

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 02/03/2021.



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

Carina de Fátima de Síba

**Expressão de microRNAs Circulantes em Doença de
Crohn e Retocolite Ulcerativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Associado Rogério Saad Hossne

Co orientadora: Profa. Associada Patrícia Pintor dos Reis

Co orientadora: Profa. Dra. Lígia Yukie Sasaki

Colaboradora: Dra. Tainara Francini Felix

BOTUCATU

2020

Carina de Fátima de Síba

Expressão de microRNAs Circulantes em Doença
de Crohn e Retocolite Ulcerativa

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Cirurgia e
Medicina Translacional.

Orientador: *Prof. Associado. Rogério Saad Hossne*

Coorientadora: *Profa. Associada Patrícia Pintor dos Reis*

Coorientadora: *Profa. Dra. Lígia Yukie Sasaki*

Colaboradora: *Dra. Tainara Francini Felix*

Botucatu

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. 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 fatima.

Expresão de microRNAs circulantes em doença de Crohn e retocolite ucerativa / Carina de fatima Síbia. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rogério Saad Hossne

Coorientador: Pátricia Pintor dos Reis

Coorientador: Lígia Yuki Sasaki

Capes: 20202008

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

Palavras-chave: Doença de Crohn; Doença inflamatória intestinal; MicroRNAs.; Retocolite ulcerativa.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha **Vó Maria** (mãe) e meu **Tio Marcelo** (pai), que me 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

Agradecimientos

À **Deus**, por estar sempre comigo, me guiando, me protegendo e abençoando.

Ao orientador **Dr. Rogério Saad Hossnee** e as co-orientadora **Dra. Ligia Yukie Sasaki** e **Dra. Patrícia Pintor do Reis** pela disponibilidade, compreensão e paciência frente as minhas limitações, confiança e grande apoio em todos os momentos.

À **Dra. Tainara Francini Felix** pela disponibilidade e colaboração na realização das análises das amostras.

Ao **Dr. Marco Lopez**, pelo apoio e colaboração nas análises de bioinformática.

A **Dra. Ana Elisa Valencise Quaglio** pela disponibilidade, ensinamentos, paciência e colaboração na elaboração da tese.

Ao meu marido **Alexandre Tsukada**, por todos os momentos felizes que passamos juntos, pelo amor, carinho e respeito. Obrigada por toda compreensão, paciência, incentivo e por sempre se assegurar de que estou bem e feliz. Amo você!

Às amigas da pós-graduação **Elen Farinelli**, **Fernanda Lofiego**, **Rosemary Lino**, **Robertha Biondi** e **Júlio Pinheiro Baima** pela amizade, conselhos, pelo grande apoio e incentivo durante todo esse período.

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

À secretária da pós-graduação, **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, pelas inúmeras ajudas, sempre atenciosa.

Aos **pacientes**, que aceitaram a participar desta pesquisa, por me deixar fazer parte das suas histórias de sofrimento e também de superação.

Muito **obrigada a todos** que, de alguma forma, ouviram e opinaram sobre este projeto. Todos influenciaram no seu resultado final.

Por fim, agradeço à FAPESP 2015/21882-7 e a CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

Introdução	1
Objetivos	13
Métodos	15
Desenho do estudo e seleção dos participantes.....	15
Critérios de inclusão dos pacientes	15
Critérios de exclusão dos pacientes.....	15
Critérios de inclusão dos controles	15
Critérios de exclusão dos controles	15
Cálculo do tamanho da amostra	16
Aspectos Éticos	16
Classificação e Índice de Atividade da Doença de Crohn	16
Classificação e Índice de Atividade da Retocolite Ulcerativa	17
Resposta ao tratamento	17
Coleta de sangue	17
Extração de RNA	18
Reação de Transcrição Reversa de miRNAs	19
Amplificação pela PCR Quantitativa em Tempo Real	20
Análise dos dados	20
Resultado	23
Capítulo 1	23
Características demográficas e aspectos clínicos dos pacientes com Doença de Crohn..	
.....	23

Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Doença de Crohn, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.....	25
Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas	29
Capítulo 2.....	31
Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa	32
Conjuntos distintos de miRNAs apresentam expressão desregulada no plasma de pacientes com Retocolite Ulcerativa, respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso	33
Identificação de genes-alvo dos miRNAs e vias moleculares enriquecidas	37
Discussão	40
Doença de Crohn	40
Retocolite Ulcerativa	45
Conclusão	50
Referências bibliográficas	52
Anexos.....	60

Lista de tabelas

TABELA 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de Doença de Crohn.

TABELA 2: Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de Doença de Crohn respondedores e não respondedores ao tratamento medicamentoso.

TABELA 3: Características demográficas e clínicas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa.

TABELA 4: miRNAs significativamente desregulados no plasma de pacientes com RCU, respondedores e não respondedores ao tratamento, comparado com indivíduos saudáveis.

Lista de figuras

FIGURA 1: Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com DC, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Em preto estão mostrados os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

FIGURA 2: Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com DC: respondedores (a) e não respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

FIGURA 3: Diagrama de Venn ilustrando os miRNAs diferencialmente expressos no plasma de pacientes com RCU, comuns e exclusivos aos pacientes respondedores vs não respondedores. Estão destacados em preto os miRNAs com expressão diminuída e em vermelho os miRNAs com expressão aumentada.

FIGURA 4: Vias moleculares enriquecidas, reguladas pelos genes-alvo de miRNAs alterados no plasma de pacientes com RCU: Respondedores (a) e Não Respondedores (b) em comparação com indivíduos saudáveis.

Anexos

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO 2: Índice de atividade da doença de Crohn (CDAI).

ANEXO 3: Classificação da Extensão da Doença de Crohn (Montreal, 2005).

ANEXO 4: Escore de Mayo para Avaliação da Atividade da Retocolite Ulcerativa.

ANEXO 5: Classificação da Extensão da Doença de Retocolite Ulcerativa.

ANEXO 6: Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes respondedores *vs* controle.

ANEXO 7: Principais vias de sinalização significativas na DC em pacientes não respondedores *vs* controle.

ANEXO 8: Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes respondedores *vs* controle.

ANEXO 9: Principais vias de sinalização significativas na RCU em pacientes não respondedores *vs* controle.

Resumo

SÍBIA, C.F. Expressão de microRNAs circulantes em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. 2020. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, 2020.

Introdução: As doenças inflamatórias intestinais são doenças crônicas representadas principalmente pela Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU). A DC caracteriza-se por focos de inflamação transmural que podem afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal (TGI). Pode ser classificada em tipo inflamatório, estenosante ou penetrante/fistulizante. Na RCU, a doença é caracteristicamente restrita à superfície da mucosa e submucosa. Os mecanismos envolvidos na patogênese de ambas as doenças ainda são desconhecidos. Ressaltamos a importância de mecanismos de regulação gênica, em particular os microRNAs (miRNAs) que estão envolvidos em processos biológicos importantes, e têm sido evidenciados como biomarcadores com potencial utilidade clínica no diagnóstico, determinação do prognóstico e tratamento dos pacientes. **Objetivo:** Identificar miRNAs circulantes com expressão significativamente alterada no plasma de pacientes com DC ou RCU, comparando os pacientes respondedores vs. não respondedores ao tratamento. **Metodologias:** Foram coletadas amostras de plasma de pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e diagnosticados com DC (n=25) ou RCU (n=30). A DC foi classificada de acordo com a classificação de Montreal e a atividade da doença foi baseada no índice CDAI. A RCU foi classificada de acordo com a extensão da doença em proctite, hemicolite esquerda e pancolite e a atividade da doença foi classificada de acordo com o escore de Mayo. O plasma foi utilizado para extração do RNA e quantificação da expressão de miRNAs na plataforma TaqMan Low Density Array. Para análises de dados utilizamos o programa *Expression Suite* com cut-off de nível de alteração, *foldchange* (FC) $\geq 2,0$ e $p < 0,05$. Adicionalmente, utilizamos ferramentas de bioinformática (mirDIP, miRTarBase e ToppGeneSuite) para interpretação do significado biológico dos dados. **Resultados:** A idade média dos pacientes com DC foi de 44,4 anos e 60% eram do sexo feminino. Em relação às características clínicas, 64% dos pacientes foram diagnosticados com a doença entre 17-40 anos de idade, 36% apresentam a localização ileo colônica, 40% com comportamento estenosante, 4% apresentavam-se em atividade clínica da doença e 44% estavam em uso de terapia biológica. Identificamos 37 miRNAs significativamente alterados (FC ≥ 2 e $p \leq 0,05$) comparados aos indivíduos saudáveis. Em pacientes respondedores ao tratamento, 22 miRNAs estavam com expressão diminuída e 3 com expressão aumentada. Nos pacientes não respondedores, 10 miRNAs estavam com expressão diminuída e 2 com expressão aumentada. Nos pacientes com RCU, a idade média foi de 51,3 anos e 53% eram do sexo feminino, 70% dos pacientes tiveram comprometimento de todo o cólon, 27% apresentavam atividade moderada e 33% dos pacientes estavam em uso de aminossalicílicos. Identificamos 37 miRNAs alterados, dos quais 18 miRNAs estavam com expressão diminuída e 1 miRNA com expressão aumentada em pacientes respondedores ao tratamento. Nos pacientes não respondedores, foram identificados 5 miRNAs com expressão diminuída e 3 com expressão aumentada. **Conclusões:** Diferentes miRNAs podem constituir biomarcadores preditivos nas diferentes formas de DII: DC e RCU.

Palavras-chaves: MicroRNAs, Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa, Doença Inflamatória Intestinal.

Abstract

SÍBIA, C.F. Expression of circulating microRNAs in patients with Crohn's disease and Ulcerative Colitis. 2020 Thesis (Doctoral) - Faculty of Medicine of Botucatu, 2020.

Introduction: Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases mainly represented by Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). CD is characterized by transmural inflammation foci that can affect any segment of the gastrointestinal tract (TGI). It can be classified as inflammatory, stenosing or penetrating/fistulizing. In UC, the disease is restricted to the surface of the mucosa and submucosa. The mechanisms involved in the pathogenesis of both diseases are still unknown. We emphasize the importance of mechanisms of gene regulation, in particular microRNAs (miRNAs) that are involved in important biological processes and have been shown to be biomarkers with potential clinical utility in the diagnosis, determination of prognosis and treatment of patients. **Objectives:** Identify circulating miRNAs with significantly altered expression in the plasma of patients with CD or UC, comparing responders vs. non-responders to treatment. **Methods:** Plasma samples were collected from patients seen at the Intestinal Inflammatory Diseases Outpatient Clinic from Botucatu Medical School (UNESP) diagnosed with CD (n = 25) or UC (n = 30). CD was classified according to the Montreal classification and disease activity was based on the CDAI index. The UC was classified according to the extent of the disease into proctitis, left hemicolitis and pancolitis and the activity of the disease was classified according to the Mayo score. Plasma was used to extract RNA and quantify the expression of miRNAs on the TaqMan Low Density Array platform. For data analysis we used the Expression Suite program with cut-off level of change, foldchange (FC) ≥ 2.0 and $p < 0.05$. Additionally, we use bioinformatics tools (mirDIP, miRTarBase and ToppGene Suite) to interpret the biological meaning of the data. **Results:** The average age of patients with CD was 44.4 years and 60% were female. Regarding the clinical characteristics, 64% of the patients were diagnosed with the disease between 17-40 years of age, 36% had the ileocolonic localization, 40% with stenosing behavior, 4% were in clinical activity of the disease and 44% were using biological therapy. We identified 37 significantly altered miRNAs ($FC \geq 2$ and $p \leq 0.05$) compared to healthy individuals. In patients who responded to treatment, 22 miRNAs were with decreased expression and 3 with increased expression. In non-responders, 10 miRNAs were with decreased expression and 2 with increased expression. In patients with UC, the mean age was 51.3 years and 53% were female, 70% of the patients had involvement of the entire colon, 27% had moderate activity and 33% of the patients were using aminosalicylics. We identified 37 altered miRNAs, of which 18 miRNAs were with decreased expression and 1 miRNA with increased expression in patients who responded to treatment. In non-responders, 5 miRNAs with decreased expression and 3 with increased expression were identified. **Conclusions:** Distinct sets of miRNAs can may represent predictive biomarkers in the different forms of IBD: CD and UC.

Key words: microRNA, Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.

Introdução

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são consideradas doença crônica de causa ainda desconhecida, caracterizadas por inflamação do trato gastrointestinal (TGI), em especial no intestino delgado e no cólon. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite ulcerativa (RCU) são as formas mais comuns das DII (1).

A prevalência e a incidência destas doenças variam muito de acordo com a região e os métodos empregados no diagnóstico dos pacientes (2), apresentando maior índice em países desenvolvidos, com alto grau de industrialização, com população de origem predominantemente caucasiana, como os países do norte europeu e América do Norte (3). Um estudo europeu demonstrou prevalência de DC variando entre 1,5 e 213 casos por 100.000 habitantes, e de RCU entre 2,4 e 294 casos por 100.000 habitantes (4). Nos Estados Unidos da América, taxas de incidência de DC acima de 6,38 casos novos/100.000 habitantes/ano, e de RCU acima de 7,71 casos novos/100.000 habitantes/ano (5). Gasparini e cols. (6) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a incidência e prevalência das DII no Estado de São Paulo, Brasil. No período entre 2012 e 2015, os autores observaram uma taxa média de incidência anual das DII de 13,3 casos novos por 100.000 habitantes/ano (DC = 6,14 casos novos por 100.000 habitantes/ano; RCU = 7,16 casos novos por 100.000 habitantes/ano).

As DII ocorrem em ambos os sexos, embora exista uma discreta predominância do sexo feminino nos pacientes com DC (7). Já na RCU essa predominância parece ser discretamente a favor do sexo masculino. 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 (8). Esses fatores podem levar à modificação da resposta imune padrão e à formação de resposta inflamatória alterada (7).

A DC caracteriza-se por focos de inflamação transmural que podem afetar qualquer segmento do TGI, desde a mucosa oral até o ânus e a região perianal (9), acomete o íleo terminal em 47% dos casos, o cólon em 28%, a região íleocolônica em 21% e o trato gastrointestinal superior em 3% dos casos. Pode ser classificada em tipo inflamatório (70% dos pacientes), estenosante (17% dos pacientes) ou penetrante/fistulizante ou ambos (13% dos casos) (10). 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 (11).

Na RCU, a inflamação é caracteristicamente restrita à superfície da mucosa e submucosa. O distúrbio começa no reto e geralmente se estende de maneira contínua por todo o cólon (12). A RCU é classificada como: proctite (envolvimento limitado ao reto), hemicolite esquerda (envolvendo o cólon sigmoide com ou sem envolvimento do cólon descendente) e pancolite (envolvimento de todo o cólon) (13). 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 elucidadas (14). A RCU evolui em surtos, ocorrendo períodos de exacerbação e remissão das lesões e dos sintomas, às vezes ao longo de muitos anos (14). Assim como na DC, as manifestações sistêmicas como fadiga, febre, anorexia e emagrecimento, são também encontradas na maioria dos pacientes com RCU (15). 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 (14). O risco de câncer colorretal (CCR) na colite ulcerosa é aumentado em pacientes com doença de longa data em comparação com a população em geral, com

risco cumulativo de 2% após 10 anos de diagnóstico, 8% após 20 anos e 18% após 30 anos (16).

O tratamento da DII requer frequentemente terapia a longo prazo, baseada na combinação de medicamentos para controlar a doença, como aminossalicilatos, corticóides, imunomoduladores (tiopurinas, tacrolimus e metotrexato) e terapia biológica como os agentes anti-fator de necrose tumoral (anti-TNF) (infliximabe e adalimumabe (17) anti-integrinas como o vedolizumabe ou anti-interleucinas.

Assim sendo, DII envolve complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Entretanto, os mecanismos envolvidos na sua patogênese ainda são desconhecidos (7). Estudos indicam que muitos genes estão alterados na DC e RCU, além daqueles envolvidos na resposta imune. Apesar desse conhecimento prévio, os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento das diferentes formas de DII não são entendidos, bem como as diferentes respostas do pacientes aos tratamentos empregados (18).

Ressaltamos a importância dos mecanismos de regulação gênica, por meio da ação de RNAs não codificantes, em particular os microRNAs (miRNAs), nos mecanismos moleculares de doenças como a DII. Os miRNAs são RNAs pequenos, de aproximadamente 18-22 nucleotídeos de comprimento não codificantes porém importantes reguladores pós-transcricionais de genes codificantes de proteínas (19). Os miRNAs estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, diferenciação, apoptose e proliferação celular (20). Além disso, desempenham papéis importantes em doenças humanas, incluindo doenças crônico-degenerativas. Nos últimos anos, os miRNAs têm sido evidenciados como importantes moduladores da resposta imune (19). Adicionalmente, têm sido evidenciados como biomarcadores com potencial utilidade clínica no diagnóstico,

determinação do prognóstico e tratamento de pacientes com doenças como por exemplo o câncer (21).

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 sua expressão como biomarcadores no plasma ou no soro humano (22).

De acordo com dados do miRBase (data de acesso atualizada em:05 de Dezembro, 2019) (www.mirbase.org), um banco de dados que fornece informações integradas sobre sequência de miRNAs, até o momento, foram descritos e caracterizados 2.654 miRNAs no genoma humano (23). Neste contexto, a identificação de alterações na expressão de miRNAs em pacientes com DC ou RCU deve contribuir para a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DII. Além disso, miRNAs poderão constituir biomarcadores clinicamente relevantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e ou impactar o desenvolvimento de terapêuticas mais precisas para pacientes com essas doenças.

Alterações em miRNAs em pacientes com DII foram descritas pela primeira vez por Wu F. e col. em 2008 (24). 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 indivíduos saudáveis 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 (24). O miR-192 foi demonstrado regular negativamente a expressão de peptídeo 2-alfa macrófagos inibitório, expressa em células epiteliais (25).

A identificação do perfil global de expressão de miRNAs circulantes foi realizada em estudo incluindo 20 pacientes com RCU e 20 indivíduos controle (19). Por meio de 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 (19).

A expressão diferencial de miRNAs no sangue periférico ou no plasma pode ser ferramenta útil 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 (26). Um exemplo é o miR-126, que se apresentou aumentado em pacientes com RCU ativa. Este miRNA pode desempenhar papel importante na regulação da inflamação em doenças inflamatórias crônicas, uma vez que tem como uma de suas funções bloquear o inibidor do fator nuclear-kappa B alfa, o qual atua como inibidor da via de sinalização NF-kB (26).

Embora os estudos citados acima indiquem o envolvimento de miRNAs em DII, a maioria destes é baseado na investigação de um painel limitado de miRNAs. Além disso, não há relatos da expressão global de miRNAs circulantes e da 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 mecanismos moleculares associados à patogênese das DII. Particularmente, os miRNAs podem constituir biomarcadores úteis na diferenciação de pacientes com as diferentes formas de DII, respondedores e não respondedores ao tratamento.

A fim de contextualizar nosso trabalho com os dados da literatura, realizamos uma pesquisa na base de dados PubMed e identificamos estudos de miRNAs circulantes em DII. Utilizando as palavras-chaves: “microRNA AND circulating AND inflammatory bowel disease”, identificamos 30 artigos científicos publicados em revistas indexadas (pesquisa atualizada aos 02 de Dezembro de 2019). Todos os artigos foram analisados e dos 30 artigos identificados, 17 foram excluídos pelas seguintes razões: 7 tratavam de outras doenças, como o câncer; 6 eram outros tipos de estudo não contendo dados experimentais(revisão da literatura e editoriais); 1 em outra língua que não o inglês e 3 referiam-se à estudos de DNA. Os 13 estudos restantes estão relacionados à miRNAs circulantes em pacientes com DII, em amostras de plasma, soro e tecidos. Os estudos encontram-se organizados no **Quadro1**, em ordem cronológica ascendente.

Quadro 1. Descrição dos estudos publicados avaliando miRNAs circulantes em doença inflamatória intestinal, com pelo menos um dos objetivos sendo a análise de expressão de miRNAs.

Estudo	Tipo de amostras	Pacientes controle	Doença	Delineamento e métodos	Resultados principais	Conclusões principais do estudo
Chen et al. 2019 (27)	Soro	Soro: 140	Coorte de descoberta DC: 40 UC: 40 Controles saudáveis: 40Coorte de treinamento DC:100 UC: 100 Controles saudáveis:100 Coorte de validação DC:66 Controle pacientes: 41	RT-qPCR	Expressão sérica de miRNA 146b - 5p (miR - 146b - 5p) foi 2,87- e 2,72 vezes maior em pacientes com DC e RCU	MiR - 146b - 5p pode refletir melhor a inflamação da mucosa na DII do que a PCR.
Schönauen et al. 2018 (28)	Soro e fezes	Soro: 20 Fezes: 15	DC: 36 soro e 39 fezes RCU: 15 soro e 18 fezes	RT-qPCR	Expressão aumentada nos miR-16, miR-21 e miR-223, mas não miR-155, em comparação com os controles e foram maiores na DC do que nos pacientes com RCU.	Correlacionaram a expressão de miRNAs nas fezes com a atividade da doença; sugeriram os miRNAs como potenciais biomarcadores em DII.
Sun et al. 2017 (29)	Plasma	Plasma: 37	DC ativo: 29 DC remissão: 37	RT-qPCR	A expressão de miR-125a foi diminuída em pacientes com DC e aumentou quando os pacientes alcançaram remissão clínica (após tratamento em três meses)	Na DC ativa, a expressão de miRNAs foi correlacionada negativamente com a gravidade da doença e com a expressão de citocinas inflamatórias em pacientes com doença de Crohn.

Oikonomopoulo et al. 2016 (30)	Soro	Soro: 21	DC ativo: 21 DC remissão: 24	Nanostring Technology	2 miRNAs (hsa-miR-1286 e hsa-miR1273d) expressão diminuída em DC ativa em relação aos em remissão.	Demonstraram diferenças significativas na expressão de miRNAs séricos circulantes; sugeriram que os miRNAs devem constituir novos marcadores em DII;
Wang et al. 2016 (31)	Soro	Soro: 50	DC: 50 RCU: 50	RT-qPCR	miR-223 apresentaram expressão aumentado na CD e RCU, teve uma correlação positiva com indicadores de atividade da doença tanto na DC quanto na UC, sugerindo que o nível de miR-223 estava associado à atividade da doença de DII.	O miR-223 sérico foi um método mais confiável para monitorar a atividade da doença do que a VHS ou a PCR podendo servir como um novo biomarcador para a DII.
Polytarchou et al. 2015 (32)	Soro	Soro: 21	RCU ativo: 24 RCU remissão: 22	Nanostring Technology	6 miRNAs (miR-4454, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-148b-3p, miR-320e e miR-4516) expressão diminuídos em RCU remissão comparados com RCU ativa e pacientes em remissão comparados com os ativos não atingiu significância estatística.	A análise de subgrupos específicos dos pacientes e os miRNAs séricos identificados, podem ser parâmetros a serem testados, pela sua utilidade na estratificação de risco, monitoramento da atividade da doença e avaliação das respostas aos medicamentos.

Jensen et al. 2015 (33)	Plasma	Plasma: 6	DC: 6 Coorte de validação DC:102	RT-qPCR	6 miRNAs(miR-369-3p, miR-376a, miR-376, miR-411 , miR-411) com expressão diminuído nos pacientes com CD em comparação com controles e 3 miRNAs (miR-200c, miR-181-2p e miR-125a-5p) com expressão. Coorte de validação, apenas o miR-16 foi significativamente reduzido.	A análise identificou nove miRNAs plasmáticos diferencialmente expressos em pacientes com DC em comparação com controles. Em uma validação clinicamente relevante, sintomática coorte, apenas hsa-miR-16 foi expresso diferencialmente, Será importante realizar estudos adicionais que validem nossos achados de biomarcadores de miRNAs.
Lewis et al. 2015 (34)	Soro	1ºcoorte: soro: 5 2º coorte: soro:5	1ºcoorte DC estenosante: 13 DC não estenosante: 16 2º coorte DC estenosante: 6 DC não estenosante 11	RT-qPCR	Os miR-19a-3p e miR-19b-3p apresentou expressão diminuída quando comparado com controle nas duas coortes.	A análise sérica em pacientes com 4 anos de acompanhamento confirma a hipótese de que o miR-19a-3p e o miR-19b-3p reduziram o desenvolvimento de estenose
Krissansen Et al. 2015 (35)	Soro	Soro: 58	DC: 57 DC ativo: 10 RCU: 62 RCU ativo: 10	RT-qPCR	MiR-595 e miR-1246 foram significativamente aumentados nos soros de pacientes com DC, RCU quando comparados com controle	Os miRNAs miR-595 e miR-1246 serão possíveis biomarcadores em pacientes com DC e RCU ativos.

Zahm et al. 2014 (36)	Tecido Soro	Tecido:50 Soro: 18	Tecido DC:12 RCU:18 Soro DC:11 RCU:18	RT-qPCR	O miR-24 no tecido estava aumentado na RCU quando comparado com a DC e foi o único miRNA alterado entre os subtipos de DII. Nenhum miRNAs sérico foram encontrados para distinguir DC da RCU.	O estudo apresentou algumas limitações como: pouca amostra de soro e tecido, interferindo na análise de miRNA.Será importante realizar estudos adicionais que validem nossos achados de biomarcadores de miRNAs.
Paraskevi et al. 2012 (37)	Sangue	Sangue : 162	DC: 128 RCU: 88	RT-PCR	11 miRNAs (miR-16, miR-23a, miR-29a, miR-106a, miR-107, miR-126, miR-191, miR-199a-5p, miR-200c, miR-362-3p e miR-532-3p com expressão aumentada na DC em comparação com os controles. Na RCU, três miRNAs (miR-16, miR-21, miR-28-5p, miR-151-5p, miR-155 e miR-199a-5p) foram significativamente aumentados em comparação com controles.	Vários miRNAs podem distinguir DC de RCU. Os miRNAs podem representar novos biomarcadores não invasivos para distinguir UC e CD.
Zahm et al. 2011 (38)	Soro	Soro: 32	DC: 46	RT-qPCR	Foram encontrados 24 miRNAs com expressão aumentada. dos quais foram escolhidos 11(miR-16,miR-484, miR-30e, miR-106a, miR-195, miR-20a, miR-21, miR-140, Let-7b, miR-192 e miR-93)para estudo de validação.	Os 11 miRNAs séricos validados podem ser úteis como biomarcadores não invasivos na DC

Wu et al. 2011 (39)	Sangue	Sangue: 13	DC ativo: 14 DC inativo: 5 RCU ativo: 10 RCU inativo: 10	RT-qPCR	Na DC ativa foram identificados 12 aumentados e 6 diminuídos. Na RCU foram identificados 12 miRNAs aumentados e 5 miRNAs diminuídos, 8 miRNAs (miRs-28-5p, -103-2 *, 149 *, -151-5p, -340 *, -505 *, -532-3p e miR-plus-E1153) foram capazes de distinguir DC ativa de RCU ativa.	Os dados confirmam a evidência de que DC e RCU estão associadas a diferentes tipos de células imunes circulantes e que a expressão diferencial de miRNAs do sangue periférico pode formar a base de futuros testes de diagnóstico para doença inflamatória intestinal .
------------------------	--------	------------	---	---------	---	---

Conclusões

- Nossos resultados mostraram que um conjunto específico de miRNAs (let-7f-5p, miR-200b-3p, miR-190a-5p, miR-452-5p, miR-342-5p, miR-655-3p, miR-148a-3p, miR-148b-3p e miR-202-3p) está com expressão desregulada no plasma de pacientes com DC e RCU;
- A expressão de miRNAs foi correlacionada com a resposta ao tratamento nas diferentes formas da doença (pacientes respondedores *vs* não respondedores). Os miRNAs com expressão aumentada na DC (let-7f-5p, miR-200b-3p, miR-190a-5p, miR-452-5p e miR-342-5p) e na RCU (miR-655-3p, miR-148a-3p, miR-148b-3p e miR-202-3p) foram considerados potencialmente relevantes para uso clínico (futuro), devido a sua detecção apenas no plasma dos pacientes e não nos indivíduos sem doença.
- Os miRNAs identificados como alterados modulam uma ampla gama de genes-alvo, os quais, por sua vez, regulam vias moleculares potencialmente associadas com as diferentes formas da doença.

Referências bibliográficas

1. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006.
2. Cosnes J, Gowerrousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011.
3. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: Reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2008.
4. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: The ECCO-EpiCom inception cohort. *Gut*. 2014.
5. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017.
6. Gasparini RG, Sasaki LY, Saad-Hossne R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clin Exp Gastroenterol*. 2018.
7. Loftus E V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004.
8. Victoria CR, Sasaki LY, Nunes HRDC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2009.
9. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011.
10. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2010.
11. 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.
12. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009.
13. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: Controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006.
14. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007.
15. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*. 2007.
16. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut*. 2001.
17. Malagelada JR, Bazzoli F, Boeckxstaens G, De Looze D, Fried M, Kahrilas P, et

- al. World gastroenterology organisation global guidelines. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2015.
18. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: The emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*. 2013.
 19. 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.
 20. Leva G Di, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: Fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. 2006.
 21. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006.
 22. 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.
 23. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019.
 24. 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 α . *Gastroenterology*. 2008.
 25. 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.
 26. Danese S. Immune and nonimmune components orchestrate the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011.
 27. Chen P, Li Y, Li L, Yu Q, Chao K, Zhou G, et al. Circulating microRNA146b-5p is superior to C-reactive protein as a novel biomarker for monitoring inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019.
 28. Schönauen K, Le N, Von Arnim U, Schulz C, Malfertheiner P, Link A. Circulating and fecal microRNAs as biomarkers for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2018.
 29. Sun CM, Wu J, Zhang H, Shi G, Chen ZT. Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2017.
 30. Oikonomopoulos A, Polytaichou C, Joshi S, Hommes DW, Iliopoulos D. Identification of Circulating MicroRNA Signatures in Crohn's Disease Using the Nanostring nCounter Technology. *Inflamm Bowel Dis*. 2016.

31. Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, et al. Circulating MicroRNA223 is a new biomarker for inflammatory bowel disease. *Med (United States)*. 2016.
32. Polytarchou C, Oikonomopoulos A, Mahurkar S, Touroutoglou A, Koukos G, Hommes DW, et al. Assessment of circulating MicroRNAs for the diagnosis and disease activity evaluation in patients with ulcerative colitis by using the nanostring technology. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
33. Jensen MD, Andersen RF, Christensen H, Nathan T, Kjeldsen J, Madsen JS. Circulating microRNAs as biomarkers of adult Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015.
34. Lewis A, Mehta S, Hanna LN, Rogalski LA, Jeffery R, Nijhuis A, et al. Low serum levels of microRNA-19 are associated with a stricturing Crohn's disease phenotype. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
35. Krissansen GW, Yang Y, McQueen FM, Leung E, Peek D, Chan YC, et al. Overexpression of miR-595 and miR-1246 in the sera of patients with active forms of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015.
36. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohn's Colitis*. 2014.
37. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis*. 2012.
38. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011.
39. 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.
40. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's Disease Activity Index: National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976.
41. S SM, Satsangi J, Ahmad T, D AI, N BC, R BS, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie JID - 8807867*. 909.
42. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005.
43. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozena AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016.

44. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009.
45. Peart MJ, Smyth GK, Van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005.
46. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, et al. MirDIP 4.1 - Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 2018.
47. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018.
48. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* 2009.
49. Heberle H, Meirelles VG, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics.* 2015.
50. Korpala M, Kang Y. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biology.* 2008.
51. Feng B, Wang R, Chen LB. Review of MiR-200b and cancer chemosensitivity. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2012.
52. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell.* 2016.
53. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009.
54. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009.
55. He X, Dong Y, Wu CW, Zhao Z, Ng SSM, Chan FKL, et al. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol Med.* 2012.
56. Gao C, Zhang Z, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H. Reduced MicroRNA-218 expression is associated with high nuclear factor kappa B activation in gastric cancer. *Cancer.* 2010.
57. Alajez NM, Lenarduzzi M, Ito E, Hui ABY, Shi W, Bruce J, et al. miR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res.* 2011.
58. Tatarano S, Chiyomaru T, Kawakami K, Enokida H, Yoshino H, Hidaka H, et al. miR-218 on the genomic loss region of chromosome 4p15.31 functions as a tumor suppressor in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2011.

59. Chen Y, Ge W, Xu L, Qu C, Zhu M, Zhang W, et al. miR-200b is involved in intestinal fibrosis of Crohn's disease. *Int J Mol Med*. 2012.
60. Lin Z, Ge J, Wang Z, Ren J, Wang X, Xiong H, et al. Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk. *Sci Rep*. 2017.
61. Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A, Agrawal A, et al. Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011.
62. Tan W, Gu Z, Leng J, Zou Xiaodong, Chen H, Min F, et al. Let-7f-5p ameliorates inflammation by targeting NLRP3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother*. 2019.
63. Wang S, Tang Y, Cui H, Zhao X, Luo X, Pan W, et al. Let-7/miR-98 regulate Fas and Fas-mediated apoptosis. *Genes Immun*. 2011.
64. Geng L, Zhu B, Dai BH, Sui CJ, Xu F, Kan T, et al. A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011.
65. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010.
66. Ten Hove T, Van Montfrans C, Peppelenbosch MP, Van Deventer SJH. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*. 2002.
67. Fujioka S, Nakamichi I, Esaki M, Asano K, Matsumoto T, Kitazono T. Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014.
68. Yu Y, Cao XC. MiR-190-5p in human diseases. *Cancer Cell International*. 2019.
69. Xu S, Wang T, Song W, Jiang T, Zhang F, Yin Y, et al. The inhibitory effects of AR/miR-190a/YB-1 negative feedback loop on prostate cancer and underlying mechanism. *Sci Rep*. 2015.
70. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Søkilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, et al. The rectal cancer microRNAome - MicroRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clin Cancer Res*. 2012.
71. Almog N, Briggs C, Beheshti A, Ma L, Wilkie KP, Rietman E, et al. Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated microRNA-190. *Transcription*. 2013.
72. MiR-452-5p may serve as an oncogene in colorectal cancer through targeting CDKN1B: a study based on bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter assay. *Int J Clin Exp Med*. 2019.
73. He X, Shu Y. miR-452 promotes the development of gastric cancer via targeting

- EPB41L3. *Pathol - Res Pract*. 2019.
74. Ahmadi R, Heidarian E, Fadaei R, Moradi N, Malek M, Fallah S. MiR-342-5p expression levels in coronary artery disease patients and its association with inflammatory cytokines. *Clin Lab*. 2018.
 75. Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014.
 76. Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: Cellular mediators and animal models. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2000.
 77. Kuivaniemi H, Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*. 2019.
 78. Ballengee CR, Stidham RW, Liu C, Kim MO, Prince J, Mondal K, et al. Association Between Plasma Level of Collagen Type III Alpha 1 Chain and Development of Strictures in Pediatric Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019.
 79. Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, et al. miR-655 Is an EMT-Suppressive MicroRNA Targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 2013.
 80. Li Y, Deng X, Zeng X, Peng X. The role of Mir-148a in cancer. *Journal of Cancer*. 2016.
 81. Porstner M, Winkelmann R, Daum P, Schmid J, Pracht K, Côte-Real J, et al. MiR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2. *Eur J Immunol*. 2015.
 82. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg*. 2010.
 83. Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, Haier J, et al. Mir-148a Improves Response to Chemotherapy in Sensitive and Resistant Oesophageal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Cells. *J Gastrointest Surg*. 2011.
 84. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.
 85. Shi C, Wu L, Lin W, Cai Y, Zhang Y, Hu B, et al. MiR-202-3p regulates interleukin-1 β -induced expression of matrix metalloproteinase 1 in human nucleus pulposus. *Gene*. 2019;.
 86. Dou D, Shi YF, Liu Q, Luo J, Liu JX, Liu M, et al. Hsa-miR-202-3p, up-regulated in type 1 gastric neuroendocrine neoplasms, may target DUSP1. *World J Gastroenterol*. 2018.
 87. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: An interface

- between health and disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2003.
88. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med*. 2002.
 89. Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, Keshavarzian A. Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: Role of the microtubule cytoskeleton. *Free Radic Biol Med*. 2000.
 90. Westbrook AM, Wei B, Braun J, Schiestl RH. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res*. 2009;
 91. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control*. 2007.