhados por alterações proliferativas da mucosa e dos nervos plexos submucosos e mioentérico. Podem também estar presentes granulomas, principalmente na submucosa. Estes granulomas são agregados de células epitelióides, envolvidos por linfócitos (7). Podem ainda estar presentes células gigantes multinucleadas e centros de granulomas constituídos por material hialino sendo raramente observada a presença de necrose (7). Na ausência de inflamação da mucosa em exame de biópsia, não se pode assumir que o paciente

encontra-se em fase de remissão da doença, devido à característica descontínua da doença ([11](#)).

A DC pode se manifestar de diferentes formas clínicas e com diferentes extensões; o quadro inicial pode ser bastante grave ou muitas vezes insidioso, sugerindo que características genéticas individuais em associação com fatores ambientais desempenham um papel importante na apresentação da doença e na resposta ao tratamento ([9](#)).

A terapia convencional para o manejo da DC inclui diversas drogas, como aminossalicilatos, tiopurinas, metotrexato e corticóides¹⁶. A azatioprina e metotrexato são as únicas drogas do tratamento convencional que têm demonstrado eficácia como poupadores de corticóides. Entretanto, são agentes associados a vários efeitos adversos e têm início de ação relativamente lento ([9](#)).

Devido a limitada eficácia e os efeitos adversos dos tratamentos convencionais, foram desenvolvidas terapias biológicas com ação inibidora do TNF- α , as quais vêm apresentando significativa eficácia no controle dos sintomas da DII. Entre essas, o Infliximabe (IFX), o Adalimumabe (ADA) e o Certolizumabe Pegol para o tratamento de pacientes com DC ([12](#)).

1.3 Retocolite Ulcerativa (RCU)

Na RCU a inflamação está restrita a mucosa intestinal colônica e pode se manifestar desde uma forma leve até uma colite grave com comprometimento sistêmico. A doença pode restringir-se ao reto, acometer o hemicílon esquerdo ou todo o cólon. A RCU é classificada como: **Proctite** quando envolve apenas o reto, **Proctossigmóidite** quando

afeta o reto e o cólon sigmóide, **Colite** esquerda quando afeta o lado esquerdo do intestino grosso e **Pancolite** quando há inflamação generalizada do cólon (10).

Essas diferentes formas de apresentação, tanto em termos de extensão como em intensidade de inflamação, têm como um dos principais fatores as características genéticas individuais, ainda pouco elucidadas¹⁹. A RCU uma doença que evolui por surtos, ocorrendo períodos de exacerbação e remissão das lesões e dos sintomas, às vezes ao longo de muitos anos (10).

O quadro clínico consiste em episódios de diarreia de intensidade moderada a severa, na maioria das vezes acompanhada de sangue vivo, associados à urgência evacuatória ou tenesmo; a severidade da diarreia tende a correlacionar-se com a extensão e a intensidade da inflamação colônica (10).

Assim como na DC, as manifestações sistêmicas como fadiga, febre, anorexia e emagrecimento, são também encontradas na maioria dos pacientes com RCU. A dor abdominal é variável de acordo com a intensidade da inflamação, sendo em geral leve a moderada, podendo tornar-se severa nas complicações, tais como no megacólon tóxico, que carrega um risco de perfuração (13).

As alterações inflamatórias ficam limitadas à mucosa e à submucosa superficial, sem acometimento das camadas mais profundas, exceto na presença de doença fulminante (13).

Na RCU é comum a alteração da arquitetura e a redução do número de criptas do cólon ou até a atrofia da mucosa. Também é freqüente a presença de anormalidades glandulares, de congestão vascular na mucosa, com edema e hemorragia, assim como infiltrados de células inflamatórias de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Os neutrófilos invadem o epitélio, habitualmente as criptas, dando origem a uma criptite, podendo evoluir para a formação de abscessos das criptas(14) A presença de

plasmócitos e múltiplos agregados linfoides basais, aliada à alteração da arquitetura das criptas sugere a presença de processo inflamatório crônico ([14](#)).

O tratamento convencional recomendado para pacientes com RCU deve ser escalonado e progressivo (*step-up*), de acordo com a gravidade da doença. Portadores de doença leve devem ser tratados com aminossalicilatos, enquanto pacientes com quadro moderado e grave devem ser tratados com imunossuppressores e terapia biológica, sendo estas drogas as mesmas utilizadas no tratamento da DC ([12](#)).

Com a finalidade de melhor caracterizar o grau de atividade da doença inflamatória intestinal e a diversidade clínica dessa afecção, classificações e índices de atividades foram criados (Truelove e Witts e a Classificação da Clínica Mayo) ([15](#)).

Assim sendo, a DII envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda são desconhecidos e não há um método “padrão-ouro” para avaliar a gravidade da inflamação e diferenciar os subtipos clinicamente distintos das DII ([3](#)). Estudos indicam que muitos genes estão alterados em DC e RCU, além daqueles envolvidos na resposta imune. Adicionalmente, ressalta-se a importância de mecanismos de regulação gênica, por meio da ação de RNAs não codificadores, como os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são RNAs pequenos, de ~18-22 nucleotídeos de comprimento, não codificadores de proteínas e importantes reguladores pós-transcricionais de genes codificadores de proteínas ([17](#)). De acordo com dados do miRBase (data de acesso: 27 de Dezembro, 2016) (www.mirbase.org), um banco de dados que fornece informações integradas sobre sequências de miRNAs, foram descritos e caracterizados 2.588 miRNAs no genoma humano ([16](#)). Nos últimos anos, os miRNAs têm sido evidenciados como importantes moduladores da resposta imune ([17](#)). Neste contexto, a identificação de alterações na expressão de miRNAs em DC vs. RCU deve contribuir para a

caracterização dos mecanismos moleculares da patogênese da DII. Além disso, miRNAs podem constituir biomarcadores clinicamente relevantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e ou impactar o desenvolvimento de terapêuticas mais precisas para pacientes com essas doenças.

1.4 miRNAs: biogênese e papel em doenças humanas

A biogênese dos miRNAs tem início com a formação de um transcrito primário longo (pri-miRNA) em forma de grampo (hairpin), o qual é sintetizado pela enzima RNA polimerase II, a partir do DNA genômico. No núcleo celular, a enzima Drosha (uma RNase III) cliva este pri-miRNA, formando um complexo de ~650KDa acoplado ao co-fator DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8*) ([18](#), [19](#)).

O DGCR8 contém dois domínios de ligação de RNA dupla fita (dsRNA). A atividade desse complexo em uma molécula de pri-miRNA resulta em um miRNA precursor (pré-miRNA) em forma de hairpin e de ~70 a 100 nucleotídeos de comprimento ([20](#), [21](#)). Posteriormente a proteína Exportina-5 exporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer (RNase III) em conjunto com o complexo TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*), cliva a região do *loop* originando um RNA de fita dupla (dsRNA) de ~22 nucleotídeos; essa molécula é denominada miRNA. O miRNA maduro de fita simples é então incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*). O complexo RISC contém uma família de proteínas denominada Argonata (Ago 1 e Ago 2) e a proteína TRBP ([20](#), [21](#)).

Como resultado desse processo, a fita funcional do miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional; o mecanismo canônico de regulação

ocorre pela ligação, por pareamento complementar de bases, da extremidade 5' do miRNA (denominado de sequência *seed*) à extremidade 3' não traduzida (3' UTR) do mRNA, levando à inibição da tradução do mRNA por homologia incompleta ou à degradação do mRNA por homologia completa ([20](#), [21](#)).

No câncer, os miRNAs podem desempenhar papéis como oncogenes ou genes supressores tumorais, sendo conhecidos como oncomiRs. Alguns miRNAs, como o miR-21, apresenta expressão aumentada em diversos tipos de carcinomas e foi demonstrado envolvido em vias de inflamação proliferação celular, invasão e metástase ([1](#)). Esse miRNA também foi associado com infiltração de macrófagos e expressão de NOS2 em DII (RCU ativa). Macrófagos e óxido nítrico sintase 2 (NOS2) são dois componentes relacionados com a senescência e com a via de resposta ao dano no DNA (*DNA Damage Response Pathway*) ([22](#)). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ou mutações podem ocorrer nos genes codificadores de miRNAs ([22](#)), levando à alterações nos sítios de ligação dos miRNAs, os quais podem passar a modular diferentes genes. Esse mecanismo pode levar a alterações no fenótipo e, eventualmente, implicar na susceptibilidade ao desenvolvimento de DII ([23](#)).

Os miRNAs estão envolvidos em processos biológicos importantes, tais como desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular ([24](#)). Desempenham papéis importantes em doenças humanas, incluindo doenças crônico-degenerativas. miRNAs têm sido evidenciados como biomarcadores com potencial utilidade clínica no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento de pacientes com câncer ([25](#), [26](#)). Uma característica importante dos miRNAs é a sua estabilidade e facilidade de detecção em fluidos corporais. Portanto, a expressão de miRNAs pode ser quantificada em amostras clinicamente relevantes, tais como plasma ou soro. De fato,

estudos têm demonstrado a utilidade de análise de perfis de expressão de miRNAs como biomarcadores no plasma ou no soro humano ([19](#), [27](#), [28](#)).

Estes fatores indicam que os miRNAs podem constituir ferramentas para o diagnóstico, bem como moléculas potenciais para utilização no tratamento direcionado de doenças.

1.5 miRNAs em Doenças Inflamatórias Intestinais

Alterações em miRNAs em pacientes com DII foram descritas pela primeira vez por Wu F. e colaboradores em 2008 ([29](#)). Nesse estudo, amostras de mucosa de pacientes com RCU ativa apresentaram níveis aumentados de 8 miRNAs e diminuídos de 3 miRNAs em comparação com amostras de pacientes que não apresentavam RCU. Esses autores observaram que o miR-192, normalmente expresso em células epiteliais do cólon, estava significativamente reduzido em tecidos de cólon de pacientes com RCU ativa ([29](#)). O miR-192 foi demonstrado regular negativamente a expressão de peptídeo 2-alfa macrófagos inibitório, uma quimiocina CXC expressa em células epiteliais ([30](#)).

A identificação do perfil global de expressão de miRNAs circulantes foi realizada em um estudo incluindo 20 pacientes com RCU e 20 indivíduos controle (sem doença) ([17](#)). Por meio de uma análise de microarranjos de miRNAs, os autores identificaram 31 miRNAs diferencialmente expressos em indivíduos com RCU vs. controles. O perfil de expressão de miRNAs circulantes mostrou precisão de 92,8%, especificidade de 96,2% e sensibilidade de 89,5%, sugerindo que os miRNAs identificados podem constituir biomarcadores com utilidade no diagnóstico não invasivo de RCU ([17](#)).

Perfis de expressão de miRNAs se alteram durante a progressão histológica de um tecido normal para um tecido displásico, como também em tecidos de pacientes com DII ([31](#)). A avaliação de um grupo de pacientes com RCU ativa em comparação com

pacientes com RCU inativa mostrou padrões distintos de expressão de miRNAs associados com a forma ativa vs. inativa da doença (32). A expressão diferencial de miRNAs também foi relatada em várias condições auto-imunes, tais como a psoríase, artrite reumatóide, lúpus e asma (33).

O papel dos miRNAs na resposta imune inata e adaptativa tem sido cada vez mais reconhecido. Enquanto alguns miRNAs estão comumente desregulados em doenças auto-imunes, a maioria é específico de cada doença. Essa diferença sugere que alguns miRNAs podem estar envolvidos na resposta imunológica crônica, enquanto outros apenas na inflamação aguda (34, 35).

Embora a DC e a RCU sejam os dois tipos predominantes da DII, classificados de acordo com a história clínica do paciente, extensão e aparência histológica da doença, além de diferentes mediadores imuno-celulares e perfis de expressão de citocinas circulantes, aproximadamente 5-10% dos pacientes têm características ambíguas, colocando-os numa categoria de colite indeterminada (36). Níveis de expressão diferenciada de cinco miRNAs (miR-19b, miR-23b, miR-106, miR-191 e miR-629) possibilitaram distinguir o subtipo da DII de 16 pacientes com doença inflamatória intestinal indeterminada. Destes, 15 pacientes tiveram padrões de expressão de miRNAs muito semelhantes àqueles com RCU (36).

Pacientes portadores de DII de longa evolução têm risco aumentado de desenvolvimento câncer colorretal (CRC). Considera-se que 5-10% dos casos de CRC ocorre devido à alterações genômicas do tipo instabilidade de microssatélites (MSI), as quais podem ocorrer como consequência de mutações em genes de reparo a erros no pareamento do DNA (. Dois miRNAs, miR-155 e miR-21, relacionados com inflamação, apresentaram expressão aumentada não apenas na mucosa do cólon de pacientes com DII sem CRC, mas também em tecidos tumorais de pacientes com DII em comparação com amostras

controle de indivíduos saudáveis . Assim, alterações dos miRNAs, miR-155 e miR-21, podem constituir um evento pré-neoplásico para o desenvolvimento de CRC devido a MSI em pacientes com DII ([37](#)).

Acredita-se que os miRNAs miR-143 e miR-145 atuem como supressores tumorais em CRC, uma vez que esses inibem o crescimento das células tumorais e são reprimidos em tumores do cólon ([38](#)). Na RCU, esses miRNAs estavam com expressão significativamente diminuída e os níveis de expressão de seus genes-alvo (*IRS-1*, *K-RAS*, *API5* e *MEK-2*) aumentados, os quais desempenham papéis importantes na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose ([38](#)).

Analizando a expressão de miRNAs em biópsias de mucosa do cólon de pacientes com DII e indivíduos saudáveis, foram identificados cinco miRNAs (miR-20b, miR-99a, miR-203, miR-26b, e miR-98) com expressão alterada em amostras de RCU ativa, em comparação com RCU inativa e controles ([39](#)). Dois miRNAs, miR-125b-1-3p e let-7e-3p, estavam com expressão aumentada (5 vezes maior) em pacientes com RCU inativa em relação a RCU ativa e controles. Quatro miRNAs (miR-20b, miR-98, miR-125b-1-3p, e let-7e-3p) foram validados pela PCR quantitativa (QRT-PCR) e estavam com expressão alterada somente em amostras de pacientes com RCU, sugerindo que devem ser específicos desse subtipo de doença ([39](#)).

A expressão reduzida do miR-124 regula a atividade de STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), um fator importante na resposta inflamatória. Níveis de STAT3 fosforilada e os genes que regula (*VEGF*, *BCL2*, *BCLXL* e *MMP9*) estavam aumentados em tecidos do cólon de pacientes pediátricos com RCU ativa, em comparação com doença inativa ([40](#)).

Ao analisar 30 miRNAs presentes em amostras de biópsia de tecido do cólon, perfis distintos de miRNAs foram identificados em amostras de pacientes com DII vs. controle

(miR-26a, miR-29b, miR-126, miR-127-3p, miR-324-3p), como também entre os subtipos DC e RCU (miR-196b, miR-199a-3p, miR-199-5b, miR-150, miR-223) ([17](#)).

A expressão diferencial de miRNAs no sangue periférico ou no plasma podem ser ferramentas úteis para o diagnóstico e diferenciação dos subtipos da DII. As diferentes células imunológicas circulantes associadas com DC e RCU refletem a expressão alterada de miRNAs no sangue periférico ([41](#)). Por exemplo, o miR-126 pode desempenhar um papel importante na regulação da inflamação em doenças inflamatórias crônicas, agindo sobre o inibidor alfa do fator nuclear-kappa B (IkBa, IKBA ou NFKBIA), um importante inibidor da via de sinalização NF-kB. Em um grupo com RCU ativa, a expressão de miR-126 estava significativamente aumentada em relação à RCU inativa ([41](#)).

Embora os estudos citados acima indiquem o envolvimento de miRNAs em DII, a maioria dos estudos é baseado em um painel limitado de miRNAs e não há dados de expressão global de miRNAs circulantes e sua correlação com mecanismos de interação entre genes potencialmente regulados por miRNAs em DII. A análise de expressão de miRNAs integrada à análise de expressão dos genes-alvo regulados por miRNAs alterados, contribuirá para elucidar quais vias genéticas ou mecanismos estão associados à patogênese de DII. Particularmente, miRNAs podem constituir biomarcadores úteis na diferenciação de pacientes com DII ativa e inativa.

2. OBJETIVOS

1. Identificar perfis de expressão de miRNAs em DII, utilizando meta-análise de dados da literatura.
2. Aplicar estratégias de análise bioinformática para identificar:
 - 2.a. miRNAs-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs
 - 2.b. redes de interação entre miRNAs e mRNAs-alvo

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégia de Busca

A meta-análise foi realizada para a identificação de dados de expressão de miRNAs em DIIs (DC e RCU). Para tal, utilizamos pesquisa no banco de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com as palavras-chave “microRNA AND inflammatory bowel disease (mesh terms)”, “microRNA AND Crohn’s disease (mesh terms)”, “microRNA AND ulcerative colitis (mesh terms)”, no período de 02 a 07 de Junho de 2016. Para a seleção dos artigos, foram ativados filtros incluindo a data da publicação (artigos publicados nos últimos 10 anos, 2006-2016), estudos da doença em humanos, publicados na língua Inglesa e com texto disponível na íntegra.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

A) Critérios de inclusão: Estudos que analisaram expressão global de miRNAs em DIIs (D e RCU), incluindo tecidos, plasma e/ou soro humano, doença em indivíduo adulto, incluindo a análise de amostras controle, de indivíduos sem doença ou saudáveis, estudos incluindo validação dos dados e dados completos disponíveis publicamente ou como material suplementar.

B) Critérios de exclusão: Estudos utilizando exclusivamente modelos experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, revisão de literatura e relatos de casos.

3.3. Extração dos dados

O desenho do estudo da meta-análise seguiu as etapas da Declaração de Prisma ([42](#)) e está representado na **Figura 1**.

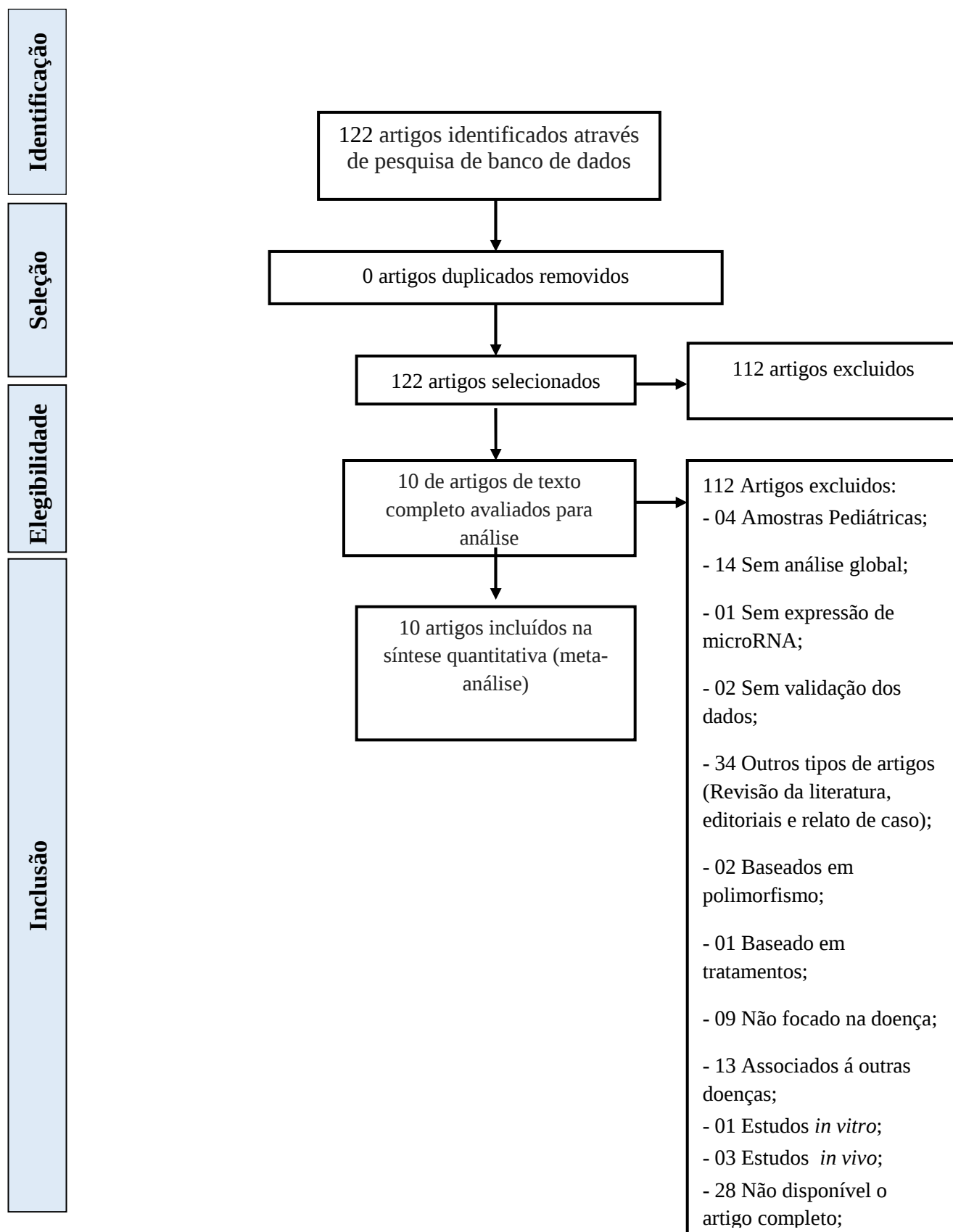


Figura1. Delineamento do estudo de meta-análise.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram incluídos 10 estudos, dos quais foram coletados os seguintes dados: miRNAs significativamente alterados, direção da alteração no nível de expressão (aumentada ou diminuída), tipo de amostra estudada (soro, plasma ou tecido), número de amostras de pacientes com DC e/ou RCU nos grupos teste e de validação dos dados, plataforma utilizada para análise da expressão global dos miRNAs, plataforma utilizada na validação dos dados, nome do autor e data da publicação. Estes dados estão apresentados na **Tabela 1**, abaixo.

Tabela 1. Descrição dos artigos utilizados na meta-análise.

Estudos incluídos	Tipo de Amostragem	Nº amostral (teste)	Plataforma utilizada no screening	P-value	Nº amostral validação	Plataforma utilizada na validação
Lin et al.2014	TC	CD (n=9) RCU (n=10)	Sequenciamento de alto desempenho (Illumina)	<0,05	N=18	QRT-PCR
Iborra et al. 2013	TC	CD (n=18) RCU (n=18)	miRNA array com sondas TaqMan®	<0,05	N=33	QRT-PCR
Schaefer et al. 2015	TC S	CD (n=33) RCU (n=23) CD (n=30) RCU (n=30)	miRCURY LNA microarray (Exiqon)		N=33 N=34	QRT-PCR
Duttagupta et al. 2012	S	RCU (n=20)	miRNA array (Affymetrix)	<0,05	N=20	QRT-PCR
Wu et al. 2010	TC	CD (n=6) RCU (n=5)	NCode Multi-Species miRNA microarray (Invitrogen)	<0,05	N=13	QRT-PCR
Goten et al. 2014	TC	CD (n=10) RCU (n=7)	miRNA array (Affymetrix)	<0,05	N=10	QRT-PCR
Wu et al. 2008	TC	CD (n=17) RCU (n=30)	NCode Multi-Species miRNA microarray (Invitrogen)	<0,05	N=15	QRT-PCR
Peck et al. 2015	TC	CD (n=21)	Sequenciamento de alto desempenho (Illumina)	<0,05	N=15	QRT-PCR
Coskun et al. 2013	TC	RCU (n=39)	Geniom Biochip miRNA array	<0,05	N=20	QRT-PCR
Wu et al. 2011	S	CD (n=19) RCU (n=23)	miRCURY LNA array (Exiqon)	<0,05	N=13	QRT-PCR

3.4. Análise dos dados

3.4.1 Análise de predição dos genes-alvo e redes de interação miRNA-mRNA em Doença Inflamatória Intestinal

Os miRNAs significativamente desregulados ($FC \geq 2$ e $p < 0,05$) foram utilizados em análise de bioinformática para identificação dos mRNAs-alvo preditos a serem regulados pelos miRNAs. Esta análise foi realizada durante o mês de Setembro de 2016, utilizando a ferramenta miRWalk 2.0, disponível em (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) (43-45). A ferramenta miRWalk permite a realização de uma análise abrangente dos possíveis sítios de ligação entre miRNAs e alvos moleculares (mRNAs), resultantes da comparação simultânea entre diferentes bancos de dados. A seguir, foi realizada pesquisa dos genes-alvo identificados no banco de dados Expression Atlas do Instituto de Bioinformática Europeu (*European Bioinformatics Institute*, EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) (data de acesso: 23 de Setembro de 2016). Esse banco de dados fornece informações sobre padrões de expressão gênica, permitindo realizar buscas pelo nome do gene ou proteína, fornecendo informações de quais genes são expressos em tecidos específicos (46). Portanto, essa busca foi realizada como estratégia de verificação da expressão dos genes-alvo identificados, em tecido intestinal.

Adicionalmente, realizamos análises de enriquecimento para a identificação das principais funções biológicas dos genes-alvo dos miRNAs, utilizando a ferramenta STRING 10.0 (<http://string-db.org/>) (data de acesso: 31 de Setembro de 2016). A ferramenta STRING consiste em um banco de dados biológicos e de identificação de interações entre proteínas, sendo que as interações identificadas podem ser

conhecidas/validadas ou preditas (47). Nessa análise, os genes-alvo identificados foram mapeados em suas respectivas proteínas, as quais por sua vez foram utilizadas para a identificação de interações na ferramenta STRING. A ferramenta Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) foi utilizada para visualização das redes de interação.

A seguir, foi realizada a análise de enriquecimento para identificação de funções biológicas das proteínas codificadas pelos genes-alvo dos miRNAs. A análise de enriquecimento resultou na identificação de categorias de Ontologia de Gene (*Gene Ontology*, GO), assumindo a seguinte estrutura estatística: avaliação da super-representação das categorias GO, hipergeométrica para sobre-representação, correção de teste múltiplo usando correção de Benjamini & Hochberg (FDR) com $p \leq 0,05$ e conjunto de referência: Genoma Inteiro.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil de expressão de miRNAs desregulados na Doença Inflamatória Intestinal

De acordo com o desenho desse estudo de meta-análise e os critérios de inclusão e exclusão (**Figura 1**), foram selecionados 10 estudos com dados completos de expressão de miRNAs em DC e RCU. A meta-análise identificou miRNAs com expressão diferencial estatisticamente significativa (definida como nível de alteração em relação às amostras controle, ou *fold change*, $FC \geq 2$ e $p < 0,05$) em plasma e/ou tecido intestinal de pacientes com DC e RCU. Nas amostras de pacientes com DC, foram identificados 35 miRNAs desregulados, sendo 17 miRNAs com expressão aumentada e 18 com expressão diminuída (**Tabela 2**). Nas amostras de pacientes com RCU, foi identificado um maior número de miRNAs desregulados (93) comparado com a DC, sendo 62 miRNAs com expressão aumentada e 31 com expressão diminuída (**Tabela 3**).

Tabela 2: miRNAs desregulados nas amostras de pacientes com Doença de Crohn.

Expressão aumentada	Expressão diminuída
miRNA	miRNA
miR-140-3p	miR-140-5p
miR-140-5p	miR-855-5p
miR-188-5p	miR-375-3p
miR-127-3p	miR-150-5p
miR-491-5p	miR-149-5p
miR-142-3p	miR-200b-3p
miR-142-5p	miR-224-5p
Let-7a-5p	miR-497-5p
Let-7b-5p	miR-505-3p
miR-26a-5p	miR-143-3p
miR-146b-5p	miR-29c-3p
miR-31-5p	miR-1247-5p
miR-223-3p	miR-196b-5p
miR-199a-5p	miR-378a-3p
miR-362-3p	miR-149-3p
miR340-3p	miR-199a-5p
miR-532-3p	miR-362-3p
	miR-532 -3p

Tabela 3: miRNAs desregulados nas amostras de pacientes com Retocolite Ulcerativa.

Expressão aumentada			Expressão diminuída	
miRNA			miRNA	
miR-140-3p	miR-31-5p	miR-138-5p	miR-516a-5p	miR-194-5p
miR-140-5p	miR-708-5p	miR-16-5p	miR-196b-3p	miR-335-5p
miR-532-5p	miR-223-3p	miR-23a-3p	miR-192-3p	miR-10b-3p
miR-142-5p	miR-27a-5p	miR-23b-3p	miR-141-3p	miR-338-5p
miR-199a-3p	miR-363-3p	miR-24-3p	miR-378a-3p	miR-19b-3p
miR-28-3p	miR-155-5p	miR-26a-5p	miR-378a-5p	miR-192 -5p
miR-548a-3p	miR-193b-5p	miR-29a-3p	miR-200a-3p	miR-629-5p
miR-501-5p	miR-150-5p	miR-126-3p	miR-194-3p	miR-629-3p
miR-146b-3p	miR-551b-5p	miR-126-5p	miR-200b-3p	miR-16-5p
miR-188-5p	miR-503-5p	miR-195-5p	miR-196b-5p	miR-505-5p
miR-362-5p	miR-146b-5p	miR-199a-5p	miR-192-5p	miR-28-5p
miR-769-3p	miR-212-3p	miR-28-5p	miR-10b-5p	miR-151-5p
miR-769-5p	miR-21-3p	miR-151-5p	miR-200b-5p	miR-505-3p
miR-330-3p	miR-29b-1-5p	miR-103-2-5p	miR-200c-3p	miR-199a-5p
miR-423-3p	miR-1273d	miR-340-3p	miR-200a-5p	miR-340-3p
miR-339-3p	miR-99b-3p	miR-362-3p	miR-196a-5p	
miR-361-3p	miR-146a-5p	miR-532-3p		
miR-509-3p	miR-584-5p	miR-3180-3p		
miR-671-3p	miR-29b-2-5p			
miR-628-5p	miR-21-5p			
miR-455-3p	let-7i-5p			
miR-548c-3p	miR-424-3			

A fim de avaliarmos a existência de relações entre miRNAs desregulados em DC vs. RCU, construímos diagramas de Venn (**Figuras 2 e 3**), utilizando o programa interactiveVenn ([48](#)). A Figura 2 mostra os miRNAs com expressão aumentada e a Figura 3 os miRNAs com expressão diminuída.

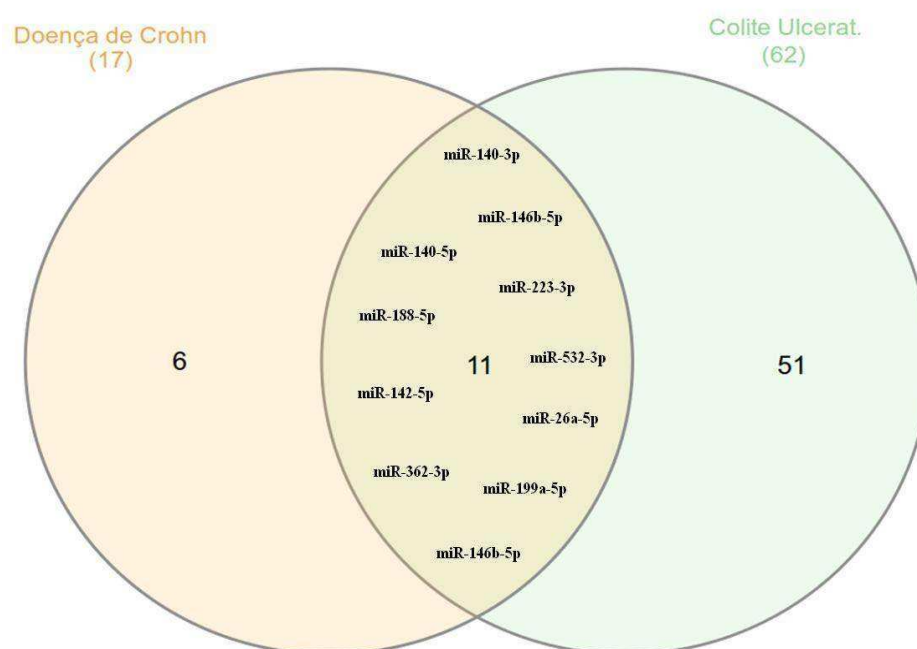


Figura 2: Diagrama de Venn mostrando os miRNAs com expressão aumentada, comuns e exclusivos a DC ou RCU.

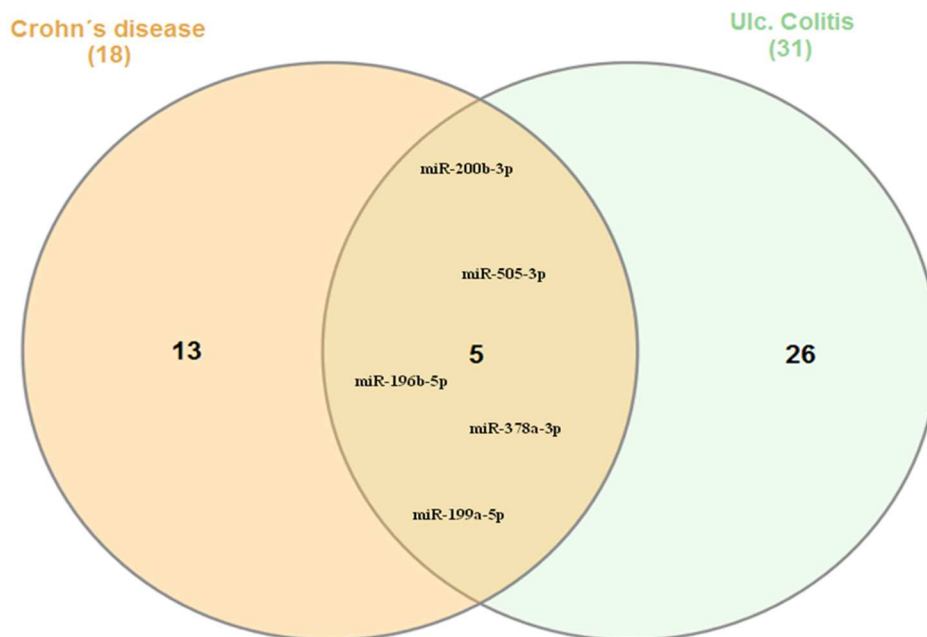


Figura 3. Diagrama de Venn mostrando os miRNAs com expressão diminuída, comuns e exclusivos a DC ou RCU.

4.2 Predição de genes-alvo regulados por miRNAs

Os dados da análise de predição demonstraram vários genes-alvo potencialmente regulados pelos miRNAs identificados, os quais codificam proteínas com funções biológicas importantes na DII. A lista de genes-alvos potencialmente regulados pelos miRNAs está disponível no link:

(<https://drive.google.com/file/d/0B8JG6RzgXyLcdGF1WTh2NTAzcTQ/view?usp=sharing>).

Nossos resultados revelaram um maior número de interações entre genes com funções biológicas no processo inflamatório e resposta do sistema imune. Esses genes estão apresentados nas redes de interação nas **Figuras 4, 5, 6 e 7**. Esse estudo de meta-análise permitiu identificar quais miRNAs possuem expressão alterada em DC vs. RCU, bem como os genes-alvo regulados por miRNAs e suas funções biológicas associadas a essas doenças.

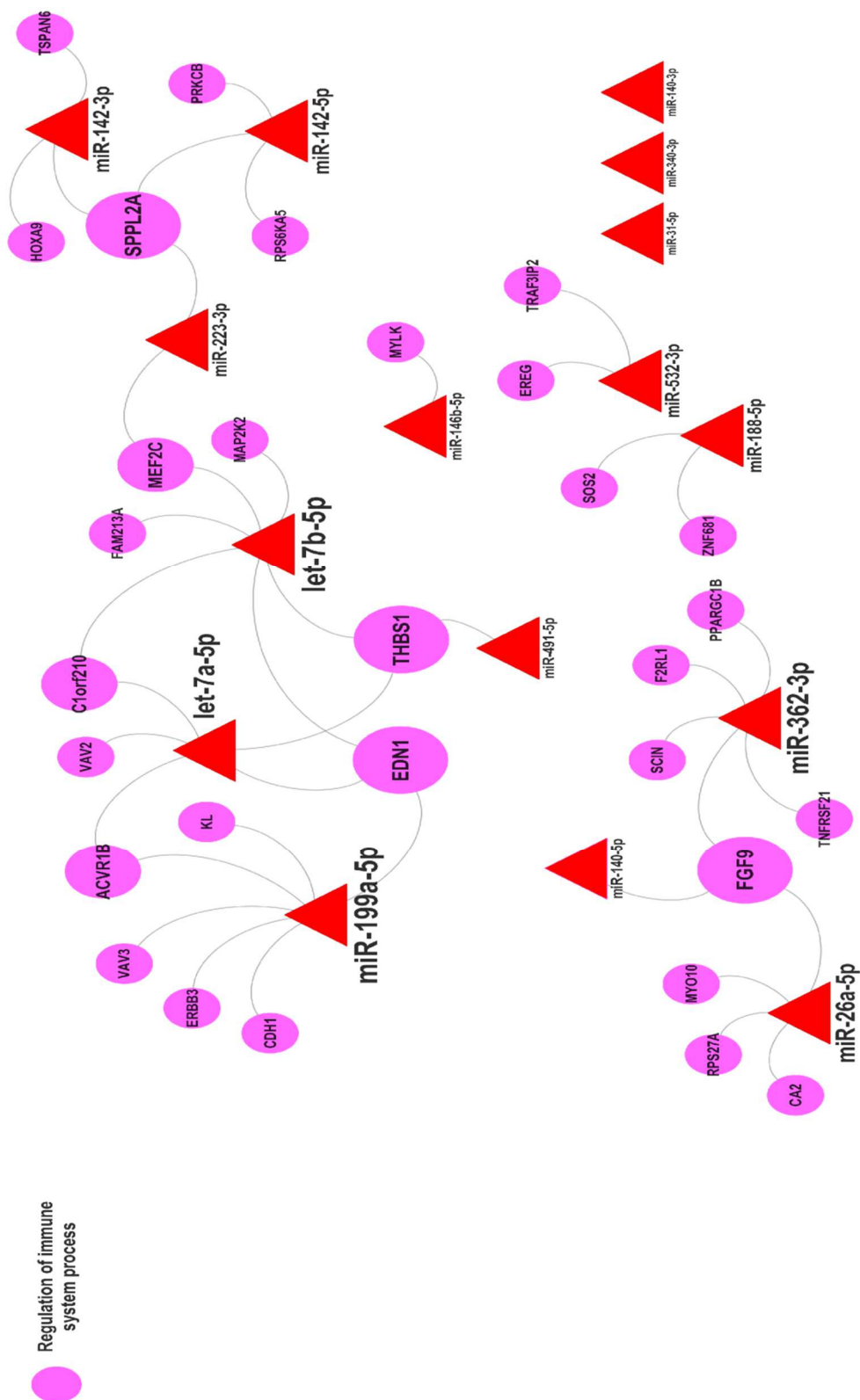


Figura 4: Rede de interação entre miRNAs identificados com expressão aumentada e seus genes-alvo em DC, os quais possuem funções associadas à regulação do sistema imune. Na figura, podemos observar que os miRNAs let-7b-5p e miR 199a-5p interagem com um grande número de genes. Os triângulos vermelhos representam expressão aumentada.

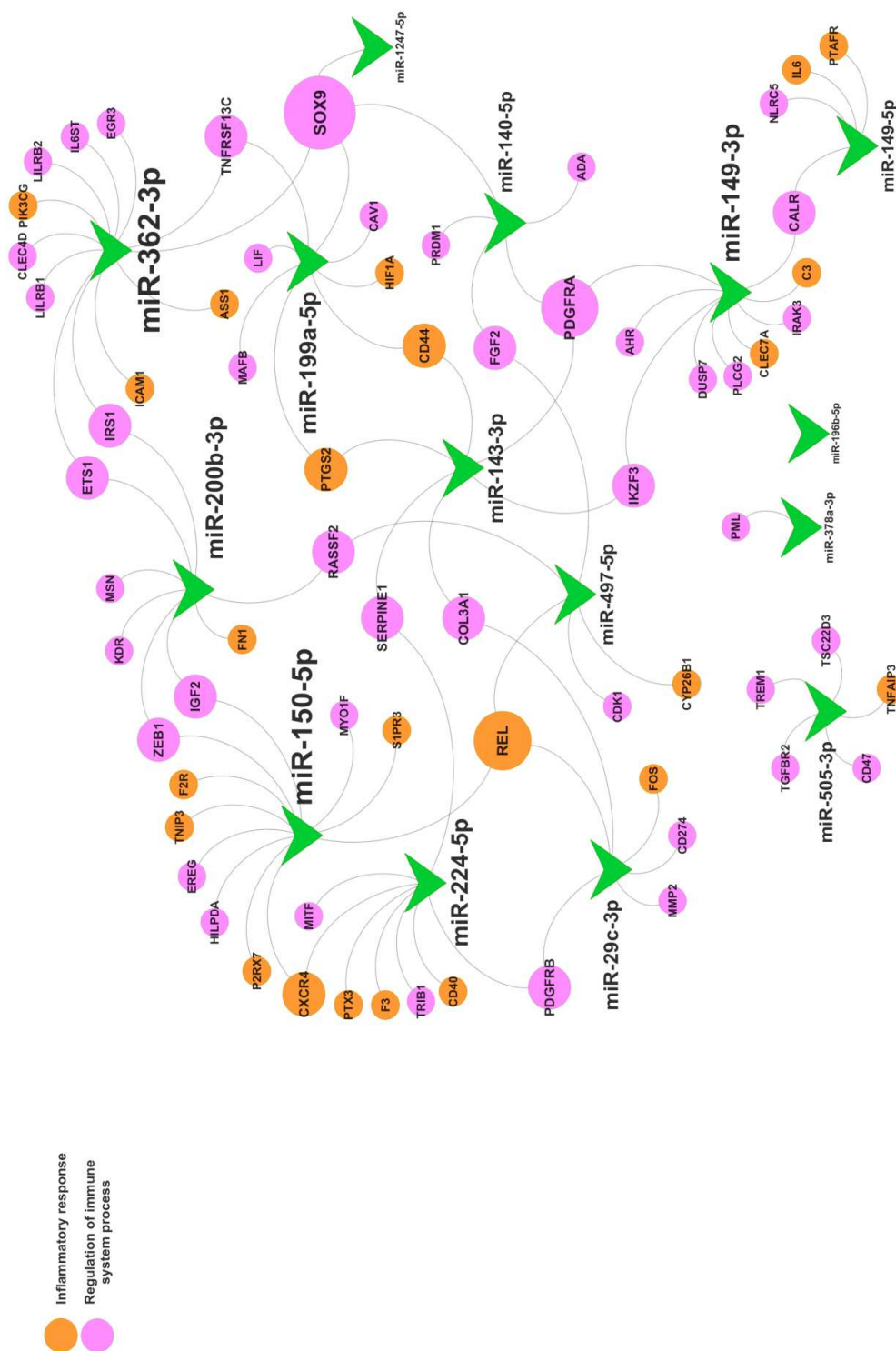


Figura 5: Rede de interação entre miRNAs identificados com expressão diminuída e respectivos genes-alvo em DC, os quais atuam principalmente em mecanismos de resposta inflamatória e na regulação do sistema imune. Na figura podemos observar que os miRNAs miR-150-5p e miR-362-3p regulam um grande número de genes. Os triângulos verdes representam expressão diminuída.

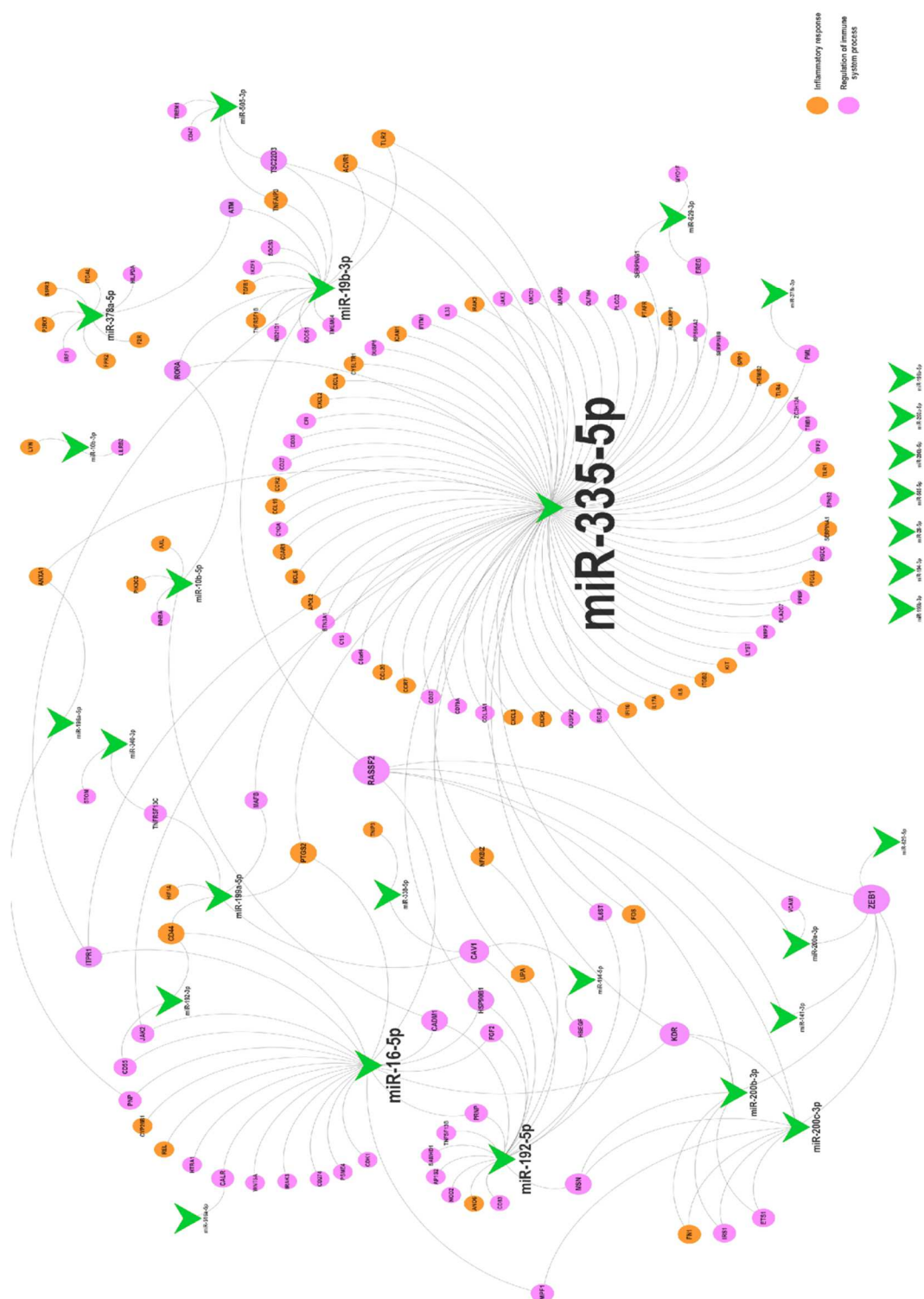


Figura 7: Rede de interação entre miRNAs com expressão diminuída e seus genes-alvo em RCU, os quais atuam em mecanismos de regulação da resposta inflamatória do sistema imune. Na figura podemos observar que o miR-335-5p interage com um grande número de genes. Os triângulos verdes representam expressão diminuída.

4.3 Processos biológicos

A análise de enriquecimento identificou os processos biológicos potencialmente envolvidos na DII. As funções biológicas enriquecidas e estatisticamente significativas, conforme identificado pela análise no banco de dados GO, estão apresentadas nos **Gráficos 1 e 2** para a DC e nos **Gráficos 3 e 4** para a RCU. Os dados completos da análise de enriquecimento/identificação das funções biológicas dos genes-alvo estão disponíveis no link:

<https://drive.google.com/file/d/0B8JG6RzgXyLcNmdMcjVVZm9vMDg/view>.

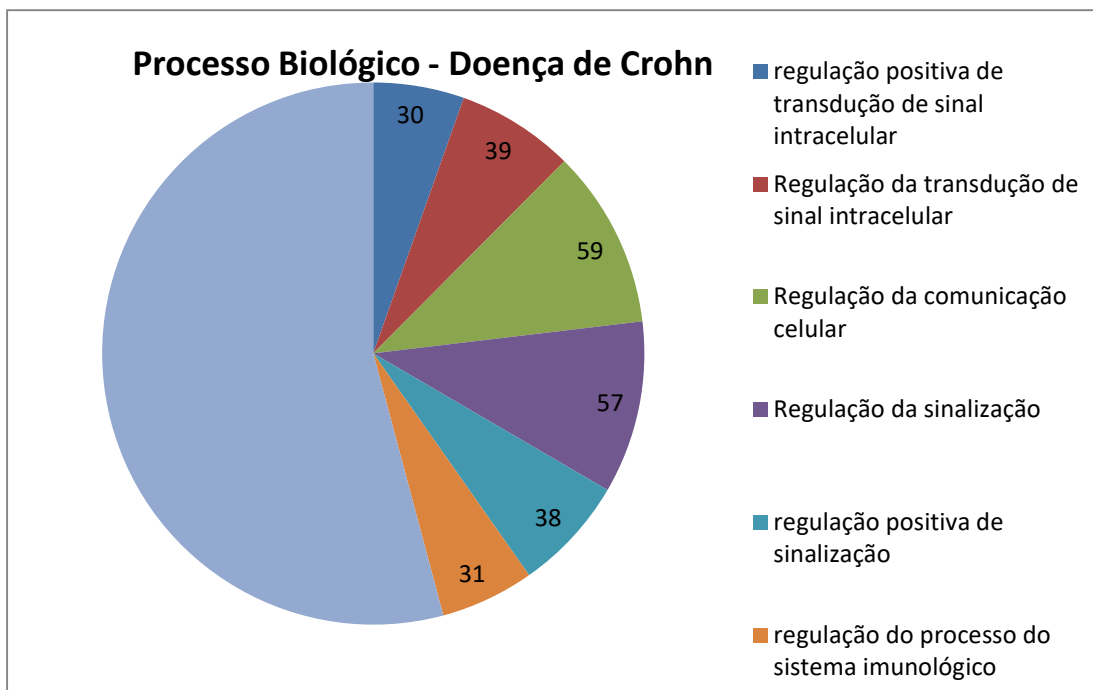


Gráfico 1: Processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada em DC.

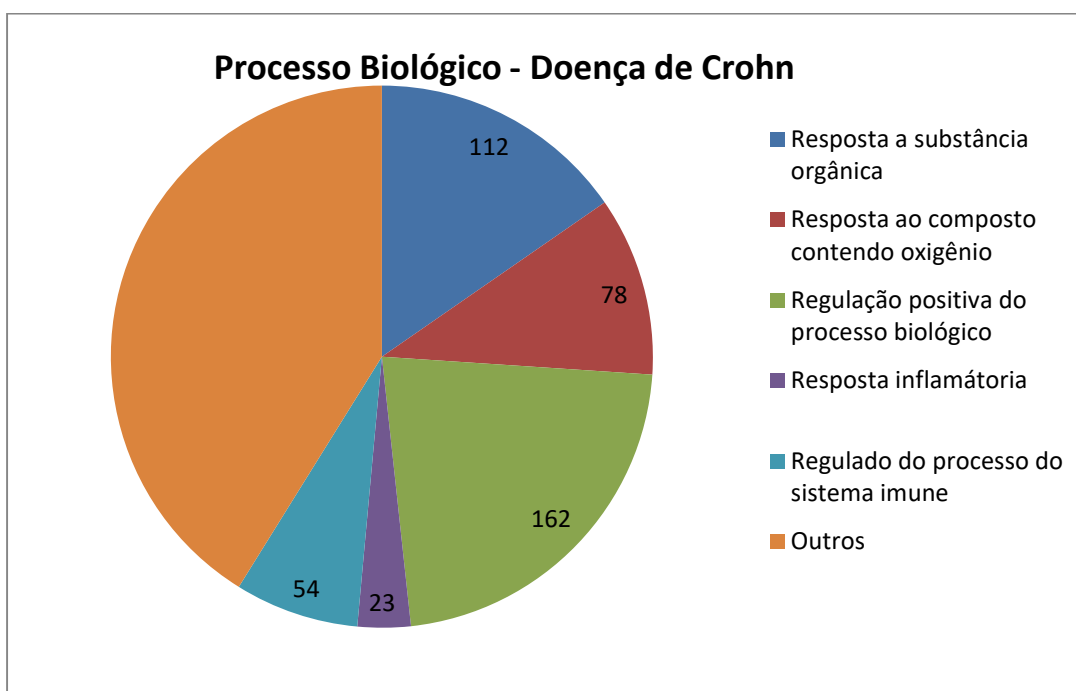


Gráfico 2: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída em DC.

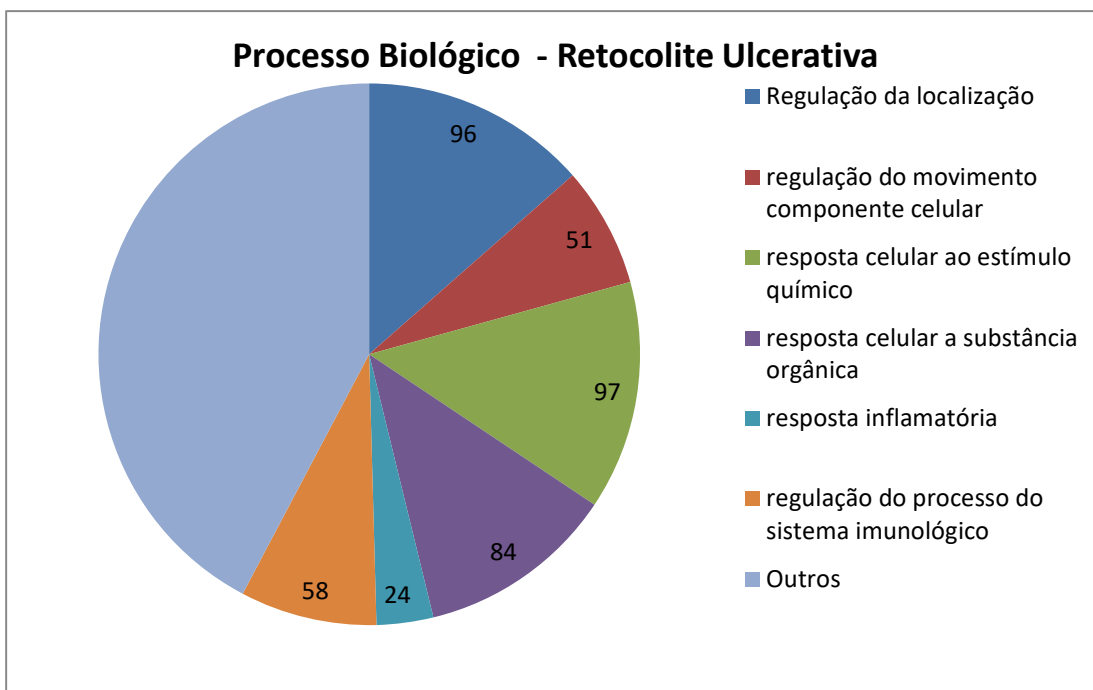


Gráfico 3: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada em RCU.

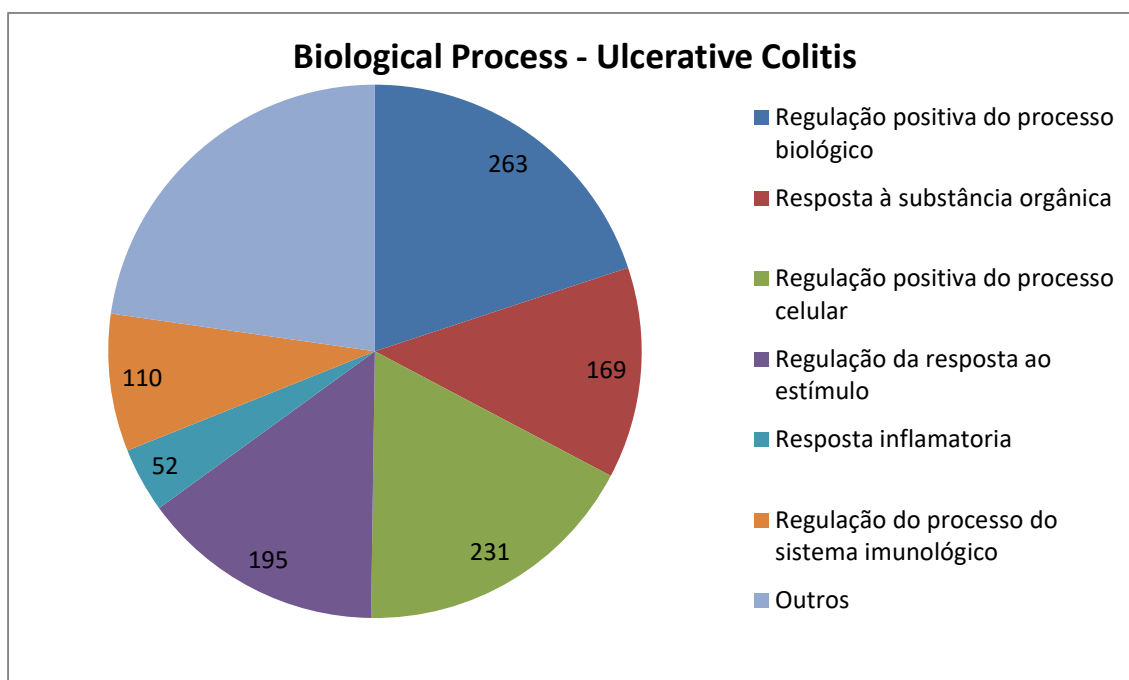


Gráfico 4: Principais processos biológicos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) associados com genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída em RCU .

Quanto às análises dos genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada na DC, foram identificados como principais processos biológicos, com os respectivos números de genes indicados em cada processo: regulação da comunicação celular (59 genes), regulação de vias de sinalização celular (57), regulação de transdução de sinal intracelular (39), regulação positiva de sinalização (38 genes), regulação do processo do sistema imunológico (31), regulação positiva de transdução de sinal intracelular (30).. Os genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída em DC estão envolvidos nos seguintes processos, com respectivos números de genes: regulação positiva de processos biológicos (162 genes), resposta a substância orgânica (112), resposta a compostos contendo oxigênio (78), regulação do sistema imune (54), resposta inflamatória (23) . Em RCU, os genes-alvo dos miRNAs com expressão aumentada desempenham papéis nos processos biológicos de: resposta celular a estímulos químicos (97 genes), regulação da localização (96), resposta celular a substância orgânica (84), regulação do sistema imune (58), regulação de componentes celulares (51), resposta inflamatória (24). Quanto aos genes-alvo dos miRNAs com expressão diminuída, foram identificados como principais processos biológicos: regulação positiva de processos celulares (231 genes), regulação da resposta a estímulos (195), resposta a substâncias orgânicas (169), regulação do sistema imune (110), regulação positiva de processos biológicos (63), resposta inflamatória (52).

5. DISCUSSÃO

O efeito global da expressão de miRNAs na expressão gênica e suas funções envolvidas ainda é pouco entendido em DIIs. Nessas doenças, estudos têm sido realizados para a identificação de perfis moleculares alterados, entretanto a maioria dos achados ainda não foram aplicados na prática clínica, para melhorar o diagnóstico diferencial e o tratamento de pacientes com DIIs. Entre estes, o estudo de Bai e cols.(49) integrou perfis globais de expressão gênica e informações sobre vias biológicas em DC, RCU e carcinoma colorretal (CRC). Os autores utilizaram estratégia semelhante à do nosso estudo, para a identificação de mecanismos regulados por miRNAs alterados nessas doenças. Nesse estudo, os autores identificaram alterações em miRNAs e vias moleculares compartilhadas nas três doenças, sugerindo que a DC, a RCU e o CRC têm alterações moleculares e funções biológicas comumente alteradas durante o desenvolvimento e progressão dessas doenças. Os miRNAs miR-125b, miR-335 e miR-155 foram identificados como mediadores de vias metabólicas. Adicionalmente, vias de sinalização dos receptores do tipo *Toll-like* foram identificadas como reguladas pelos miRNAs miR-124, miR-146a e miR-221/222. Os mecanismos biológicos relacionados à regulação do sistema imune e inflamação foram achados similares aos encontrados em nosso estudo. Adicionalmente, os miRNAs identificados como alterados nesse estudo também foram identificados em nossa meta-análise, tais como o miR-335-5p com expressão diminuída em RCU e miR-155-5p com expressão aumentada em RCU. Em nossos dados, esses dois miRNAs apresentaram um grande número de interações gênicas. Vias de sinalização envolvendo o oncogene FOS e o fator de transcrição NFkB foram identificadas em uma análise integrativa de dados transcritômicos em RCU e carcinoma colorretal (50)

Em outro estudo (51), o papel do miR-155 na inflamação intestinal foi avaliado em pacientes com RCU ativa (N=20) comparado com indivíduos saudáveis (N=16). A expressão aumentada do miR-155 (FC 1,22 e $p<0,03$) foi confirmada pela QRT-PCR nas amostras de pacientes com RCU. A seguir, os autores realizaram estudos funcionais utilizando miR *mimics* e inibidores do miR-155 e detecção com luciferase, para demonstrar que o miR-155 regula o gene *FOXO3a* nas células de adenocarcinoma colorretal, HT29. Em pacientes com RCU ativa, o gene *FOXO3a* estava com expressão diminuída enquanto o miR-155 com expressão aumentada. Os ensaios mostraram que o miR-155 regula o *FOXO3a*, diminuindo a expressão da proteína sintetizada por esse gene. Além disso, o silenciamento do *FOXO3a* e a expressão aumentada do miR-155 induziram o aumento dos níveis de IL-8 em células HT29 tratadas com TNF- α , pela supressão de I kappa B alfa ($I\kappa B\alpha$). Portanto, o miR-155 deve desempenhar um papel na inflamação intestinal de pacientes com RCU ativa, modulando a diminuição da expressão de *FOXO3a*. Esse processo deve ativar a via de sinalização do fator nuclear kappa B ($Nf\kappa B$).

No microambiente intestinal, a comunicação extracelular permite que os vários tipos de células coordenem e executem funções biológicas importantes para a manutenção da fisiologia celular. Nesse microambiente, a ocorrência de resposta inflamatória é um processo complexo que envolve a indução de vários genes relacionados com a inflamação e a ativação do sistema imune para eliminar agentes patogênicos e evitar o aparecimento de doenças (52). O miR-155 foi identificado como um componente da resposta de macrófagos primários a diferentes tipos de mediadores inflamatórios, tais como lipopolissacáridos bacterianos (LPS), interferon- β (TFN- β), ácido polyribonucleosinic-polyribocytidylic (poli IC) e fator de necrose tumoral α (TNF- α)(35). A expressão aumentada do miR-155 foi associada com o aumento da liberação

de citocinas durante o processo inflamatório (53). Foi demonstrado que o miR-155 é capaz de controlar a intensidade da resposta inflamatória a estímulos microbianos por direcionamento do receptor de tipo Toll / interleucina-1 (TLR / IL-1) em células dendríticas humanas (53).

Takagi e cols. (54) utilizaram microarranjos de miRNAs para a identificação de miRNAs alterados na mucosa colônica de pacientes com RCU. Os autores analisaram 2 amostras de biópsia colônica de pacientes com doença no estado ativo (grau Matts >2) e 2 amostras de voluntários saudáveis. Os resultados foram validados pela metodologia da QRT-PCR em 12 amostras de biópsia colônica de pacientes com RCU ativa e 12 amostras de voluntários saudáveis. Nesse estudo, a expressão aumentada dos miRNAs miR-21 e miR-155 foi validada e associada com o desenvolvimento da inflamação intestinal em RCU.

O miR-155 pode ser considerado um miRNA chave associado ao desenvolvimento de DIIs de acordo com diversos estudos. A transcrição do miR-155 é regulada pelo complexo AP-1 (*activator protein-1*) (35) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (55). O miR-155 regula a resposta imune inata e adaptativa, as quais controlam a produção de anticorpos e liberação de citocinas celulares (52). O miR-155 foi considerado um facilitador de respostas pró-inflamatórias celulares em um modelo de DII onde os camundongos *knockout* (miR-155) estavam protegidos do desenvolvimento de colite experimental (56). Recentemente, o miR-155 foi demonstrado regular muitos genes importantes em vias de inflamação, incluindo o *SOCS1*. O silenciamento de *SOCS1* em miofibroblastos intestinais aumentou a liberação de IL-6 e IL-8, sugerindo que mediadores inflamatórios induzem a expressão do miR-155 nos miofibroblastos intestinais em pacientes com RCU. Pela diminuição da

expressão do SOCS1, o miR-155 desencadeia o fenótipo inflamatório associado ao desenvolvimento da RCU (57).

Recentemente, Chen e cols. (58) identificaram alteração na expressão de miRNAs relacionadas a exposição ao arsenito, uma forma tóxica do metal pesado arsênio. A exposição ao arsenito pode causar doenças no epitélio intestinal. Experimentos *in vitro* com as células hepáticas humanas L-02 e THLE-3, transformadas com arsenito, mostraram que exossomos (microvesículas transportadoras de moléculas e utilizadas em mecanismos de sinalização celular) secretados dessas células hepáticas foram capazes de induzir o aumento da expressão do miR-155 e das propriedades pró-inflamatórias celulares. As células transformadas com arsenito transferiam o miR-155 dentro de células L-02 normais, via exossomos. Nesse estudo, a inibição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) via silenciamento de RNA (si-RNA) resultou na diminuição da expressão do miR-155 em exossomos derivados das células L-02 transformadas, bloqueando a inflamação; esses achados indicaram que as células transformadas com arsenito secretam exossomos para promover a inflamação. O miR-155 foi correlacionado com a comunicação inter-celular mediada por exossomos em células hepáticas normais e neoplásicas. Nas células expostas ao arsenito, a expressão aumentada do miR-155 foi correlacionada positivamente com a expressão das interleucinas IL-6 e IL-8. Portanto, os resultados desse estudo mostraram que exossomos derivados de células L-02 transferem o miR-155 para as células vizinhas, as quais induzem a atividade pró-inflamatória das células hepáticas normais. Os achados desse estudo corroboram o conceito de que miRNAs derivados de exossomos estão envolvidos em mecanismos de comunicação celular durante a carcinogênese induzida por agentes químicos ambientais. O papel do ambiente tem sido demonstrado em estudos adicionais. Em um modelo de camundongo, alterações na expressão do miR-

155 e da proteína TNF α foram associadas à inflamação crônica intestinal induzida pelo consumo de álcool (59). Nesse estudo, a deficiência do miR-155 preveniu o aumento de endotoxinas resultantes do consumo de álcool e consequente inflamação intestinal em camundongos.

A ação de componentes medicinais foi associada a vias moleculares reguladas pelo miR-155 em modelos experimentais de DII. O estudo de Wu e cols. (60) utilizou um modelo experimental de ressecção ileocecal, de camundongos IL-10(-/-) para investigar a inflamação pós-cirúrgica devido à anastomose intestinal. Camundongos IL-10(-/-) foram tratados com um extrato isolado da erva *Tripterygium wilfordii* Hook F ou Triptolide, a qual tem sido usada para tratamento da DC por vários anos na medicina Chinesa. Os autores investigaram os efeitos do tratamento com Triptolide na inflamação intestinal, pela inibição da via molecular do miR-155/SHIP-1. Como um dos alvos moleculares do miR-155, o gene *SHIP-1* é um inibidor de muitas vias de inflamação. O *SHIP-1* ou *INPP5D* codifica a enzima fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato 5-fosfato expressa nas células hematopoiéticas (61). O tratamento com Triptolide diminuiu a severidade da inflamação intestinal pós-cirúrgica e foi capaz de suprimir a via de sinalização do miR-155/SHIP-1, atenuando a expressão das citocinas pró-inflamatórias em camundongos IL-10(-/-), após ressecção ileocecal. Esse estudo demonstrou, *in vivo*, que a via molecular do miR-155/SHIP-1 desempenha um papel importante em condições inflamatórias.

Tu e cols., 2012 (62) avaliaram a ação da Tanshinona IIA, um constituinte medicinal ativo da raiz da *Salvia miltiorrhiza*, também utilizada na medicina Chinesa e a qual acredita-se que possui propriedades anti-inflamatórias e anti-tumorais. Considerando que os mecanismos associados a essas propriedades ainda são desconhecidos, os autores estabeleceram um modelo de inflamação entre macrófagos e

células de carcinoma colorretal (CRC). Os resultados mostraram que o composto Tanshinona IIA inibiu a proliferação das células colorretais HCT116 e HT-29 pela diminuição das citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 produzidas pela linhagem celular de macrófagos RAW264.7. Os autores também identificaram o gene *SHIP1* como alvo do miR-155, sendo que a Tanshinona IIA restaurou os níveis de expressão da proteína SHIP1 nas células RAW264.7. A expressão do miR-155 estava aumentada nos macrófagos, possivelmente devido ao aumento concomitante de *AP1*, um ativador transcricional do miR-155. O tratamento com Tanshinona IIA preveniu o aumento de *AP1* e induziu a expressão do miR-155. Os autores sugeriram que a interrupção da condução do sinal entre macrófagos ativados e células tumorais pode representar uma nova estratégia terapêutica e que o miR-155 pode ser um alvo potencial para a prevenção da inflamação relacionada ao câncer. A resposta inflamatória induzida por macrófagos foi comprovada estar associada à expressão do miR-155 (63). Esses achados confirmam que tratamento da inflamação crônica intestinal é uma estratégia importante para a prevenção do desenvolvimento de doenças como o carcinoma colorretal.

Em conjunto com nossos dados, os estudos supracitados indicam que os miRNAs exercem efeitos-chave associados a várias funções biológicas, especialmente inflamação e regulação do sistema imune, as quais são importantes no desenvolvimento e progressão das DII.

6. CONCLUSÃO

Foram identificadas redes de interação entre miRNAs e genes-alvo associados a processos biológicos de inflamação e resposta imune. Os miRNAs identificados modulam vias moleculares potencialmente envolvidas na patogênese da DII. A expressão desregulada de miRNAs está associada a funções biológicas importantes, principalmente na regulação do sistema imune e desenvolvimento da inflamação intestinal em DC e RCU. Estudos como esse podem contribuir para a melhoria do diagnóstico e no desenvolvimento de tratamentos direcionados e mais precisos para pacientes com DC e RCU.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 08;347(6):417-29. PubMed PMID: 12167685.
2. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94. PubMed PMID: 21530745.
3. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504-17. PubMed PMID: 15168363.
4. Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arquivos de gastroenterologia*. 2009 Jan-Mar;46(1):20-5. PubMed PMID: 19466305.
5. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology*. 1991 Feb;100(2):350-8. PubMed PMID: 1985033.
6. Maranhao DDA VA, Campos T. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. *Gastroenterology*. 2015;103(1).
7. BRASILEIRO-FILHO Gec. *Patologia Bogliolo*. 8a ed2011. 750-3 p.
8. Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2002 Mar;31(1):77-92. PubMed PMID: 12122745.
9. Sands BE, Winston BD, Salzberg B, Safdi M, Barish C, Wruble L, et al. Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Mar;16(3):399-406. PubMed PMID: 11876692.
10. KUMAR V AAK, FAUSTO N, MITCHELL R N. *Robbins Patologia Básica*. 8ª Ed ed2008. 728 p.
11. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2010 Feb;4(1):7-27. PubMed PMID: 21122488.
12. Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Drug discovery*. 2006 Mar;5(3):197-209. PubMed PMID: 16518373.
13. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):427-34. PubMed PMID: 17653185.
14. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & colitis*. 2012 Dec;6(10):965-90. PubMed PMID: 23040452.
15. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987 Dec 24;317(26):1625-9. PubMed PMID: 3317057.
16. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006 Jan 01;34(Database issue):D140-4. PubMed PMID: 16381832. Pubmed Central PMCID: 1347474.

17. Duttagupta R, DiRienzo S, Jiang R, Bowers J, Gollub J, Kao J, et al. Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for ulcerative colitis. *PloS one*. 2012;7(2):e31241. PubMed PMID: 22359580. Pubmed Central PMCID: 3281076.
18. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012 Mar;4(3):143-59. PubMed PMID: 22351564. Pubmed Central PMCID: 3376845.
19. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer cell*. 2008 Jan;13(1):48-57. PubMed PMID: 18167339.
20. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. PubMed PMID: 14744438.
21. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60. PubMed PMID: 15372072. Pubmed Central PMCID: 524334.
22. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):241-50. PubMed PMID: 20812331. Pubmed Central PMCID: 2998576.
23. Sohn JJ, Schetter AJ, Yfantis HG, Ridnour LA, Horikawa I, Khan MA, et al. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease. *PloS one*. 2012;7(9):e44156. PubMed PMID: 22970173. Pubmed Central PMCID: 3435404.
24. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2006 Jun;78(2):180-9. PubMed PMID: 16847883.
25. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 02;101(9):2999-3004. PubMed PMID: 14973191. Pubmed Central PMCID: 365734.
26. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-69. PubMed PMID: 16557279.
27. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801. PubMed PMID: 16251535.
28. Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Human molecular genetics*. 2001 Mar 01;10(5):445-56. PubMed PMID: 11181568.
29. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 2008 Nov;135(5):1624-35 e24. PubMed PMID: 18835392.
30. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 09;435(7043):834-8. PubMed PMID: 15944708.
31. Rybaczyk L, Rozmiarek A, Circle K, Grants I, Needleman B, Wunderlich JE, et al. New bioinformatics approach to analyze gene expressions and signaling pathways reveals unique purine gene dysregulation profiles that distinguish between CD and UC. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jul;15(7):971-84. PubMed PMID: 19253308. Pubmed Central PMCID: 2697273.

32. Dalal SR, Kwon JH. The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2010 Nov;6(11):714-22. PubMed PMID: 21437020. Pubmed Central PMCID: 3033542.
33. Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. 2009 May-Jun;32(3-4):189-94. PubMed PMID: 19303254. Pubmed Central PMCID: 2717629.
34. Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*. 2009 Feb;45(2):58-69. PubMed PMID: 19121586. Pubmed Central PMCID: 3129852.
35. O'Connell RM, Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;5(104):1604-9.
36. Lin J, Cao Q, Zhang J, Li Y, Shen B, Zhao Z, et al. MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2013 Jan;26(1):148-54. PubMed PMID: 22899284.
37. Svrcek M, El-Murr N, Wanherdrick K, Dumont S, Beaugerie L, Cosnes J, et al. Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. *Carcinogenesis*. 2013 Apr;34(4):828-34. PubMed PMID: 23288924.
38. Pekow JR, Dougherty U, Mustafi R, Zhu H, Kocherginsky M, Rubin DT, et al. miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jan;18(1):94-100. PubMed PMID: 21557394. Pubmed Central PMCID: 3931730.
39. Coskun M, Bjerrum JT, Seidelin JB, Troelsen JT, Olsen J, Nielsen OH. miR-20b, miR-98, miR-125b-1*, and let-7e* as new potential diagnostic biomarkers in ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2013 Jul 21;19(27):4289-99. PubMed PMID: 23885139. Pubmed Central PMCID: 3718896.
40. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, et al. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2013 Oct;145(4):842-52 e2. PubMed PMID: 23856509. Pubmed Central PMCID: 4427058.
41. Danese S. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 May;300(5):G716-22. PubMed PMID: 21233277.
42. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Journal of clinical epidemiology*. 2009 Oct;62(10):1006-12. PubMed PMID: 19631508.
43. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods*. 2015 Aug;12(8):697. PubMed PMID: 26226356.
44. Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in molecular biology*. 2014;1182:289-305. PubMed PMID: 25055920.
45. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics*. 2011 Oct;44(5):839-47. PubMed PMID: 21605702.
46. Petryszak R, Burdett T, Fiorelli B, Fonseca NA, Gonzalez-Porta M, Hastings E, et al. Expression Atlas update--a database of gene and transcript expression from microarray- and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic acids research*. 2014 Jan;42(Database issue):D926-32. PubMed PMID: 24304889. Pubmed Central PMCID: 3964963.

47. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. PubMed PMID: 25352553. Pubmed Central PMCID: 4383874.
48. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*. 2015 May 22;16:169. PubMed PMID: 25994840. Pubmed Central PMCID: 4455604.
49. Bai J, Li Y, Shao T, Zhao Z, Wang Y, Wu A, et al. Integrating analysis reveals microRNA-mediated pathway crosstalk among Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer. *Molecular bioSystems*. 2014 Jul 29;10(9):2317-28. PubMed PMID: 24949825.
50. Guan X, Yi Y, Huang Y, Hu Y, Li X, Wang X, et al. Revealing potential molecular targets bridging colitis and colorectal cancer based on multidimensional integration strategy. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37600-12. PubMed PMID: 26461477. Pubmed Central PMCID: 4741951.
51. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Apr;20(4):652-9. PubMed PMID: 24583476.
52. Wan J, Xia L, Xu W, Lu N. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *International journal of molecular sciences*. 2016 May 11;17(5). PubMed PMID: 27187359. Pubmed Central PMCID: 4881531.
53. Ceppi M, Pereira PM, Dunand-Sauthier I, Barras E, Reith W, Santos MA, et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2735-40. PubMed PMID: 19193853. Pubmed Central PMCID: 2650335.
54. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010 May;25 Suppl 1:S129-33. PubMed PMID: 20586854.
55. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):604-8. PubMed PMID: 17463289.
56. Singh UP, Murphy AE, Enos RT, Shamran HA, Singh NP, Guan H, et al. miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses. *Immunology*. 2014 Nov;143(3):478-89. PubMed PMID: 24891206. Pubmed Central PMCID: 4212960.
57. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D'Inca R, Nai L, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Experimental & molecular medicine*. 2015 May 22;47:e164. PubMed PMID: 25998827. Pubmed Central PMCID: 4454995.
58. Chen C, Luo F, Liu X, Lu L, Xu H, Yang Q, et al. NF-kB-regulated exosomal miR-155 promotes the inflammation associated with arsenite carcinogenesis. *Cancer letters*. 2016 Nov 30;388:21-33. PubMed PMID: 27913196.
59. Lippai D, Bala S, Catalano D, Kodys K, Szabo G. Micro-RNA-155 deficiency prevents alcohol-induced serum endotoxin increase and small bowel inflammation in mice. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2014 Aug;38(8):2217-24. PubMed PMID: 25156614. Pubmed Central PMCID: 4260268.
60. Wu R, Li Y, Guo Z, Gong J, Zhu W, Li N, et al. Triptolide ameliorates ileocolonic anastomosis inflammation in IL-10 deficient mice by mechanism involving

suppression of miR-155/SHIP-1 signaling pathway. *Molecular immunology*. 2013 Dec;56(4):340-6. PubMed PMID: 23911388.

61. Ware MD, Rosten P, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood*. 1996 Oct 15;88(8):2833-40. PubMed PMID: 8874179.

62. Tu J, Xing Y, Guo Y, Tang F, Guo L, Xi T. TanshinoneIIA ameliorates inflammatory microenvironment of colon cancer cells via repression of microRNA-155. *International immunopharmacology*. 2012 Dec;14(4):353-61. PubMed PMID: 22982040.

63. Jablonski KA, Gaudet AD, Amici SA, Popovich PG, Guerau-de-Arellano M. Control of the Inflammatory Macrophage Transcriptional Signature by miR-155. *PloS one*. 2016;11(7):e0159724. PubMed PMID: 27447824. Pubmed Central PMCID: 4957803.

Identification of microRNA-mRNA networks associated with inflammation and immune system regulation in Intestinal Bowel Diseases.

Sibia CF¹, Ariede JR¹, Severino FE¹, Sassaki LY², Reis PP^{1,3}, Saad-Hossne R^{1*}.

¹Department of Surgery and Orthopedics, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

²Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

³Experimental Research Unity (UNIPEX), Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author

Adjunct Professor Rogério Saad-Hossne, MD, PhD

Address: Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n

18.618-687. Botucatu, SP, BRAZIL

Email: saad@fmb.unesp.br

Key-words: Chron's disease, Ulcerative colitis, Intestinal Bowel Disease, microRNA, mRNA, networks, biological function, meta-analysis.

ABSTRACT

Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are the two main Inflammatory Bowel Diseases (IBD). Although several genes have been reported as deregulated and differentially expressed in CD vs. UC, the molecular mechanisms associated with IBD development and progression are still unknown. microRNAs (miRNAs) are gene expression regulators with important roles in human diseases and may represent biomarkers applicable to improve diagnosis, predict prognosis and treatment of patients with IBD. Our objectives were to identify deregulated miRNAs that can distinguish CD from UC, as well as to identify miRNA target genes and miRNA-mRNA interaction networks and biological functions associated with these different forms of IBD. We performed a meta-analysis and integrated data from different studies on miRNA expression in IBD. Ten studies were selected, based on specific inclusion and exclusion criteria. Of these, we extracted information on significantly deregulated miRNAs (fold change, $FC \geq 2$ and $p < 0,05$), sample type and number, platform used in both test (global miRNA expression data generation) and validation. We further applied bioinformatic analyses using MirWalk 2.0 for miRNA target prediction and STRING and BiNGO to identify miRNA-mRNA interaction networks and biological functions potentially associated with IBD. Our results showed that 17 miRNAs were over-expressed in CD and 62 were over-expressed in UC. Among the under-expressed miRNAs, 18 were found in CD and 31 in UC. These data show a much higher number of miRNAs deregulated in UC (N=93 miRNAs) compared to CD (N=35 miRNAs). Among the miRNAs with the higher number of target interactions, in CD, we identified let-7a-5p, let-7b-5p, miR-199a-5p, miR-150-5p, miR-362-3p and miR-224-5p. In UC, most miRNA-target interactions were found for miR-155-5p, miR-24-5p, miR-335-5p and miR-16-5p. Deregulated miRNA-mRNA networks were correlated with key biological

functions of immune system regulation and inflammation. Studies such as this may contribute to the identification of miRNAs and target genes as clinically applicable biomarkers, which may contribute to help improve diagnosis and lead to the development of more tailored treatment strategies for patients with the different forms of IBD.

INTRODUCTION

Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are the two main Inflammatory Bowel Diseases (IBD) that occur in the gastrointestinal tract mainly in the small intestine and colon (1). IBD etiology is believed to be mainly related to abnormal immune response to intestinal bacterial microbiome associated with alterations in the intestinal mucosal barrier (1).

Gene regulation mechanisms are currently being explored as key molecular alterations associated with IBD pathogenesis, mainly through non-coding RNA molecules such as microRNAs (miRNAs). miRNAs are small RNAs (~18-22 nucleotides) that play an important role in post-transcriptional regulation of gene expression (2). Since miRNAs have been shown to act as immune response modulators (2), the identification of miRNA expression changes in CD vs. UC may contribute to comprehensively characterize the molecular mechanisms underlying IBD pathogenesis.

miRNA expression changes have been first described in patients with IBD in a study by Wu et al. (3). These authors showed that patients with active UC had increased levels of 8 miRNAs and decreased levels of 3 miRNAs in their intestinal mucosa; in addition, reduced expression of miR-192 was associated with active UC (3). Circulating miRNA expression data has been also shown in a study including 20 patients with UC compared to 20 controls (2), where the authors identified a subset of 31 deregulated

miRNAs having 92,8% precision, 96,2% specificity and 89,5% sensibility, suggesting that these miRNAs may be biomarkers applicable for non-invasive diagnosis of UC (2).

It has been shown that miRNA expression changes do occur and are associated with histological changes from normal to dysplastic tissue and in intestinal mucosal tissue from patients with IBD (4). In addition, miRNAs have different expression profiles in patients with active vs. inactive UC (5). Differentially expressed miRNAs have been also shown in auto-immune related conditions such as psoriasis, rheumatoid arthritis, lupus and asthma (6). The role of miRNAs in innate and adaptive immune response has indeed been established and there is evidence that some miRNAs may be involved in chronic immune response while others are mostly related to acute inflammation processes (7, 8).

Five miRNAs (miR-20b, miR-99a, miR-203, miR-26b, e miR-98) were deregulated in mucosal colon biopsies from patients with active vs. inactive UC and controls (9). 2/5 miRNAs (miR-125b-1-3p and let-7e-3p) were over-expressed in inactive UC (9). miR-124 has also been shown to be under-expressed and to regulate *STAT3* gene, which encodes an important protein involved in inflammatory response. Phosphorylated STAT and *VEGF*, *BCL2*, *BCLXL* e *MMP9* levels were increased in colon tissues from pediatric patients with active compared to inactive UC (10). Different miRNA profiles including miR-26a, miR-29b, miR-126, miR-127-3p, miR-324-3p were identified in patients with IBD vs. controls and specific miRNAs (miR-196b, miR-199a-3p, miR-199-5b, miR-150, miR-223) classified CD vs. UC (2).

Although the above studies indicate that miRNAs are involved in IBDs, most have not used global miRNA expression analysis and were limited to analyze candidate miRNAs or small miRNA panels representing only ~10% of the total number of known miRNAs in the human genome. In addition, most studies do not show data validation

and do not correlate miRNA-mRNA targets and altered biological functions in IBD. Our meta-analysis study is thus novel since it integrates global miRNA expression data with target genes expressed in intestinal tissue. Importantly, such information may contribute to elucidate the molecular pathways associated with the pathogenesis of CD and UC.

MATERIALS and METHODS

Search Strategy

Our search strategy was based on publicly available data on PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), which were retrieved by using the following keywords: “microRNA AND inflammatory bowel disease (mesh terms)”, “microRNA AND Crohn’s disease (mesh terms)”, “microRNA AND ulcerative colitis (mesh terms)”. A thorough literature search was performed between July 2-7, 2016. Additionally, studies were selected by activating the following filters during the search: publication date (articles published in the past 10 years, from 2006-2016), studies in human disease, published in English language and free full text articles. Upon retrieval of studies, we further applied inclusion criteria: studies on global miRNA expression analysis in IBD (CD and UC), including intestinal mucosal tissues, plasma and or serum, disease affecting human adults, and which included control samples from healthy individuals, studies including data validation and with data publicly available in the manuscript text or in supplementary material or with downloadable raw data. Exclusion criteria applied were: studies exclusively using experimental models, *in vitro* or *in vivo*, literature review or case reports.

Data Extraction

Meta-analysis study design followed the Prisma Statement (11), as shown in **Figure 1**. We included 10 eligible studies according to inclusion and exclusion criteria, from which the following data were collected: list of significantly deregulated miRNAs ($FC \geq 2$, $p < 0.05$), direction of deregulation (over- or under-expressed), type of sample analyzed (plasma, serum and or colon tissue taken by biopsy or surgery), number of samples from patients with CD and or UC in both test and validation sample sets, platform used for global miRNA expression analysis and validation, first author name and date of publication. These data are shown in **Table 1**.

Target mRNA prediction and miRNA-mRNA interaction networks in CD and UC

Significantly deregulated miRNAs ($FC \geq 2$ and $p < 0.05$) were used for bioinformatic analysis, in order to identify predicted mRNA targets of miRNAs. This analysis was performed during the month of September, 2016, using the miRWalk 2.0 tool, available at <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/> (12-14). The miRWalk tool allows a broad analysis of all possible binding sites between miRNAs and target mRNA molecules, resulting from simultaneous comparison using several different databases. Further, we performed searches for the identified miRNA target genes in the European Bioinformatics Institute (EBI) database (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) (date of access: September 23, 2016). This database provides information on gene expression patterns, allowing to perform searches by gene or protein name, as well as gene and protein expression in specific tissues (46). Therefore, this analysis allowed to verify target gene expression in intestinal tissue, which is important as we filtered our data for genes which are more likely to be meaningful for development of diseases such as IBD.

Additionally, enrichment analysis was carried out to identify the main biological functions of miRNAs and target genes, using STRING 10.0 (<http://string-db.org/>) (date of access: September 31, 2016). STRING is a comprehensive biological and protein-protein interaction database, which allows to identify known/validated or predicted interactions (15). In our study, target genes identified were mapped on their respective proteins, which were then used for protein-protein interaction identification in STRING. In addition, Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) was used for data visualization. Enrichment analysis for biological function identification used Gene Ontology (GO) tool following the statistical structure: evaluation of over-represented GO categories, hypergeometric for over-represented functions, multiple correction Benjamini & Hochberg (FDR) test with $p \leq 0,05$ and complete genome as reference.

RESULTS

Distinct sets of miRNAs are significantly deregulated in CD vs. UC

Herein, we focused on the identification of significantly deregulated miRNAs, defined as miRNAs with fold expression change of at least 2 times (under- or over-expression) compared to controls and $p < 0,05$. In order to consider a larger number of studies (and respecting our study to inclusion criteria), we selected articles reporting global miRNA expression changes in plasma and or intestinal tissue from patients with DC and or UC. Some studies included both CD and UC and some include DC or UC. By filtering the data according to disease type, we were able to classify miRNA expression data in DC vs. UC. This analysis allowed us to look for miRNAs that were specifically deregulated in each disease, as well as commonly deregulated in both diseases.

In CD, we identified 35 deregulated miRNAs (17 over-expressed and 18 under-expressed) (**Table 2**). A total of 93 miRNAs was deregulated in UC, which is much larger compared to the total number of miRNAs deregulated in CD. Of these 93 miRNAs, 62 were over- and 31 were under-expressed (**Table 3**). In order to determine specific vs. common miRNAs deregulated in these diseases, we performed a Venn diagram analysis, using interactiveVenn tool (16). Venn diagram data for over- and under-expressed miRNAs are shown in **Figures 2 and 3**, respectively.

miRNA-mRNA networks in CD and UC and biological processes

miRNA target genes identified play biological roles potentially associated with IBD development and progression. The complete list of target genes is available at (<https://drive.google.com/file/d/0B8JG6RzgXyLcdGF1WTh2NTAzcTQ/view?usp=sharing>). Our results showed a greater number of interactions between genes with biological functions associated with inflammation and immune response regulation, as shown in **Figures 4, 5, 6 and 7**.

Enrichment analysis was performed in Gene Ontology (GO) and allowed us to identify statistically significant biological processes involved in IBD. Data for DC are shown in Graphs 1 and 2 and for UC are shown in Graphs 3 and 4. Results are available for download at

<https://drive.google.com/file/d/0B8JG6RzgXyLcNmdMcjVVZm9vMDg/view>.

DISCUSSION

Effects of global miRNA-mRNA deregulation leading to altered biological functions in IBD is still poorly understood. Herein, we have identified a subset of

miRNAs that play important regulatory roles in inflammation and immune response regulation. Previous studies have shown molecular changes associated mainly with UC, such as Takagi et al. (17) that showed miRNA expression changes in colonic mucosa of patients with UC. Although in their study they used only two biopsy samples of patients with active UC and two from healthy controls, their data were validated in other 12 biopsy samples of patients with active UC and 12 controls, confirming that over-expression of miR-21 and miR-155 were both correlated with intestinal inflammation in UC.

Gene expression profiles have been investigated by Bai et al. (18) with the goal of identifying common molecular changes associated with disease progression in CD, UC and colorectal carcinoma. They identified that deregulated miR-125b, miR-335 and miR-155 play a role in regulation of metabolic pathways. In addition, Toll-like receptor (TLR) signaling was identified as regulated by miR-124, miR-146a and miR-221/222. Similar to our study results, they also showed that mechanisms of immune system regulation and inflammation were regulated by miRNAs. Some of the miRNAs identified in the study by Bai et al. were commonly identified in our study, such as decreased expression of miR-335-5p and increased expression of miR-155-5p, both in UC. In our data, these miRNAs had a large number of interactions with mRNA targets.

miR-155 over-expression (FC=1,22 and $p<0,03$) was associated with intestinal inflammation in 20 patients with active UC compared to 16 healthy controls. Functional studies using miR-155 mimics and inhibitors were further performed, using a luciferase assay, to demonstrate that miR-155 specifically regulates *FOXO3a* in HT29 colorectal adenocarcinoma cells. *FOXO3a* expression was inversely correlated with miR-155 levels in patients with active UC. Results showed that miR-155 is able to bind and regulates *FOXO3a* by decreasing its gene and protein expression levels. Knock-down

of *FOXO3a* and miR-155 over-expression also induced IL-8 levels in HT29 cells treated with TNF- α , by suppressing I kappa B alpha (I κ B α). Therefore, miR-155 may play a role in intestinal inflammation in patients with active UC by modulating decreased *FOXO3a* expression, which may occur via activation of Nuclear Factor kappa B (Nf κ B) pathway (19).

In the intestinal microenvironment, extracellular communication allows several cell types to coordinate biological functions required for maintaining appropriate cellular and tissue physiology. In this microenvironment, the inflammatory response is a complex process that encompass induction of several genes associated with inflammation and immune response activation, in order to eliminate pathogens and to avoid disease (20). Of note, miR-155 has been identified as a component of macrophage response to distinct inflammatory mediators, such as bacterial liposaccharides (LPS), interferon- β (TFN- β), polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poli IC) and tumor necrosis factor α (TNF- α) (8). Over-expressed miR-155 has been correlated with increased cytokine release during inflammation (8) and was shown to control the inflammatory response intensity to microbial stimuli via Toll receptors/interleukin-1 (TLR/IL-1) in human dendritic cells (8).

Therefore, miR-155 can be considered a key miRNA associated with the molecular pathogenesis of IBD development. miR-155 transcription is regulated by the *activator protein-1* (AP-1) complex (8) and the transcription factor Nuclear Factor kappa B (Nf κ B) (21). miR-155 regulates innate and adaptive immune response, which control antibody production and cellular cytokine release (22). miR-155 has been shown to facilitate pro-inflammatory response in a mouse *knockout* model (miR-155 $-/-$) (23). Recently, miR-155 was demonstrated to regulate genes in inflammation pathways such as *SOCS1*. Silencing of *SOCS1* in intestinal miofibroblasts increased release of IL-6

and IL-8, suggesting that inflammatory mediators induce miR-155 expression in intestinal miofibroblasts in patients with UC. By decreasing *SOCS1* expression, miR-155 may trigger the inflammation phenotype associated with UC development (24).

Together with our findings, miRNAs are likely to play effector roles in inflammation and immune response regulation, which are important for development and progression of the different forms of IBD.

REFERENCES

1. Maranhao DDA VA, Campos T. Características e diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais. *Gastroenterology*. 2015;103(1).
2. Duttagupta R, DiRienzo S, Jiang R, Bowers J, Gollub J, Kao J, et al. Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for ulcerative colitis. *PloS one*. 2012;7(2):e31241. PubMed PMID: 22359580. Pubmed Central PMCID: 3281076.
3. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 2008 Nov;135(5):1624-35 e24. PubMed PMID: 18835392.
4. Rybaczyk L, Rozmiarek A, Circle K, Grants I, Needleman B, Wunderlich JE, et al. New bioinformatics approach to analyze gene expressions and signaling pathways reveals unique purine gene dysregulation profiles that distinguish between CD and UC. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jul;15(7):971-84. PubMed PMID: 19253308. Pubmed Central PMCID: 2697273.
5. Dalal SR, Kwon JH. The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2010 Nov;6(11):714-22. PubMed PMID: 21437020. Pubmed Central PMCID: 3033542.
6. Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*. 2009 May-Jun;32(3-4):189-94. PubMed PMID: 19303254. Pubmed Central PMCID: 2717629.
7. Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*. 2009 Feb;45(2):58-69. PubMed PMID: 19121586. Pubmed Central PMCID: 3129852.
8. O'Connell RM, Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;5(104):1604-9.
9. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94. PubMed PMID: 21530745.
10. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, et al. MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated

in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2013 Oct;145(4):842-52 e2. PubMed PMID: 23856509. Pubmed Central PMCID: 4427058.

11. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Journal of clinical epidemiology*. 2009 Oct;62(10):1006-12. PubMed PMID: 19631508.

12. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods*. 2015 Aug;12(8):697. PubMed PMID: 26226356.

13. Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in molecular biology*. 2014;1182:289-305. PubMed PMID: 25055920.

14. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics*. 2011 Oct;44(5):839-47. PubMed PMID: 21605702.

15. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52. PubMed PMID: 25352553. Pubmed Central PMCID: 4383874.

16. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*. 2015 May 22;16:169. PubMed PMID: 25994840. Pubmed Central PMCID: 4455604.

17. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2010 May;25 Suppl 1:S129-33. PubMed PMID: 20586854.

18. Bai J, Li Y, Shao T, Zhao Z, Wang Y, Wu A, et al. Integrating analysis reveals microRNA-mediated pathway crosstalk among Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer. *Molecular bioSystems*. 2014 Jul 29;10(9):2317-28. PubMed PMID: 24949825.

19. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Apr;20(4):652-9. PubMed PMID: 24583476.

20. Guan X, Yi Y, Huang Y, Hu Y, Li X, Wang X, et al. Revealing potential molecular targets bridging colitis and colorectal cancer based on multidimensional integration strategy. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37600-12. PubMed PMID: 26461477. Pubmed Central PMCID: 4741951.

21. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):604-8. PubMed PMID: 17463289.

22. Wan J, Xia L, Xu W, Lu N. Expression and Function of miR-155 in Diseases of the Gastrointestinal Tract. *International journal of molecular sciences*. 2016 May 11;17(5). PubMed PMID: 27187359. Pubmed Central PMCID: 4881531.

23. Singh UP, Murphy AE, Enos RT, Shamran HA, Singh NP, Guan H, et al. miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses. *Immunology*. 2014 Nov;143(3):478-89. PubMed PMID: 24891206. Pubmed Central PMCID: 4212960.

24. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D'Inca R, Nai L, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Experimental & molecular medicine*. 2015 May 22;47:e164. PubMed PMID: 25998827. Pubmed Central PMCID: 4454995.

As teabelas, figuras e gráficos indicados no texto do manuscrito correspondem as mesmas apresentadas no item Resultados da dissertação.