



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL**

MONIQUE SUELLEN LIMA DA SILVEIRA

**MICRORNAS COMO BIOMARCADORES EM INFECÇÕES**

BELÉM-PARÁ

2018

MONIQUE SUELLEN LIMA DA SILVEIRA

## **MICRORNAS COMO BIOMARCADORES EM INFECÇÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos  
Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Luciana S. Silva

BELÉM-PARÁ

2018

MONIQUE SUELLEN LIMA DA SILVEIRA

## MICRORNAS COMO BIOMARCADORES EM INFECÇÕES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Luciana S. Silva

Belém, \_\_\_\_\_ de Maio de 2018

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos  
Universidade Federal do Pará (UFPA) – Presidente

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Renata Bezerra Hermes  
Universidade Federal do Pará (UFPA) - Titular

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Mioni Thieli Figueiredo M. de Brito  
Universidade Federal do Pará (UFPA) – Titular

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Giselle Maria Rachid Viana  
Universidade Federal do Pará (UFPA) - Titular

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Maisa Silva de Sousa  
Universidade Federal do Pará (UFPA) - Suplente

BELÉM-PARÁ  
2018

Dedico este trabalho a minha filha Geovanna, meu estímulo maior. Pela oportunidade de experimentar a mais pura forma de amor, por compreender a minha ausência, onde passava dias sem mim, pedindo por minha presença. Gostaria de dizer que em todas as horas quando o desespero surge, seu sorriso vem a minha memória e a serenidade me permite prosseguir.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar em todos os momentos, pela força concedida durante mais essa jornada, pelas vezes em que me escutou chorando achando que nada daria certo.

Aos meus pais Celso e Fátima, meus eternos amores, a gratidão, amor, carinho, educação, compreensão, oportunidades... vocês que muitas vezes tiveram que trabalhar dobrado renunciando seus sonhos em favor dos meus... o meu mais profundo agradecimento.

Aos meus irmãos Tata e Paraíba, que me surpreenderam, acreditando em cada etapa concluída.

Ao Takeru, que teve toda paciência durante este trabalho, sempre disposto a qualquer hora que precisasse incentivando e apoiando.

Ao meu orientador Eduardo, que com muita sabedoria me conduziu até as últimas linhas. Obrigada pela dedicação, competência, ensinamentos e amizade, durante toda a realização desta pesquisa. Seus ensinamentos estarão presentes por toda a minha vida. A professora Andrea, minha mais que co-orientadora pelas sábias sugestões, obrigada por acompanhar meu trabalho desde o início.

Aos amigos incentivadores e companheiros de longa jornada: Ainoa, Lilian Babu, Kelly, que com muita lealdade enfrentamos esse período de obstáculos, alegrias, tristezas, lágrimas, sorrisos, derrotas e enfim vitória.

Obrigada a toda família LGHM pela oportunidade de além de estar em trabalho, estar em família! E por toda ajuda e apoio, cada um com suas particularidades foram indispensáveis para o projeto.

E, sobretudo ao fiel escudeiro e amigo Denison, que tanto me ajudou na construção deste trabalho, mais que isso, me impulsionou com suas palavras de incentivo, carinho e identificação com minha vida... espero poder contar com sua amizade por toda a vida.

Obrigada também a todas as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a concluir esta pesquisa.

*“A manutenção na natureza de variantes favoráveis e a eliminação de variantes prejudiciais eu chamo Seleção Natural. Variações que não são nem úteis nem prejudiciais não serão afetadas pela Seleção Natural e são como variantes flutuantes, como talvez observemos nas espécies chamadas polimórficas. ”*

(Charles Darwin)

## RESUMO

Os miRNAs são moléculas de ~22 nucleotídeos de RNA não-codificantes que regulam a expressão de genes alvos no nível pós-transcricional por repressão translacional ou degradação de RNAs mensageiros. Desempenham um papel significativo nos mecanismos reguladores, na diferenciação celular, tumorigênese, apoptose e proliferação celular. Alterações nos níveis de expressão de miRNAs podem levar a um desequilíbrio no mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica que pode estar relacionado com a origem e progressão de diferentes patologias. Estudos têm constatado que miRNAs podem ser muito úteis para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitorização da resposta terapêutica nessas doenças. A presença e a estabilidade de miRNAs em fluidos biológicos demonstram sua capacidade de contribuir como potenciais biomarcadores em diversos quadros clínicos, várias abordagens podem ser usadas para detecção como: PCR quantitativa de transcrição reversa (qRT-PCR), métodos baseados em hibridização e sequenciamento de nova geração. A expressão de miRNAs encontra-se alterada em várias doenças e com o avanço da tecnologia é possível manipular a expressão injetando miRNAs similares ao uso de mRNAs antissense e RNAi. Nesse estudo, buscou-se identificar por meio de revisão sistemática da literatura e de bancos de dados, miRNAs associados a doenças infecciosas que possam ser usados como biomarcadores diagnósticos e prognóstico/preditivos. Os artigos foram selecionados visando analisar o papel de miRNAs nos contextos de: progressão e manutenção da infecção, diagnóstico, prognóstico e possíveis terapias; a discussão se baseou em demonstrar por quais mecanismos os miRNAs estão envolvidos nesses quadros. Os artigos escolhidos versaram sobre a relação de miRNAs com as infecções virais (HBV, HCV, HIV, HTLV, Influenzae, Dengue, HPV, Ebola, Herpes, Adenovírus, Enterovírus e Epstein bar), infecções bacterianas (*Micobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosa*), infecções parasitárias (*Schistosoma japonicum*) e por *Cryptosporidium parvum*. A partir da análise e discussão do papel dos miRNAs citados no trabalho, atestou-se que os mesmos podem integrar painéis de expressão para quadros infecciosos confeccionados a partir de uma análise exploratória teórica, que podem ser elaborados levando em conta as especificidades e particularidades de cada infecção. A possibilidade da detecção desses miRNAs em fluidos corporais facilita que esses painéis sejam incorporados futuramente na prática e rotina dos laboratórios, podendo auxiliar no diagnóstico e prognóstico de pacientes acometidos por infecções.

**Palavras-chaves:** miRNA, Biomarcador, Infecção, Diagnóstico, Prognóstico.

## ABSTRACT

The miRNAs are 22 nucleotide molecules of non-coding RNA that regulate the expression of target genes at the post-transcriptional level by translational repression or degradation of messenger RNAs. These miRNAs play a significant role in regulatory mechanisms, cell differentiation, tumorigenesis, apoptosis and cell proliferation. Changes in miRNA expression levels may lead to a variance in the mechanism of post-transcriptional regulation of gene expression that may be related to the origin and progression of different pathologies. Studies have found that miRNAs may be very useful to support the diagnosis, prognosis and monitoring of the therapeutic response in these diseases. The presence and stability of miRNAs in biological fluids demonstrates their ability to contribute as potential biomarkers in a number of clinical settings. Various approaches can be used for detection as: reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR), hybridization-based methods and next generation sequencing. Expression of miRNAs is altered in several diseases and with the advancement of technology it is possible to manipulate expression by injecting miRNAs similar to the use of antisense mRNAs and RNAi. In this study, we sought to identify, through a systematic review of the literature and databases, miRNAs associated with infectious diseases that can be used as diagnostic and prognostic/predictive biomarkers. The articles were selected to analyze the role of miRNAs in the contexts of: infection progression and maintenance, diagnosis, prognosis and possible therapies; the discussion was based on demonstrating which mechanisms miRNAs are involved in these frameworks. The selected articles focused on the relationship of miRNAs with viral infections (HBV, HCV, HTLV, Influenzae, Dengue, HPV, Ebola, Herpes, Adenovirus, Enterovirus and Epstein bar), bacterial infections (Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori and Pseudomonas aeruginosa), parasitic infections (Schistosoma japonicum) and Cryptosporidium parvum. From the analysis and discussion of the role of miRNAs cited in the study, it was shown that they can integrate expression panels for infectious pictures made from a theoretical exploratory analysis, which can be elaborated taking into account the specificities and particularities of each infection. The possibility of detection of these miRNAs in body fluids facilitates that these panels be incorporated in the future in the practice and routine of the laboratories, being able to support the diagnosis and prognosis of patients affected by infections.

**Keywords:** miRNA, Biomarker, Infection, Diagnosis, Prognosis.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Esquema da biogênese dos miRNAs.....  | 13 |
| <b>Figura 2-</b> RT-qPCR: métodos para a síntese de cDNA por transcrição reversa.....  | 20 |
| <b>Figura 3-</b> Diagrama do procedimento de análise do perfil de expressão de miRNA usando análise de microarray.....                               | 22 |
| <b>Figura 4-</b> Processo de descoberta e desenvolvimento de microRNA.....   | 24 |
| <b>Figura 5-</b> Expressão percentual de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas em indivíduos normais de acordo com o tecido.....        | 47 |
| <b>Figura 6-</b> Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no sangue total de indivíduos normais.....                          | 48 |
| <b>Figura 7-</b> Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no soro de indivíduos normais.....                                  | 49 |
| <b>Figura 8-</b> Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no plasma de indivíduos normais.....                                | 50 |
| <b>Figura 9-</b> Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas na saliva de indivíduos normais.....                                | 51 |
| <b>Tabela 1-</b> Distribuição dos miRNAs por infecção e por agente infeccioso, localização cromossômica, número de artigos e local de expressão..... | 30 |
| <b>Tabela 2-</b> miRNAs com associações a dois quadros infecciosos.....  | 45 |
| <b>Tabela 3-</b> Painéis de miRNAs e suas associações.....   | 52 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 11 |
| <b>1.1 MiRNA: conceito e histórico</b> .....                               | 11 |
| <b>1.2 Biogênese do miRNA</b> .....  | 12 |
| <b>1.3 Regulação da Expressão de miRNA</b> .....                           | 14 |
| <b>1.4 miRNAs e a Resposta Imune</b> .....                                 | 15 |
| <b>1.5 O uso de miRNAs como biomarcadores</b> .....                        | 16 |
| <b>1.6 Métodos de Detecção de miRNA</b> .....                              | 18 |
| 1.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR)..... | 18 |
| 1.6.2 Northern blotting (NB).....  | 21 |
| 1.6.3 Microarray.....  | 21 |
| 1.6.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....                            | 23 |
| <b>1.7 MiRNA e seu uso terapêutico</b> .....                               | 23 |
| 1.7.1 Os miRNAs nas Infecções Virais.....                                  | 24 |
| 1.7.2 miRNA no Câncer e em Outras Doenças.....                             | 25 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 27 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....  | 27 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....                                     | 27 |
| <b>3. METODOLOGIA</b> .....  | 28 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                     | 29 |
| <b>4.1 Infecção por Vírus</b> .....  | 29 |
| 4.1.1 Infecção pelo Vírus da Hepatite B (HBV).....                         | 29 |
| 4.1.2 Infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV).....                         | 35 |
| 4.1.3 Infecção por Influenzae.....   | 39 |
| 4.1.4 Infecção pelo vírus da Dengue.....                                   | 39 |
| 4.1.5 Infecção por Enterovírus.....  | 40 |
| 4.1.6 Infecção por Adenovírus.....   | 40 |
| 4.1.7 Infecção por Ebola.....  | 40 |
| 4.1.8 Infecção por HTLV.....   | 41 |
| 4.1.9 Infecção por HIV e HPV.....  | 41 |
| <b>4.2 Infecção por Protozoário</b> .....                                  | 42 |
| <b>4.3 Infecção Parasitária</b> .....                                      | 42 |

|   |    |
|---|----|
| <b>4.4 Infecção Bacteriana</b> .....          | 43 |
| 4.4.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....        | 43 |
| 4.4.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..... | 44 |
| <b>4.5 Painel de Expressão</b> .....          | 45 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....                     | 52 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....                   | 53 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MiRNA: conceito e histórico.

Até meados do ano de 1990, os estudos genéticos, como um todo, eram baseados nas regiões codificantes do DNA, buscando o entendimento das funções, regulação e o papel dos produtos gênicos nos processos fisiológicos e patológicos. O DNA restante foi considerado como “lixo” por vários pesquisadores por diversos anos (DRUSCO & CROCE, 2017). Foi quando em 1993, que Lee e colaboradores descobriram a existência de uma região não-codificadora curta (*lin-4*) regulando negativamente a expressão de *LIN-14* durante o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

Depois da descoberta do *Lin-4*, poucos trabalhos foram publicados sobre este tema levando a comunidade científica a considera-lo como ceticismo, mas em 2000 Pasquinelli (PASQUINELLI et al., 2000) e Reinhart (REINHART et al., 2000) encontraram outro pequeno RNA de 21 nucleotídeos, *let-7*, que regulava o desenvolvimento de *C. elegans*. No ano de 2001 esses pequenos RNAs não codificantes foram classificados como uma nova classe de genes e foram denominados microRNAs, miRNAs ou miRs (LAU et al, 2001; LAGOS-QUINTANA, 2002).

A partir de então centenas de miRNAs foram identificados em moscas, ratos, células humanas e plantas (DRUSCO & CROCE, 2017). A versão mais recente do miRBase - repositório público para todas as sequências de microRNA publicadas e anotações associadas - (v20, junho de 2013) contém 24.521 loci de microRNA de 206 espécies, processadas para produzir 30.424 produtos de microRNA maduros (KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2013).

Os miRNAs são moléculas de ~22 nucleotídeos de RNA não-codificantes que regulam a expressão de genes alvo no nível pós-transcricional por repressão translacional ou degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) (AMBROS, 2004). Os microRNAs estão localizados por si próprios ou residem em regiões intrônicas ou exônicas de genes codificadores e não-codificantes, podem ser únicos, bi ou policistrônicos, são transcritos de forma dependente e independente de outros genes (MONTEYS et al., 2010; VERONESE et al., 2015).

O miRNA desempenha um papel significativo nos mecanismos reguladores que operam em vários organismos, incluindo o tempo de desenvolvimento e interação do patógeno do hospedeiro, e também tem um papel importante na diferenciação celular, tumorigênese,

apoptose e proliferação que resulta na modulação da patologia e fisiologia de várias doenças, como doença cardiovascular, e câncer (TIWARI et al., 2018).

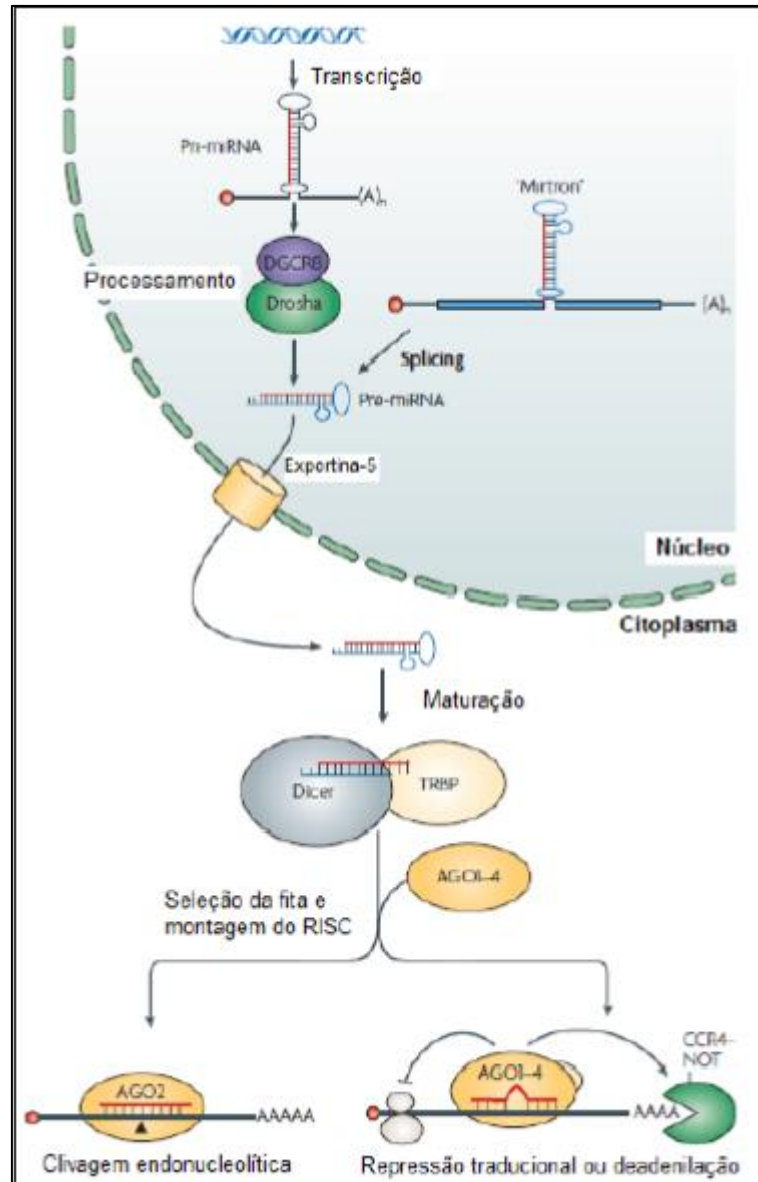
## 1.2 Biogênese do miRNA

A biogênese do miRNA (Figura 1) inicia na transcrição gênica pela enzima RNA polimerase II (RNase II), gerando uma longa sequência de miRNA primário (pri-miRNA), que possui aproximadamente 110pb e apresenta em suas extremidades as estruturas CAP 5'7metilguanossina e cauda 3' poli-A, semelhante a um mRNA. O pri-miRNA dobra-se formando uma estrutura de *hairpin* (constituída por uma haste e um laço), ainda no núcleo essa estrutura é clivada pelo complexo Microprocessador formado por Drosha (endonuclease da família da RNase III) e pelo seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (GRILLARI & GRILLARI-VOGLAUER, 2010; SMITH-VIKOS & SLACK, 2012).

O cofator DGCR8 vai agir orientando o posicionamento correto do pri-miRNA no sítio catalítico da enzima Drosha para que ocorra a clivagem, liberando uma molécula de aproximadamente 70pb denominada de miRNA precursor (pré-miRNA), contendo uma região com estrutura secundária *stem-loop* (grampo de cabelo). Após o processamento nuclear, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela Exportina-5, proteína que realiza exportação nuclear utilizando Ran-GTP como cofator (XUE, 2014).

No citoplasma, o pré-miRNA é inserido em outro complexo microprocessador formado pela enzima RNase III Dicer e pela proteína TRBP (*HIV transactivating response RNA-binding protein*). O reconhecimento do pré-miRNA é feito pela enzima Dicer que também é responsável por clivar a região do *loop*, a clivagem vai ocorrer nas duas extremidades da haste da estrutura em forma de grampo, removendo a alça e as extremidades gerando um dímero constituído pelas duas fitas miRNA (dsRNA, 22pb) denominadas fita 5p e fita 3p de acordo com sua posição em relação às extremidades do pre-miRNA (RÜEGGER & GROBHANS, 2012).

Esse processo de síntese de dsRNA leva a um recrutamento das proteínas da família argonauta (Ago) para a formação do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo RISC se liga a uma das duas fitas do dsRNA para gerar o miRNA maduro (miR-5p), esse miRNA vai atuar regulando a expressão de um mRNA alvo (KRUTZFELDT et al., 2006), enquanto a outra fita (miR-3p) é degradada ou também pode se ligar a outro complexo RISC e regular outro alvo (YANG ET AL., 2011; AMERES & ZAMORE, 2013).



**Figura 1-** Esquema da biogênese dos miRNAs.

Fonte: Filipowicz et al. (2008).

Alguns miRNAs não são sintetizados pela via clássica de biogênese, e podem ser processados de maneira Drosha ou Dicer independente. Os mirtrons são gerados a partir de íntrons de genes pelo processo de *splicing* e não passam pela clivagem realizada pela enzima Drosha. Além disso, alguns miRNAs podem usar outras RNases para esse processo de clivagem, como a RNase Z. Outros miRNAs podem ser derivados de RNA transportador (tRNA) ou utilizam proteínas Argonautas ao invés da enzima Dicer para realizar a clivagem no citoplasma (CHENG, 2015).

### 1.3 Regulação da Expressão de miRNA

A regulação do perfil de expressão de miRNAs está relacionada ao tipo celular, estado fisiológico do corpo e à fatores externos. O conhecimento sobre os mecanismos regulatórios da expressão ainda é limitado, porém a compreensão sobre esses é essencial para o entendimento da variação na expressão de genes codificadores de proteínas. A variação da expressão de miRNA está ligada a processos transcricionais e pós-transcricionais, e também à efeitos de compostos endógenos e exógenos (GULYAEVA & KUSHLINSKIY, 2016).

No processo de regulação transcricional a variação pode ocorrer por mudanças na expressão de um gene hospedeiro ou por hipermetilação na região promotora desses genes. Alterações no nível de metilação das regiões reguladoras/promotoras de genes pode ser um dos mecanismos da regulação da expressão de miRNA, vários estudos já demonstraram genes de miRNAs que se encontram hipermetilados em Câncer, como os genes miR-34b e miR-34c em leucemia linfocítica crônica, e o gene miR-132 associado a pior prognóstico em câncer colorretal. Esses miRNAs tem perda de função pelo processo de hipermetilação, favorecendo a iniciação ou progressão da carcinogênese, e podem ser classificados como supressores de tumor (DENEBERG et al., 2014; QIN et al., 2015).

Na etapa pós-transcricional a regulação da expressão de miRNA pode acontecer através de mudanças na atividade das enzimas que participam da biogênese, tais como Dicer e Drosha. A atividade enzimática pode ser afetada por mutações ou modificações epigenéticas nessas enzimas necessárias no processamento. Estudos demonstram que alterações nos perfis de expressão também podem ser causadas por alterações na exportação de pré-miRNA para o citoplasma, atividade de clivagem deficiente do complexo Dicer/TRBP ou alterações na família de proteínas Ago prejudicando a formação do complexo RISC (BEHM-ANSMANT et al., 2006; KAWAHARA, 2014).

Um estudo realizado por Mehraein et al (2016) comprovou a presença de diversas mutações somáticas e germinativas nos genes que codificam as enzimas: Drosha, DGCR8, Xpo5, Dicer e TRBP, em tumores malignos. Os resultados encontrados demonstravam que a variação no processamento de miRNA pode ter um papel oncogênico, comprovando assim que o perfil de expressão de miRNAs está diretamente relacionado com o início do processo de carcinogênese. A compreensão da via da biogênese do miRNA e de suas possíveis alterações podem auxiliar no estudo de potenciais alvos para intervenção terapêutica em diversos quadros clínicos, como o câncer (TOWLER, et al. 2015).

Os efeitos endógenos (hormônios, citocinas, estresse) e exógenos (xenobióticos, agentes carcinógenos) também atuam na regulação da expressão de miRNA. Estudos demonstram que o miRNA possui um importante papel na carcinogênese induzida quimicamente, isso deve-se ao fato de que os carcinógenos têm a capacidade de afetar a expressão de miRNA. Wei et al (2015) detectaram alterações no perfil de expressão de miRNA de células progenitoras hematopoiéticas de camundongos após a exposição de 4 semana a um tratamento com benzeno. Outro estudo realizado por Huuonen et al (2015) demonstrou mudança na expressão dos miRNAs (miR-29b, miR-31, miR-101a, miR-130a e miR-199a-5p) após o tratamento de fibroblastos embrionários com 2,3,7,8 -tetrachlordibenzo-p-dioxina (“Agente Laranja”) ou com radiação ionizante.

#### **1.4 miRNAs e a Resposta Imune**

Todos os processos biológicos, como a manutenção da homeostasia e desenvolvimento do sistema imune possuem a participação da regulação, inúmeros são os trabalhos que demonstram que miRNAs podem modular vários aspectos da resposta imune tais como diferenciação de células imunitárias e expressão de citocinas, sendo cruciais tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa (BI et al., 2009; LU & LISTON, 2009; ALAM & O’NEILL, 2011).

No sistema imune adaptativo, um pequena falha na biogênese do miRNA em progenitores linfoides, prejudica o desenvolvimento de células T e B. Já foi demonstrado que se a síntese de miRNA for interrompida a partir da deleção condicional da enzima Dicer nos primeiros estágios de maturação de linfócitos T, pode prejudicar esse processo levando então a números reduzidos dessas células no timo e em órgãos periféricos (COBB & SMALE, 2005).

Vários são os miRNAs que podem ser citados e que possuem grande participação nesses eventos, alguns miRNAs, como miR-125b e miR-146a possuem alvos que são importantes componentes da via de sinalização de TLR (Receptores Semelhantes a Toll). O miR-146a age diminuindo os níveis de IRAK1, IRAK2 e TRAF6 que atuam nesses receptores que são chave no reconhecimento e ativação de resposta inflamatória a patógenos (HOU et al., 2009). Citocinas pró-inflamatórias também são controladas por miR-146a agindo diretamente sobre seus mensageiros (interleucina-8 e MCP-2) (PERRY et al., 2008; ROM et al., 2010).

Outro evento importante regulado por miRNAs é a polarização na ativação de macrófagos. Em 2013, Banerjee e colaboradores (BANERJEE et al, 2013) demonstraram o



papel do miRNA let-7c em promover uma polarização do fenótipo de ativação alternativa M2, caracterizado por uma resposta mais voltada ao controle da inflamação, com menor atividade fungicida e maior produção de citocinas anti-inflamatórias, em detrimento do padrão de ativação clássico M1. Outros miRNAs também foram identificados como tendo participação nesse processo de polarização de macrófagos (GRAFF et al., 2012).

Além de participar do controle da função e do desenvolvimento de células do sistema imune que ocasiona a manutenção da homeostase, diferentes estudos foram realizados e apresentaram a participação de miRNAs tanto na regulação da resposta imune como em diferentes patógenos, sendo eles vírus, bactérias e fungos (GŁOBINSKA et al., 2014; MAUDET et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

Por fim, é grande o número de evidências que demonstram a importância da expressão e da função dos miRNAs para o desenvolvimento, função e diferenciação de diversos tipos celulares do sistema imune, sendo de grande relevância destacar que a expressão dos miRNAs deve ser propriamente regulada para a manutenção da homeostase imunológica. A desregulação dessa expressão está presente em diferentes doenças, e pode promover a indução da autoimunidade.

### **1.5 O uso de miRNAs como biomarcadores.**

De acordo com o banco de dados mirBase (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>) até o momento já foram validados 1982 miRNAs humanos e cada um possui a capacidade de regular de 10 ou até mais de 100 transcritos, estimando-se que mais de 30% dos transcritos humanos sejam suscetíveis a essa regulação. Os miRNAs conseguem regular níveis intracelulares de múltiplos componentes de uma única via de sinalização ou regular de forma simultânea vias celulares inter-relacionadas (KOTURBASH et al.; THOMSON et al., 2011). Essa regulação tem efeitos fisiológicos em todos os processos celulares embriogênese, desenvolvimento, proliferação, diferenciação, migração, apoptose, senescência e autofagia (LIU et al., 2012).

A partir dos resultados de diversos estudos constatou-se que os miRNAs podem ter papéis essenciais na tumorigênese e na progressão do câncer, através da regulação dos processos de iniciação, crescimento, metástase e resistência terapêutica (XUE et al., 2014). Além disso, já foi visto que o padrão de expressão de miRNAs está relacionado com o tipo de câncer, a fase que se encontra e outras variáveis clínicas específicas, desta forma um perfil de

expressão pode ser utilizado como uma potencial ferramenta para o diagnóstico e prognóstico de câncer (LEE & DUTTA, 2009).

O papel no prognóstico do câncer começou a ser constatado a partir de um estudo que demonstrou que a diminuição da expressão do miRNA let-7 estava associada a menor sobrevivência de pacientes acometidos pelo câncer de pulmão (TAKAMIZAWA et al., 2004). A atuação dos miRNAs no processo de iniciação e progressão da carcinogênese foi demonstrado pela primeira vez na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), em um estudo que observou a expressão diminuída dos miRNAs: miR-15a e miR-16-1 nos pacientes com LLC, sugerindo que a perda dos miRNAs era um dos eventos iniciadores no processo de carcinogênese (CALIN et al., 2002).

Entre os processos que podem ser regulados por miRNAs está a modulação da resposta imune, onde os mesmos podem agir na diferenciação de células imunitárias e na expressão de citocinas, sendo relevantes tanto para a imunidade inata quanto para a adaptativa (ALAM & O'NEILL, 2011). Um estudo avaliou o papel do miR-223, miR-155 e miR-146a na diferenciação de células mielóides, ficou evidente que o miR-146a tem um papel chave na modulação da resposta imune, pois sua desregulação está presente em doenças autoimunes como: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome de Sjögren (XU et al., 2012).

Outro estudo demonstrou que a expressão de vários miRNAs está alterada em pacientes com Artrite reumatoide quando comparada a um grupo controle. Células mononucleares do sangue periférico dos pacientes apresentavam uma alta expressão do miR-16, miR-132 e miR-146a, correlacionando esse nível de expressão com a doença ativa (PAULEY et al., 2008).

Os miRNAs também atuam na regulação da resposta imune a diferentes tipos de microrganismos, como: vírus, bactérias e fungos (GŁOBINSKA et al.; MAUDET et al., 2014). Alterações no perfil de expressão de miRNAs em pacientes acometidos por quadros infecciosos podem regular e induzir mecanismos de defesa, ou podem fazer parte da estratégia desenvolvida pelo agente infeccioso para diminuir a resposta imune ou escapar do sistema imune do hospedeiro (SKALSKY et al., 2010).

O envolvimento na resposta a agentes bacterianos tem sido cada vez mais comprovado, além disso, já foi constatado que alguns desses agentes são capazes de modular a expressão de miRNA. Estudos demonstraram que após a estimulação de receptores TLR4 de monócitos humanos por Lipopolissacarídeo (LPS) houve a indução da expressão de vários miRNAs, entre

eles: miR-132, miR-146a/b e miR-155, dependentes de NF- $\kappa$ B, sendo assim responsáveis por um dos mecanismos reguladores da produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecção bacteriana (EULALIO et al., 2012).

Os miRNAs exercem papéis intracelulares importantes na célula hospedeira, tendo assim também um importante papel na patogênese viral. Diversos estudos comprovam que miRNAs participam da regulação da infecção viral em células hospedeiras, a partir da repressão gênica sobre genes celulares ou virais. Um exemplo é o estudo realizado por Janssen et al (2013) que demonstrou que a expressão do miR-122 no hepatócito hospedeiro favorece uma replicação eficiente do vírus da Hepatite C, assim como o uso do seu antagonista mostrou ter efeitos antivirais em células humanas infectadas.

## **1.6 Métodos de Detecção de miRNA**

Embora os miRNAs possuam características que os tornaram biomarcadores adequados na prática clínica, como alta estabilidade em tecidos e fluídos ou boa preservação em tecidos parafinados e fixados em formol (TSONGALIS et al, 2013), a detecção de miRNA é desafiadora devido a várias características intrínsecas dessas moléculas como o seu pequeno tamanho, similaridade de sequência entre vários membros, falta de características comuns que poderiam facilitar sua amplificação seletiva, baixo nível e expressão de tecido específico de estágio de desenvolvimento.

Essas características podem dificultar os métodos de detecção desses miRNAs, como por exemplo, o curto comprimento de miRNAs maduros é insuficiente para a amplificação por PCR. Além disso, miRNAs não possuem cauda poly(A) que é muito útil para o enriquecimento seletivo de RNA ou para a transcrição reversa. Apesar destes desafios, várias abordagens são comumente usadas para detecção de miRNA: PCR quantitativa de transcrição reversa (qRT-PCR), métodos baseados em hibridização e sequenciamento de nova geração (de PLANELL-SAGUER & RODICIO, 2013). A seguir serão abordados os principais métodos de detecção de miRNA para a prática clínica.

### **1.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR).**

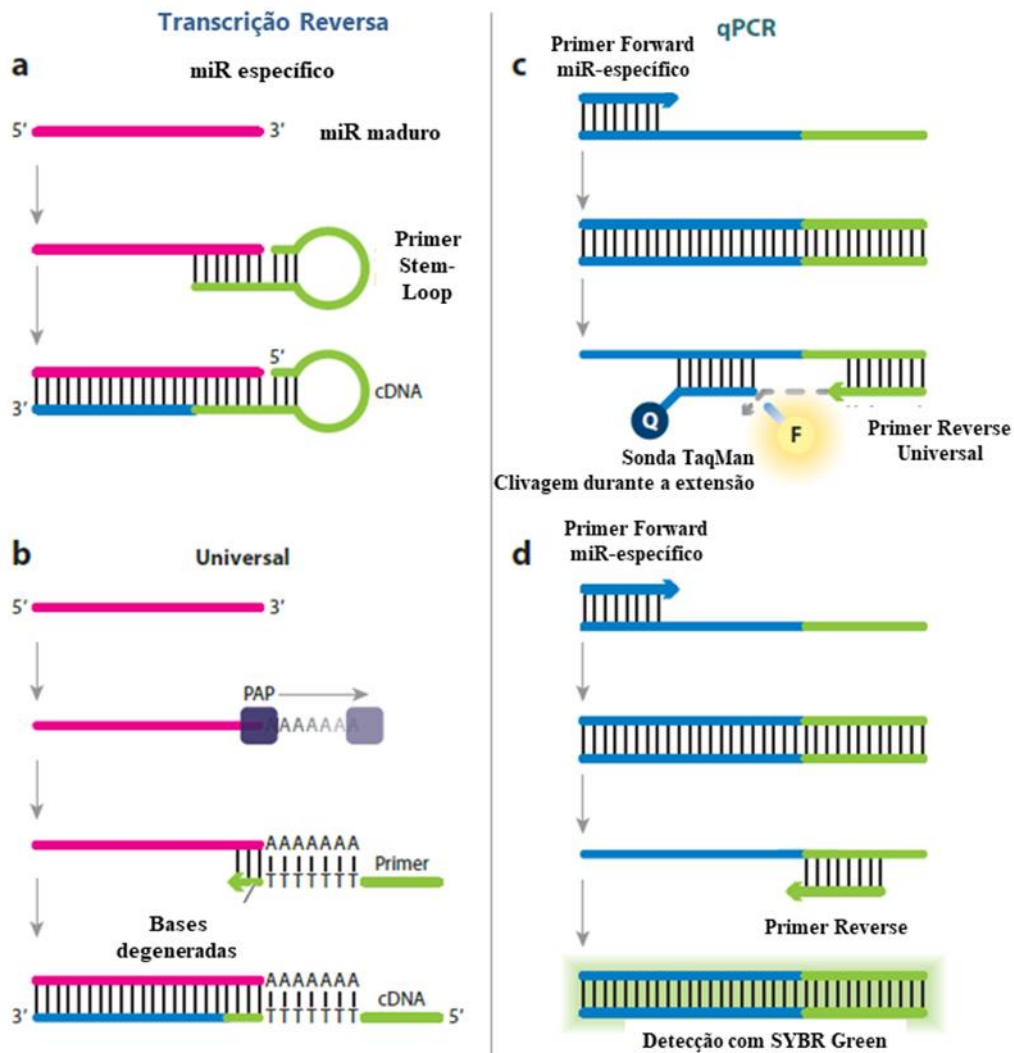
A PCR quantitativa em tempo real de transcrição reversa (RT-qPCR) é o padrão ouro para a quantificação da expressão gênica e um dos métodos mais comuns usados para detectar baixos níveis de miRNAs com alta sensibilidade e especificidade (SCHMITTGEN et al., 2008). A análise de expressão de miRNA pela técnica de qRT-PCR é também amplamente utilizada

para confirmar os resultados obtidos a partir do perfil do genoma do miRNA microarray. O qRT-PCR é um método altamente conveniente e confiável para a análise de expressão gênica diferencial, e é muito sensível e específico ao alvo (MURPHY et al., 2009).

Como os miRNAs são geralmente moléculas muito pouco abundantes, sua detecção pode ser alterada pela contaminação do DNA genômico de amostras de RNA. Por essa razão, a remoção de contaminantes do DNA genômico é obrigatória antes de prosseguir com a etapa de transcrição reversa (RT). O RNA é extremamente lábil comparado ao DNA e, portanto, o isolamento deve ser cuidadosamente realizado para garantir a integridade do próprio RNA e a remoção de nucleases contaminantes, DNA genômico, RT ou outros inibidores da PCR (VALASEK & REPA, 2005).

Sensibilidade, especificidade, rapidez e simplicidade estão entre as vantagens comuns das técnicas baseadas em qRT-PCR usadas no diagnóstico de rotina (MURPHY et al., 2009). O método de perfil de miRNA baseado em PCR tem a capacidade de detectar miRNAs com número de cópias muito baixo (SCHMITTGEN et al., 2004), o que é importante porque grandes quantidades de RNA em amostras clínicas podem ser difíceis de obter. Na prática clínica, a detecção de miRNAs por qRT-PCR oferece a possibilidade de desenvolver testes diagnósticos precoces, acompanhar a progressão da doença, classificação do câncer, rastreamento de genes de RNA responsáveis por doenças e monitoramento da eficácia do tratamento (Meyer et al. 2012).

O primeiro passo na RT-qPCR é converter o RNA extraído da amostra em cDNA por RT. Existem duas abordagens principais tipicamente usadas para fazer isso: (a) usando primers RT específicos de miR e (b) estendendo todos os miRs com uma sequência comum para que a RT possa ser realizada usando um primer universal (Figura 1). Depois que o cDNA é sintetizado, a quantificação da expressão de miRNA pode ser realizada usando TaqMan (Applied Biosystems, Forster City, CA) ou tecnologia de detecção de SYBR Green (HUNT et al., 2015).



**Figura 2-** RT-qPCR: métodos para a síntese de cDNA por transcrição reversa.

Legenda: Transcrição reversa usando primers miR-específico (a) ou universal (b). Dois métodos fluorescentes são usados para monitorar a miR qPCR: A atividade de exonuclease da polimerase TaqMan (c) libera fluoróforo durante a extensão da PCR; SYBR Green (d) corante fluorescente se intercala em dsDNA produzido por amplificação por PCR. Abreviaturas: PAP, polimerase de poliadenilato; PCR, reação em cadeia da polimerase; RT-qPCR, reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcrição reversa. Adaptado de HUNT et al., 2015.

Embora os testes RT-qPCR tenham algumas limitações biológicas e técnicas que dificultaram seu uso em ambientes clínicos, o constante avanço da tecnologia torna esta técnica relativamente fácil de realizar em um laboratório clínico e com dados que são fáceis de analisar, demonstrando que este método é um dos métodos mais sensíveis e convenientes para a detecção de miRNAs.

### 1.6.2 Northern blotting (NB)

Provavelmente, a abordagem mais simples e difundida para avaliar o acúmulo de miRNAs alvo é a eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras de RNA combinadas com a análise de Northern blotting. A vantagem desta técnica é que ela não requer nenhum equipamento sofisticado ou especialidade e permite tanto a quantificação do nível de expressão de miRNA quanto a determinação do tamanho do RNA. Tradicionalmente, sondas oligonucleotídicas de DNA complementares aos miRNAs alvo foram utilizadas em experiências de transferência de Northern para análise de pequenos RNAs. O principal problema na utilização de sondas oligonucleotídicas de DNA é a sua fraca sensibilidade, aparece principalmente quando se investiga miRNAs de baixa abundância (VÁRALLYAY et al., 2008).

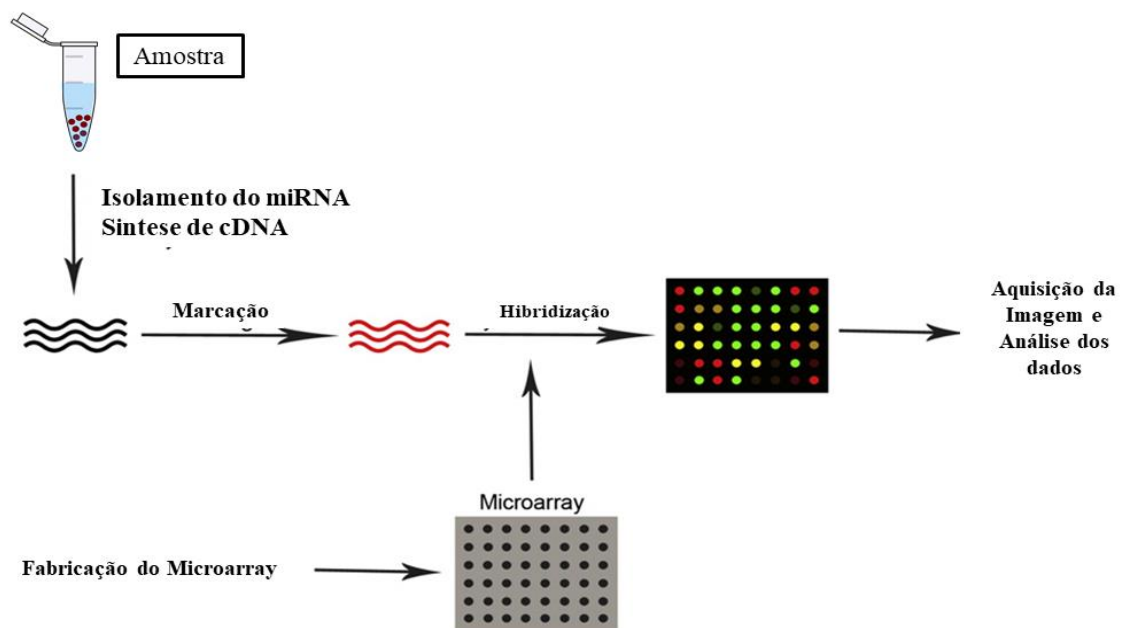
A técnica combina uma separação eletroforética - tipicamente pela desnaturação do gel de ureia-poliacrilamida- seguida por transferência para uma membrana, geralmente uma membrana de nylon carregada positivamente por transferência capilar semiseca. O miR é então hibridizado com sondas marcadas e fotografado. Tradicionalmente sondas de DNA marcadas com <sup>32</sup>P são usadas para visualizar o RNA blotted. NB é a única técnica que permite a visualização quantitativa do miR. O passo de separação de tamanho do NB permite que a técnica seja usada para análise de expressão quantitativa de miR maduro e pri-/pré-miR, bem como para análise da variação de tamanho dos isomiRs da imprecisão da clivagem Drosha e Dicer na biogênese a montante do miR maduro (KOSCIANSKA et al., 2011).

### 1.6.3 Microarray

A análise de microarray (microarranjos) permite uma avaliação paralela de grandes números de miRNAs e pode ser usada para detectar a presença e/ou regulação de uma ampla gama de miRNAs definidos. O passo inicial no perfil do microarray de miRNA é a purificação de RNA ou miRNAs de células ou tecidos. Muitos protocolos foram desenvolvidos para a extração de RNA de alta qualidade usando vários kits e reagentes. Embora seja possível usar o RNA total para análise de microarray, porque RNAs pequenos compõem ~0,01% de todos os RNAs, o enriquecimento de miRNA aumenta a sensibilidade. Depois de extrair o RNA, os miRNAs maduros podem ser diretamente marcados, geralmente usando a RNA ligase de T4, para ligar 1 ou 2 nucleotídeos marcados com fluoróforos à extremidade 3' do miRNA (SHINGARA et al., 2005).

Na detecção de miRNAs por análise de microarray, o design apropriado da sonda é crítico. Em todos os microarrays de expressão gênica, tanto oligonucleotídeos sintéticos quanto fragmentos de cDNA são usados como sondas de captura, que idealmente têm alta especificidade e afinidade para transcritos individuais. Como os miRNAs são pequenos, as possibilidades de desenho da sonda para detectar um miRNA são limitadas e com base na sequência de miRNAs podem variar entre 45 °C e 74 °C em suas temperaturas de fusão (van ROOIJ, 2011).

Os miRNAs isolados são marcados com corante fluorescente e então hibridizados com o microarray de miRNA, resultando na ligação específica dos miRNAs marcados às sondas correspondentes. A emissão de fluorescência de miRNAs marcados ligados em diferentes posições nas lâminas pode ser detectada. Consequentemente, os tipos de miRNAs e suas quantidades relativas na amostra estudada podem ser avaliados pela análise da intensidade do sinal de fluorescência (Figura 2).



**Figura 3-** Diagrama do procedimento de análise do perfil de expressão de miRNA usando análise de microarray.

Legenda: O perfil de miRNA baseado em microarray envolve (1) isolamento de mRNA, síntese de cDNA e marcação de sonda de cDNA; (2) hibridizar sonda marcada com microarray de DNA no chip; (3) chip de varredura de microarray para aquisição de imagens e (4) análise de dados. Adaptado de PLANELL-SAGUER & RODICIO, 2013.

#### 1.6.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Além de usar a tecnologia de microarray, recentemente, as plataformas de sequenciamento de nova geração tornaram-se disponíveis para o sequenciamento de pequenas moléculas de RNA, incluindo miRNAs. O sequenciamento de nova geração usa sequenciamento massivamente paralelo, gerando milhões de pequenas sequências de RNA de uma dada amostra. A sensibilidade desse sequenciamento oferece uma vantagem sobre as técnicas de hibridização padrão (microarray), porque a ampla gama de expressão de miRNA de dezenas de milhares para apenas algumas moléculas por célula complica a detecção de miRNAs expressos em números baixos de cópias. Ao contrário do perfil de miRNAs usando análise de microarray, o NGS mede a abundância absoluta e, por não ser limitado pelo conteúdo da matriz, permite a descoberta de novos miRNAs não demonstrados nas técnicas anteriores (van ROOIJ, 2011).

Os resultados de um estudo recente demonstraram que, assim como o RT-qPCR, o NGS exibe uma ampla faixa dinâmica e não sofre a mesma compressão de dobra que os métodos de microarray (TAM et al., 2014). Também foi demonstrado que a NGS apresenta boa correlação entre amostras rapidamente congeladas e FFPE - parafina fixada em formalina - no perfil de miR global e, portanto, pode ser aplicável para a análise de amostras clínicas. Embora a NGS certamente ainda tenha um longo caminho a percorrer antes de ser tão facilmente adotada quanto as técnicas convencionais, como microarray ou RT-qPCR, ela definitivamente se mostra promissora em ser uma ferramenta poderosa para detecção e descoberta de miRNA (HUNT et al., 2015).

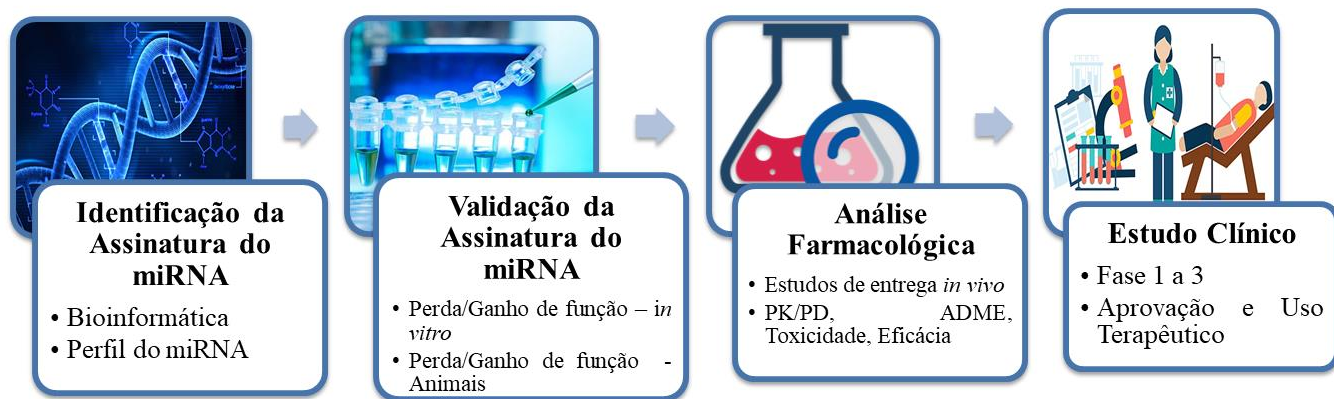
#### **1.7 MiRNA e seu uso terapêutico.**

A expressão de miRNAs está alterada em várias doenças e com o avanço da tecnologia é possível manipular a expressão de miRNA injetando miRNAs similares ao uso de mRNAs antisense e RNAi (técnicas amplamente utilizadas para investigar a função gênica e na terapia gênica) (VIDAL et al., 2005). Como a ativação de oncogenes pode causar câncer, miRNAs antisense artificiais podem ser sintetizados e empregados para bloquear seus alvos em pacientes para prevenir a formação do câncer. No entanto, vários dados críticos de pré-requisitos devem estar disponíveis, por exemplo, identificação de assinatura de miRNAs, seu mecanismo de ação, aplicabilidade por RNAi, entrega de miRNAs e sua forma ativa *in vivo*. Uma vez que esta informação esteja disponível, o miRNA terá um futuro promissor e se tornará uma nova ferramenta terapêutica (Christopher et al., 2016). O processo de construção de terapêutica com



miRNA é semelhante à descoberta e desenvolvimento de fármacos. Os seguintes passos estão envolvidos na descoberta e desenvolvimento de terapias de miRNA:

- Identificação de assinatura de miRNA (feito pelo perfil de miRNA na doença);
- Validação de assinatura de miRNA (estudos de perda/ganho de função *in vitro* e em modelos animais);
- Análise farmacológica (estudos de administração de miRNA *in vivo*, farmacocinética/farmacodinâmica, (estudos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade);
- Ensaios clínicos (estudos sobre a avaliação da eficácia e segurança).



**Figura 4-** Processo de descoberta e desenvolvimento de microRNA.

Legenda: PK/PD: farmacocinética/farmacodinâmica. ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Adaptado de Christopher et al., 2016.

### 1.7.1 Os miRNAs nas Infecções Virais

Diferentes terapias estão sendo desenvolvidas para o auxílio no prognóstico e diagnóstico de doenças infecciosas, dentre os estudos já realizados, um estudo recente relatou níveis aumentados de miR-122 no plasma de pacientes com doença hepática viral, alcoólica e induzida por produtos químicos, e concluiu que o miR-122 é facilmente detectável em amostras de sangue e tem razoável sensibilidade, especificidade e confiabilidade para o diagnóstico de doenças hepáticas virais, alcoólicas e químicas (ZHANG et al., 2010).

O MiR-122 que é o miRNA mais comumente encontrado no fígado de adultos e desempenha um papel fundamental na biologia do fígado, que inclui desenvolvimento,

diferenciação, homeostase e funções. Controla o metabolismo, isto é, a biossíntese do colesterol. O miR - 122 está envolvido na replicação do vírus da hepatite C (HCV). Ele se liga ao genoma viral e aprimora a tradução e a replicação viral. O sítio de ligação na extremidade 5' do genoma do HCV forneceu a evidência do papel direto do miR-122 na replicação do HCV (Christopher et al., 2016). Como o fígado está frequentemente sujeito a agressões, é muito importante encontrar biomarcadores sanguíneos que indiquem danos no fígado.

### 1.7.2 miRNA no Câncer e em Outras Doenças

O termo oncomir foi proposto para miRNAs que são desregulados no câncer (ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006) porque eles se associam com as vias celulares reguladas pelos oncogenes clássicos e supressores de tumor. A expressão de alguns miRNAs é diminuída no câncer e esses miRNAs normalmente inibem os oncogenes, prevenindo o desenvolvimento do tumor, e são considerados supressores tumorais. Expressão de outros miRNAs está aumentada em câncer; esses miRNAs geralmente inibem genes supressores de tumor, promovendo assim o desenvolvimento do tumor e são considerados oncogenes. A primeira análise em larga escala de oncogenes de miRNA humano e supressores de tumor foi relatada recentemente (ZHANG et al., 2010) e ajudará na identificação de biomarcadores para o câncer, bem como na compreensão do papel que esses miRNAs desempenham no câncer.

Em doenças como o câncer, os níveis de expressão de miRNAs subregulados ou miRNA alterado podem ser feitos usando vetor, superexpressando o miRNA alvo ou pela transfecção de miRNAs de cadeia dupla. Portanto, estudos foram conduzidos com a introdução de miRNA artificial de cadeia dupla (mimetizador de miRNA *downstream*). Por exemplo, a superexpressão de miR-26a no carcinoma hepatocelular (HCC) no fígado de camundongo resultou em inibição da proliferação do câncer e no início da apoptose. Posteriormente, em outro estudo, o nível de miR-34a diminuído foi aumentado pela entrega de miR-34a artificial com lipossoma NOV340 em um modelo ortotópico de HCC (BADER, 2012). Isso resultou em redução significativa do tumor, sobrevida prolongada e proteção da doença em animais.

Juntamente com o câncer, as doenças cardiovasculares são o tipo mais prevalente de doenças nos países industrializados. Foi descoberto que os miRNAs são moduladores críticos do desenvolvimento normal do coração e da função cardíaca. Numerosos estudos sugerem que miRNAs estão envolvidos em quase todos os processos patológicos do sistema cardiovascular, incluindo infarto do miocárdio, arritmia, cardiomiopatia e aterosclerose vascular (Kantha & Subramanian, 2010). Curiosamente, uma análise abrangente dos níveis de expressão de miRNA e mRNA em amostras de miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca em estágio final

mostrou que os miRNAs são marcadores mais sensíveis do que mRNAs do estado funcional da insuficiência cardíaca terminal, que se acredita ser consistente com o importante funções dos miRNAs regulados na resposta do miocárdio ao estresse (de Planell-Saguer & Rodicio, 2011). Perfis de miRNAs diferenciais foram relatados para doenças como insuficiência cardíaca, cardiomiopatia isquêmica, cardiomiopatia dilatada e estenose aórtica (Van Rooij et al., 2006; Thum et al., 2007).

Os miRNAs são expressos no músculo liso e esquelético, bem como no músculo cardíaco, e a expressão de miRNA desregulado tem sido correlacionada com distúrbios relacionados ao músculo. Os distúrbios primários do músculo esquelético incluem distrofia muscular e miopatia. Um perfil de expressão miRNA abrangente em tecidos musculares de dez desordens musculares mostrou que 185 miRNAs estavam desregulados, e destes, cinco miRNAs foram encontrados em quase todas as amostras analisadas, indicando o possível envolvimento de um mecanismo regulador comum. Um subgrupo de 18 miRNAs que corretamente predizem e distinguem as várias doenças do tecido muscular normal foi identificado, com precisão >90% para a maioria das doenças (Eisenberg et al., 2007).

Diante das características que os miRNAs apresentam, o avanço da tecnologia e o constante estudo vários miRNAs estão sendo descobertos e caracterizados como alvos terapêuticos ou auxiliam no prognóstico e diagnósticos de diferentes doenças. A montagem de painéis de miRNAs que possam auxiliar o diagnóstico, prognóstico e até mesmo a progressão dessas doenças, como câncer, doenças cardíacas e doenças infecciosas possui um importante papel para a terapêutica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar, por meio de revisão sistemática da literatura e de bancos de dados, miRNAs associados a doenças infecciosas que possam ser usados como biomarcadores diagnósticos e prognóstico/preditivos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Identificar o padrão de expressão dos miRNAs no sangue (plasma soro e sangue total) e secreções (saliva);
- ✓ Consolidar e propor possíveis painéis de miRNA para auxiliar nos diagnósticos e prognósticos de doenças infecciosas

### 3. METODOLOGIA

A busca no banco de dados mirBase revelou que até o momento (05/04/2018) 1982 miRNA precursores são descritos em humanos (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>), no entanto muitos ainda precisam ter sua funcionalidade bem determinada. Neste contexto outro banco de dados, o miRDB, definiu uma lista de 568 miRNAs chamados funcionais através de estratégias de busca sistemática na literatura combinada com análise computacional. Assim, o presente estudo usou como ponto de partida estes 568 miRNAs funcionais e buscou associações com doenças infecciosas destes por meio de uma revisão extensa e sistemática dos artigos listados no próprio miRDB que estão indexados no PubMed.

A soma dos números de artigos para cada miRNA foi de 19.987 publicações, no entanto vários estavam repetidos, ou seja, abordavam vários miRNAs ao mesmo tempo. Mesmo assim a quantidade de artigos foi de poucos milhares. Destes apenas as publicações que referiam associação de miRNAs funcionais com doenças infecciosas foram consideradas para citação no presente trabalho, perfazendo um total de 63 publicações. Estas publicações mostraram relações com várias doenças infecciosas, dentre elas estão às hepatites virais B e C, HIV, HTLV, Influenzae, Dengue, HPV, Ebola, Herpes, Adenovírus, Enterovirus, Epstein bar vírus, e também infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias.

A expressão dos miRNAs associados com doenças infecciosas em tecidos sanguíneos (sangue, plasma e soro) e saliva, de indivíduos normais, foi investigada usando-se o miRmine (Human miRNA Expression Database; <http://guanlab.ccmb.med.umich.edu/mirmine/>). A escolha destes foi baseada no fato de eles serem facilmente coletados, com pouco ou nenhum procedimento invasivo, sendo esta uma importante característica de um bom biomarcador.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado final foi um total de 63 artigos escolhidos a partir da relação do miRNA com as doenças infecciosas, título, resumo completo e posteriormente a leitura completa dos mesmos conforme explanado na metodologia do presente estudo. Os artigos foram selecionados visando analisar o papel de miRNAs nos contextos de: progressão e manutenção da infecção, diagnóstico, prognóstico e possíveis terapias. A discussão se baseou em demonstrar por quais mecanismos os miRNAs estão envolvidos nesses quadros, buscando ressaltar a relevância das pesquisas que procuram compreender seus papéis nos diferentes quadros infecciosos.

Do total de artigos, 45 artigos versaram sobre a relação de miRNAs com as infecções virais, contendo entre estas hepatites virais (B e C), HIV, HTLV, Influenzae, Dengue, HPV, Ebola, Herpes, Adenovírus, Enterovírus e Epstein bar vírus. Foram encontrados 18 artigos relacionados à infecções bacterianas com os agentes etiológicos *Micobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Pseudomonas aeruginosa*. Quanto às infecções parasitárias foram encontrados 2 artigos relacionados ao *Schistosoma japonicum*, e encontrou-se também 2 estudos relacionados a *Cryptosporidium parvum* (TABELA 1).

### 4.1 Infecção por Vírus

#### 4.1.1 Infecção pelo Vírus da Hepatite B (Hbv)

Takata et al. (2016) demonstraram com os resultados do estudo que a expressão da proteína alvo let7 foi aumentada em tecidos de carcinoma hepatocelular humano oriundos de pacientes infectados com Vírus da Hepatite B (HBV). No qual, o miRNA let-7g inibiu a expressão da proteína pré-S de HBV e seus produtos virais. Sugerindo então, que a interação entre os transcritos intermediários virais, resultantes da replicação de HBV, e os miRNAs do hospedeiro é crucial para a patogênese da infecção viral crônica, indicando que a suplementação de let-7g em hepatócitos já infectados pelo HBV pode ser benéfica tanto para a prevenção da tumorigênese quanto para a inibição da produção do capsídeo viral.

No genoma do HBV, o gene S e as regiões pré-S1 e pré-S2 são responsáveis pela síntese de três proteínas do envelope. A maior delas é codificada pelo gene S em conjunto com as duas regiões. A tradução do gene S e da região pré-S 2 dá origem a uma proteína de tamanho intermediário (CARMAN et al. 1989). A inibição das proteínas pré-S através do miRNA let-7g leva a não formação do capsídeo viral e consequente inviabilidade do HBV. A atuação da família let-7, promove a supressão de importantes oncogenes, como o LIN28B (KUMAR et al. 2007). No entanto, regiões pré-S podem isolar o miRNA let-7g e prejudicar a sua função

intrínseca de supressor tumoral, esse feedback pode estar envolvido na promoção da tumorigênese hepática, na qual o LIN28B é frequentemente expresso e acaba por bloquear a maturação de todos os membros da família let-7 (VISWANATHAN et al. 2009).

**Tabela 1-** Distribuição dos miRNAs por infecção e por agente infeccioso, localização cromossômica, número de artigos e local de expressão.

(continua)

| <b>INFECÇÕES VIRAIS</b>  |                          |                                     |          |                       |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----------|-----------------------|
| <b>Agente Infeccioso</b> | <b>miRNA</b>             | <b>Localização</b>                  | <b>N</b> | <b>Expressão</b>      |
| HBV                      | Let-7g                   | <u>chr3:52268278-52268361 (-)</u>   | 13       | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-106 <sup>a</sup>     | <u>chrX:134170198-134170278 (-)</u> |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-122                  | <u>chr18:58451074-58451158 (+)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-125 <sup>a</sup> -5p | <u>chr19:51693254-51693339 (+)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-141                  | <u>chr12:6964097-6964191 (+)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-15 <sup>a</sup>      |                                     |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-16-1                 | <u>chr13:50048973-50049061 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-22                   | <u>chr17:1713903-1713987 (-)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-210                  | <u>chr11:568089-568198 (-)</u>      |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-192                  | <u>chr11:64891137-64891246 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
| HCV                      | Let-7g                   | <u>chr3:52268278-52268361 (-)</u>   | 14       | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-122                  | <u>chr18:58451074-58451158 (+)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-942                  | <u>chr1:117094643-117094728 (+)</u> |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-885                  | <u>chr3:10394489-10394562 (-)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-27 <sup>a</sup>      | <u>chr19:13836440-13836517 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-222                  | <u>chrX:45747015-45747124 (-)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-192                  | <u>chr11:64891137-64891246 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-221                  | <u>chrX:45746157-45746266 (-)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
| HIV                      | miR-106b                 | <u>chr7:100093993-100094074 (-)</u> | 6        | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-20 <sup>a</sup>      | <u>chr13:91351065-91351135 (+)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-132                  | <u>chr17:2049908-2050008 (-)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-196b                 | <u>chr7:27169480-27169563 (-)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-1290                 |                                     |          | plasma, saliva e soro |
|                          | miR-124-2                | <u>chr8:64379149-64379257 (+)</u>   |          | Somente em tecidos    |

**Tabela 1-** Distribuição dos miRNAs por infecção e por agente infeccioso, localização cromossômica, número de artigos e local de expressão.

(continuação)

| <b>INFECÇÕES VIRAIS</b>      |                     |                                      |          |                       |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------------|----------|-----------------------|
| <b>Agente Infeccioso</b>     | <b>miRNA</b>        | <b>Localização</b>                   | <b>N</b> | <b>Expressão</b>      |
| INFLUENZAE                   | Let-7c              | <u>chr21:16539828-16539911 (+)</u>   | 3        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-136             | <u>chr14:100884702-100884783 (+)</u> |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-33a             | <u>chr22:41900944-41901012 (+)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
| EBOLA                        | miR-1246            | <u>chr2:176600980-176601052 (-)</u>  | 3        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-320a            |                                      |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-196b-5p         |                                      |          | plasma, saliva e soro |
| ENTEROVÍRUS                  | mir-197             | <u>chr1:109598893-109598967 (+)</u>  | 2        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-30a             | <u>chr6:71403551-71403621 (-)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
| HTLV                         | miR-93              | <u>chr7:100093768-100093847 (-)</u>  | 2        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-130b            | <u>chr22:21653304-21653385 (+)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
| DENGUE                       | Let-7c              | <u>chr21:16539828-16539911 (+)</u>   | 1        | plasma, saliva e soro |
| ADENOVÍRUS                   | miR-27a             | <u>chr19:13836440-13836517 (-)</u>   | 1        | plasma, saliva e soro |
| <b>INFECÇÕES BACTERIANAS</b> |                     |                                      |          |                       |
| <b>Agente Infeccioso</b>     | <b>miRNA</b>        | <b>Localização</b>                   | <b>N</b> | <b>Expressão</b>      |
| M. TUBERCULOSIS              | miR-132             | <u>chr17:2049908-2050008 (-)</u>     | 8        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-26 <sup>a</sup> |                                      |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-144             | <u>chr17:28861533-28861618 (-)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-206             | <u>chr6:52144349-52144434 (+)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-20b             | <u>chrX:134169809-134169877 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-32-5p           | <u>chr9:109046229-109046298 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-769-5p          | <u>chr19:46018932-46019049 (+)</u>   |          | plasma, saliva e soro |
| H. PYLORI                    | let-7b              | <u>chr22:46113686-46113768 (+)</u>   | 6        | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-375             |                                      |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-106b            | <u>chr7:100093993-100094074 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-222             | <u>chrX:45747015-45747124 (-)</u>    |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-30b             | <u>chr8:134800520-134800607 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |
|                              | miR-30d             | <u>chr8:134804876-134804945 (-)</u>  |          | plasma, saliva e soro |



**Tabela 1-** Distribuição dos miRNAs por infecção e por agente infeccioso, localização cromossômica, número de artigos e local de expressão.

(conclusão)

| <b>INFECÇÃO POR PROTOZOÁRIOS</b> |              |                                    |          |                       |
|----------------------------------|--------------|------------------------------------|----------|-----------------------|
| <b>Agente Infeccioso</b>         | <b>miRNA</b> | <b>Localização</b>                 | <b>N</b> | <b>Expressão</b>      |
| C. PARVUM                        | let-7i       | <u>chr12:62603686-62603769 (+)</u> | 2        | plasma, saliva e soro |
| <b>INFECÇÃO POR PARASITAS</b>    |              |                                    |          |                       |
| <b>Agente Infeccioso</b>         | <b>miRNA</b> | <b>Localização</b>                 | <b>N</b> | <b>Expressão</b>      |
| S. JAPONICUM                     | miR-223      | <u>chrX:66018870-66018979 (+)</u>  | 2        | plasma, saliva e soro |

Fonte: Autora.

Os miRNAs desempenham um papel importante na infecção pelo HBV e as alterações nos padrões de expressão de miRNAs são importantes indicadores de doenças relacionadas ao VHB. Alguns miRNAs podem ser expressos em células mononucleares de sangue periférico (PBMC miARNs) e também são sugeridos como potenciais biomarcadores. Desta maneira, HONG et al. buscaram determinar a expressão do miR106 em pacientes com hepatite B crônica (CHB), e observarem que este miRNA é downregulated em pacientes com CHB, quando comparados com o controle saudável, diferentemente de outras doenças, como o câncer, em que o miR-106a é upregulated e funciona como um oncogene (IVANOVSKA et al. 2008; LI et al. 2014).

Além disso, a análise clínica demonstrou que o miRNA está correlacionado negativamente com Alanina Amino Transferase (ALT) sérica em pacientes com CHB. A ALT é uma importante enzima encontrada no fígado, que pode ser considerada um marcador específico de dano hepático, desta maneira a expressão anormal de miR-106a em PBMCs pode ter um papel importante no dano da função hepática durante a infecção crônica pelo VHB.

Alguns estudos demonstraram que o miR-122 é específico do fígado, e representa 70% do total de miRNAs hepáticos. Este miRNA desempenha um importante papel na homeostase do fígado e na hepatocarcinogênese (KUTAY et al. 2006). O miR-122 circulante foi recentemente explorado como um biomarcador potencial para várias doenças hepáticas, como hepatite crônica e HCC (COULOUARN et al. 2009; BIHRER et al. 2011). Wójcik et al. (2016) avaliaram 34 pacientes com infecção por HBV e demonstraram que a expressão hepática do miR-122 não parece corresponder com a progressão da doença do fígado.

Em contrapartida, Nakamura et al. (2017) mostraram que o Soro da proteína aglutinina-positiva Mac-2-binding da *Wisteria floribunda* [WFA(+) - M2BP], um marcador de fibrose recentemente reconhecido que foi desenvolvido no Japão, juntamente com miR-122 em baixo nível no soro podem ser um preditor útil de fibrose hepática avançada em pacientes infectados pelo VHB, resultando então em uma avaliação mais precisa da fibrose hepática na infecção pelo vírus.

O miR-122 também está envolvido na imunidade inata antiviral e na sinalização de vias celulares, desta maneira Gao e colaboradores (2015) procuraram identificar a relação entre o miR-122 e a expressão de *SOCS3* (gene que codifica uma proteína supressora da sinalização de citocinas) em pacientes com CHB, pois uma expressão elevada deste gene desencadeia uma resposta imune ineficaz, potencialmente resultando em persistência viral. O resultado do estudo ilustrou que o *SOCS3* foi significativamente reduzido pelo miR-122 nas amostras analisadas.

Outro dado relatado foi que a redução da regulação do *SOCS3* induzida pelo miR-122 contribui para a inibição mediada pelo IFN (Interferon) do VHB, demonstrando que o hospedeiro pode usar miRNAs celulares para combater infecções virais, modulando os níveis de IFN. Desta maneira, os autores puderam fornecer uma estratégia terapêutica potencial para aumentar a eficácia anti-VHB do IFN, aumentando os níveis de miR-122 na infecção viral crônica e hepatocarcinogênese.

Quanto ao papel de marcador prognóstico do miR-122 relacionado ao HBV, Cho et al. (2015) constataram que um alto nível de miR-122 circulante é um fator de prognóstico pobre independente que pode prever a sobrevida global em pacientes com HCC relacionado ao VHB que foram submetidos a ablação por radiofrequência. Estes resultados podem ser explicados pelos níveis circulantes de miR-122 que se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de albumina, o que refletiu a função sintética do fígado.

A este respeito, os pacientes com níveis elevados de circulação de miR-122 podem ter uma diminuição da função hepática, o que poderia explicar por que um alto nível de circulação de miR-122 era um fator prognóstico fraco para prever a sobrevida global. Desta forma, o nível no plasma de miR-122 pode ser um marcador mais sensível do que os parâmetros laboratoriais de rotina para detectar e monitorar o status da função hepática em pacientes com HCC que recebem ablação por radiofrequência.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que o hsa-miR-125a-5p, um microRNA expresso no fígado humano, é capaz de direcionar uma sequência viral dentro do “overlapping”

da polimerase e nas regiões de codificação de antígenos de superfície, sendo confirmado posteriormente o efeito do hsa-miR-125a-5p na expressão do gene HBV (POTENZA et al. 2011; PARK et al. 2012). Desta maneira, Coppola et al. (2013) investigou a expressão hepática de hsa-miR-125a-5p e sua possível correlação com o HBV DNA hepático, demonstrando com os resultados do estudo que o mecanismo de indução do HBV hepático do hsa-miR-125a-5p hepático, suas medições no plasma ou em células no sangue periférico para uma possível definição de novos marcadores não-invasivos de doenças hepáticas associadas ao HBV e possível desenvolvimento de novas estratégias anti-HBV baseadas na sobre indução da hsa-miR-125a-5p hepática.

Alguns miRNAs, como o miR-141, inibem vários tipos de infecção por vírus, como o HBV, e que pode estar relacionado na modulação de diferentes processos como a autofagia de hepatócitos (KIM et al. 2015). Alguns estudos demonstraram que a Sirt1, a sirtuína mais estudada, desempenha um papel importante na regulação da autofagia por desacetilação de proteínas relacionadas a este processo (Ou et al. 2014). Sendo assim, Yang e colaboradores (2017) avaliaram o potencial papel do miR-141 na modulação da autofagia e ilustraram que a superexpressão do miR-141 inibiu a autofagia, facilitando assim a inibição do HBV e que o Sirt1 foi identificado como um novo alvo do miR-141 na inibição do HBV, fornecendo uma nova luz sobre o desenvolvimento da estratégia terapêutica contra o VHB.

Durante a fase inicial da infecção pelo VHB, o miR-15a/miR-16-1 atua como antagonista da infecção pelo VHB, o que pode fazer com que o vírus entre no estado crônico nas células infectadas e que algumas células possam até eliminar o vírus como resultado da inibição da replicação viral mediada por microRNA (Ameres et al. 2010). Em 2013, Wang et al. ilustraram em seu estudo que o miR-15a /miR-16-1 é capaz de direcionar diretamente os transcritos do VHB, particularmente aquele que codifica a proteína HBx, proteína responsável por coordenar o balanço entre proliferação celular e morte celular programada, o que é determinante no desenvolvimento do HCC, principalmente em pacientes com infecção crônica por HBV, e que também é responsável pela reprogramação da expressão de múltiplos microRNAs, incluindo miR-15a/miR-16-1.

Com os resultados do estudo, os autores descobriram, inesperadamente, que uma unidade de expressão de HBx com frameshift que não produzia proteína mas expressava uma quantidade equivalente de RNA poderia também mediar a regulação negativa de miR-15a/miR-16-1 através de uma sequência de alvo do miRNA no RNA viral. Essas descobertas fornecem

um paradigma biológico e sugerem uma estratégia molecular emergente para interações patógeno-hospedeiro mediadas por RNA viral.

Shi e Xu (2013) comprovaram em experimentos *in vitro* que linhagens transformadas por HBV tinham sua proliferação inibida quando expostas a uma superexpressão de miR-22, enquanto que linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (CHC) apresentavam uma baixa expressão desse miRNA. O miR-22 atua suprimindo a expressão de CDKN1A (inibidor da cinase dependente de ciclina 1A), uma proteína importante para a manutenção do ciclo celular, e consequentemente inibindo a proliferação celular. A partir de seu papel é possível concluir que o miR-22 pode agir como um miRNA supressor tumoral no desenvolvimento e progressão do CHC relacionado a infecção por HBV.

Yu et al (2015) atestou que pacientes com infecção crônica por HBV apresentavam altos níveis séricos de miR-210. Esse miRNA atua regulando negativamente a replicação do vírus, tendo como alvo a região pré-S1, sob condições normais, porém no contexto da infecção crônica acredita-se que hepatócitos lesionados liberam miR-210 durante a progressão da doença. O alto nível sérico de miR-210 está associado à progressão e à gravidade da hepatite, demonstrado que o mesmo tem um grande potencial para ser utilizado como biomarcador para infecção crônica por HBV.

Um estudo realizado em modelos celulares demonstrou que a inibição de REN - Reparo por Excisão de Nucleotídeos é um dos sistemas de reparo de DNA mais versáteis para eliminação de bases defeituosas que são produtos de irradiação ultravioleta, carcinógenos ambientais e alguns radicais livres endógenos – essa inibição era resultado da regulação de miR-192 que tem como alvo *ERCC3* e *ERCC4* (genes REN). Oferecendo então, uma nova perspectiva na compreensão das funções pleiotrópicas do HBV e sua contribuição para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (XIE et al. 2011).

#### 4.1.2 Infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV)

O miRNA Let-7g mostrou ser regulado pelos homólogos de Lin28 (Lin28A e Lin28B) de mamíferos, que é uma proteína de ligação ao RNA como um regulador chave da biogênese let-7g. Partindo destes princípios Chou et al (2016) demonstraram que o tratamento para hepatite C crônica que utiliza a combinação de Interferon  $\alpha$  e Rivabirina (RBV) induziu a expressão de let-7g através da sinalização p38/AP-1. A expressão de let-7g foi dependente da via do interferon e da regulação do let-7g por IFN/RBV ocorre através da sinalização p38/AP-1. A superexpressão de let-7g ou knockdown do Lin28 pode reduzir os níveis do RNA de VHC

e a infecciosidade do VHC, e o Lin28 knockdown pode inibir a replicação do VHC. Desta maneira, a super expressão de let-7g reduziu o gene ou a proteína do núcleo do Vírus da Hepatite C (HVC) inibindo a carga viral secretada na infecção por HCV. Os resultados destacaram o importante papel de let-7g como um novo biomarcador e preditor para a terapia anti-HCV.

Vários estudos demonstram a relação do miR-122 com a progressão da infecção pelo HCV, pois o genoma do HCV possui sequências alvo de miR-122 e regiões de ligação deste miRNA para que o genoma de HCV possa regular positivamente a replicação viral (Chang et al. 2008; Jopling et al. 2005). Em um estudo realizado na Alemanha, por Fehr et al. (2012) foi demonstrado que a atuação do miRNA-122 no processo de replicação do HCV atua em diferentes fases do ciclo celular do hepatócito, indicando que na fase inicial da infecção, a tradução eficiente do HCV parece ser otimizada para as condições da fase G0/G1 regulares em hepatócitos não divididos no fígado.

Um estudo de 2013 (LI et al.) avaliou a infecção pelo HCV em modelos celulares e foi possível observar que os níveis de miR-122 nesses modelos infectados com HCV foram significativamente mais baixos na fase tardia da infecção, e que a proteína nuclear do HCV poderia regular negativamente o nível de expressão do miRNA, e acabou por reduzir a susceptibilidade do modelo celular ao HCV. Desta maneira, a regulação negativa da expressão do miR-122 pela proteína do núcleo do HCV pode fornecer uma nova visão sobre a interação entre o HCV e o miR-122 e a infecção crônica pelo HCV.

Em um estudo de Gholami et al. (2015) o nível sérico de miRNA-122 foi correlacionado com a liberação sérica de ALT em pacientes com Hepatite C Crônica (HCC), podendo ser avaliado como um biomarcador de prognóstico para esta infecção, resultados estes que não foram observados no estudo de Whang et al. (2015) na China, onde a quantificação absoluta de miRNA-122 sérico mostrou que os níveis séricos de miRNA-122 foram significativamente maiores em pacientes com hepatite aguda e HCC do que em doadores saudáveis. No entanto, não houve correlação significativa entre os níveis séricos de miRNA-122 e níveis de ALT ou graus de inflamação hepática em pacientes com HCC.

Motavaf e colaboradores (2014) avaliaram um agente terapêutico (Miravirsen) desenvolvido para o tratamento de infecções pelo HCV, que se encontra na Fase II de estudo clínico, cujo alvo é o miR-122 e demonstraram que o miRNA em questão é necessário para o processo de replicação de todos os genótipos de HCV, e que esta terapia promove uma longa

supressão da viremia, além de não indicar uma resistência viral e ser bem tolerada pelos pacientes que possuem HCC.

Um recente estudo de Ono et al. (2017) demonstrou que células do HCV se replicam em uma baixa frequência em células que são miR-122 mutante e sugeriram que RNA-HCV é capaz de se propagar de maneira independente do miR-122, os resultados do estudo demonstraram que o tratamento de pacientes com hepatite C com um inibidor de miR-122 seria eficaz para eliminar o HCV no fígado, mas não em tecidos não hepáticos, e pode induzir o surgimento de variantes adaptativas capazes de se propagar em células com miR-122 deficiente, levando à indução de manifestações extra-hepáticas.

Yang et al (2014) demonstrou em seu estudo que o miR-942 medeia a apoptose induzida pelo vírus da hepatite C através da regulação do ISG12a (*Interferon Stimulated Gene 12a*). O miR-942 regula negativamente a expressão de ISG12a, e a infecção pelo HCV diminuiu a expressão desse miRNA nas células, consequentemente aumentando os níveis de ISG12a. Por outro lado, a transfecção desse miRNA para as células, diminuiu a expressão de seu alvo e suprimiu a apoptose desencadeada pela infecção. Demonstrando que a regulação da apoptose por meio da expressão de miR-942 é um mecanismo utilizado pelos hepatócitos humanos para responder à infecção viral.

El-Diwany et al (2015) atestou que a infecção por HCV induz a liberação extracelular de miR-885, apesar dos níveis intracelulares não estarem alterados. Esses altos níveis séricos também são vistos em casos de carcinoma hepatocelular, cirrose e hepatite B crônica. Essa elevação do miR-885 observada no estudo corrobora com estudos anteriores e está relacionada à resposta aguda ao estresse hepático. Os resultados mostraram que a infecção aguda pode induzir mudanças nos níveis plasmáticos de miRNAs específicos que podem afetar a resposta do hospedeiro à infecção pelo HCV.

O estudo de Shirasaki et al (2013) mostrou que a expressão do miR-27a foi regulada positivamente pela infecção pelo vírus da Hepatite C. O miR-27a atua reprimindo a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, bem como genes que são essenciais para a produção de partículas virais infecciosas, ou seja, consegue reprimir o armazenamento de lipídios nas células e a infecção. Porém, esse mecanismo de feedback pode contribuir para a manutenção de uma carga viral baixa, permitindo que o vírus escape da vigilância imunológica e estabeleça uma infecção crônica persistente, tornando o papel do miRNA benéfico para a infecção.

Motawi et al (2016) constatou que o miR-222, estava presente em elevado nível sérico em pacientes egípcios com infecção por HCV, entretanto em pacientes com Câncer de Fígado não houve essa elevação. Esse miRNA é órgão-específico e tem papel essencial no processo inflamatório. Os achados indicam que o miR-222 tem um forte potencial como biomarcador para auxiliar no diagnóstico da infecção por HCV e na lesão hepática, mas não deve ser utilizado para diagnóstico de câncer de fígado.

O miR-192, é conhecido por ser regulado positivamente pelo HCV (Ishida et al., 2011). A função mais amplamente conhecida do miR-192 é autorregular o TGF- $\beta$ 1 no rim (Chung et al.2010; Kato et al., 2013) e regulando negativamente os transcritos alvo incluindo vários genes associados ao ciclo celular em câncer de cólon ou mieloma (Pichiorri et al., 2010). Kim et al. (2016) avaliaram em seu estudo a relação entre o miR-192 e a infecção por HCV e ilustraram que a regulação de feedback auto positivo do miR-192 com o TGF- $\beta$ 1, é provavelmente através da ativação do fator de transcrição ETS1 ou SMAD3 indicando que uma série de processos pode ser capaz de amplificar os efeitos do miR-192 na expressão de TGF- $\beta$ 1, levando eventualmente à fibrose hepática.

É de importância destacar que a inibição do miR-192 usando anti-miR-192 pode resgatar o nível reduzido de expressão de ZEB1 em células infectadas pelo HCV, diminuindo assim a expressão de TGF- $\beta$ 1 induzida pela infecção pelo HCV. Este resultado sugere fortemente que o miR-192 pode ser um marcador de diagnóstico para a fibrose induzida pelo HCV e/ou um novo alvo para atenuar a patogênese viral. Ainda relacionado ao miR-192, Motawi et al. (2015) sugeriu um potencial painel de miRNAs, que inclui o miR-192, e que pode ter valor clínico no diagnóstico de CHC relacionado ao HCV.

No estudo de Ding et al (2016) foi constatado que o miR-221 está altamente regulado no soro de pacientes com infecção crônica por HCV, e encontra-se correlacionado positivamente com outros biomarcadores como: miR-122 sérico, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST). Esses biomarcadores retratam o quadro de dano celular hepático. A infecção por HCV pode regular a expressão do miR-221 através da indução ou inibição da expressão de NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), fator importante para o processo de transcrição de variados produtos gênicos. A avaliação desse miRNA no soro dos pacientes pode ajudar a auxiliar no diagnóstico de uma lesão hepática e de uma infecção por HCV.

#### 4.1.3 Infecção por Influenzae

Ma et al (2012) mostrou em seu estudo que o let-7c tem a capacidade de suprimir a replicação do vírus influenza A nas células hospedeiras, através da regulação da expressão da proteína M1. M1 é a proteína mais abundante na partícula viral, responsável por múltiplas funções de regulação na matriz do vírus, sua expressão é regulada pela ligação do let-7c na região 3'-UTR do seu mRNA. Após essa ligação sua expressão é suprimida e a capacidade de replicação do vírus se torna deficiente. Os achados sugerem que vinculação do miRNA a região 3'-UTR da proteína M1 pode servir como alvo terapêutico para a profilaxia e controle de infecções do vírus influenza.

No estudo de Zao et al (2015) demonstrou-se que o miRNA-136 teve uma ação antiviral *in vitro* contra o vírus da gripe A H5N1, inibindo sua replicação através de um processo de silenciamento gênico pós-transcricional. Além disso, possui um papel importante na ativação e regulação da resposta imune antiviral do hospedeiro, a partir da sinalização por RIG-I (*agonist of retinoic acid-inducible gene 1*), demonstrando a importância do miRNA na resposta a infecção viral.

Hu et al (2016) evidenciou que o miR-33a pode impedir a replicação do vírus influenza A, através do silenciamento realizado por esse miRNA que tem como alvo a região 3'UTR de ARCN1 (*archain vesicle transport protein 1*), reduzindo o nível de expressão dessa proteína e consequentemente prejudicando a internalização do vírus. Além disso, foi visto que o miR-33a também pode diminuir a atividade da ribonucleoproteína viral, independente de ARCN1. Essas duas ações mostram que o miRNA estudado é um fator inibitório à infecção do vírus influenza A.

#### 4.1.4 Infecção pelo vírus da Dengue

Escalera et al (2015) constatou que o let-7c regula a infecção viral da Dengue e a expressão do fator de transcrição BACH1, correlacionado com a regulação positiva da proteína HO-1 (*heme oxygenase 1*), envolvida na resposta do estresse oxidativo. O efeito antiviral do miRNA contra a infecção em células hospedeiras se dar através da modulação de fatores hospedeiros, como BACH1 e HO-1. A alta expressão de let-7c inibi a expressão de BACH1 e estimula a expressão de HO1. Os achados sugerem que a ativação desta via é necessária para a resposta e constitui um mecanismo de defesa antiviral para a célula.



#### 4.1.5 Infecção por Enterovírus

No estudo realizado por Tang et al (2016) atestou-se que a infecção por Enterovírus 71 (EV71) induziu uma baixa regulação da expressão de miR-197 e aumentou a expressão da proteína RAN, responsável por auxiliar no transporte nuclear das proteínas virais essenciais 3D/3CD e da ribonucleoproteína nuclear heterogênea K (hnRNP K) para que ocorra a replicação viral. Os resultados mostraram que a indução da baixa regulação desse e de outros miRNAs constitui um novo mecanismo para sustentar a expressão de proteínas importantes para o processo de replicação viral.

Em outro estudo sobre a infecção por EV71 realizado por Fu et al (2015), foi visto que os níveis de miR-30a podem ser reduzidos com a infecção, com isso seu alvo o gene Beclin-1 vai ser altamente expresso, gene importante na promoção do processo de autofagia. Os resultados forneceram evidências de que a modulação do nível do miRNA através da superexpressão ou inibição, vai regular a atividade autofágica e conseqüentemente inibir ou promover a replicação de EV71.

#### 4.1.6 Infecção por Adenovírus

Machitani et al (2017) demonstrou nos resultados de sua pesquisa que o miR-27a e miR-27b, que estão amplamente expressos nas células hospedeiras, suprimem a expressão de SNAP25 e TXN2 por meio de silenciamento genético pós-transcricional. O silenciamento desses genes leva a inibição da entrada do adenovírus na célula e a parada do ciclo celular, levando a uma supressão da infecção. Os resultados do presente estudo podem auxiliar na melhoria das terapias genéticas para esse tipo de infecção viral.

#### 4.1.7 Infecção por Ebola

No estudo de Sheng et al (2014) foi observado que após a expressão da glicoproteína do envelope viral (GP) do vírus Ebola em células endoteliais da veia umbilical humana, houve uma indução na expressão de miR-1246, miR-320a e miR-196b-5p. Os alvos desses miRNAs são os genes que codificam as seguintes proteínas: inibidor da via do fator tecidual das moléculas relacionadas à adesão (TFPI), o droglycan1 (DAG1), caspase 8 e o regulador de apoptose tipo FADD (CFLAR), essas proteínas encontraram-se reduzidas nas células analisadas demonstrando um controle induzido pela infecção sobre a viabilidade celular. Além disso, quando os miRNAs foram inibidos ou as proteínas foram superexpressas houve um resgate da viabilidade. Os resultados forneceram uma base molecular para a compreensão da patogênese da infecção, assim como para o desenvolvimento de estratégias de prevenção.

#### 4.1.8 Infecção por HTLV

Yeung et al (2008) analisou o perfil de expressão de miRNA em linhagem de células T humanas infectadas com HTLV-1 (Vírus linfotrópico humano do tipo 1) e observou que dois miRNAs eram regulados consistentemente, o miR-93 e miR-130b, que tem como alvo a região 3' UTR do mRNA da proteína TP53INP1 (*tumor protein 53-induced nuclear protein 1*). Além disso, havia um nível baixo de expressão dessa proteína nessas células, corroborando com o papel regulador dos miRNAs. A proteína TP53INP1 atua na regulação do crescimento celular e no processo de apoptose, com isso os achados implicam que a alta expressão dos miRNAs reguladores afetam a proliferação e a sobrevivência de células infectadas com HTLV-1.

#### 4.1.9 Infecção por HIV e HPV

Guha et al (2016) observou que o gene *p21* (regulador do ciclo celular) foi altamente regulado (expresso) em células T CD4 + infectadas com vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana), tanto a nível de mRNA quanto de proteína. Também foi visto que os miRNAs responsáveis por regular a expressão desse gene, miR-106b e miR-20a, estavam com baixa regulação (expressão) nas células infectadas. Esses resultados forneceram a base para um mecanismo potencial, pelo qual o HIV-1 pode utilizar a maquinaria da célula hospedeira para regular a expressão seletiva de genes que favoreçam a infecção.

No estudo de Chiang et al (2013) se constatou que o miR-132 está altamente regulado após a ativação das células T CD +, e mostrou que o mesmo pode potencializar a replicação viral na linhagem de células T CD4 + (Jurkat). Após o nocaute do gene MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) que codifica um repressor de transcrição, principal alvo identificado do miR-132, também houve um aumento na replicação do vírus. Os achados demonstram mais um mecanismo para promover a melhora da replicação do HIV-1 utilizando a regulação da expressão de um miRNA.

Para identificar miRNAs que modulem a latência do HIV-1, Wang et al (2015) analisou os perfis de expressão de miRNAs de células infectadas que se encontram em latência, constatou-se que o miR-196b e miR-1290 estavam diferencialmente expressos. Esses miRNAs tem como alvo a região 3'UTR do vírus, silenciando sua expressão. A expressão ectópica dos mesmos consegue suprimir a produção e a infecciosidade do vírus, além disso, o uso de inibidores específicos destes miRNAs contrariaram os seus efeitos, podendo ser usados para ativar o vírus que se encontra em forma latente, auxiliando na erradicação do reservatório viral.

Sabidamente mulheres infectadas pelo HIV têm risco aumentado de infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e suas sequelas. Nesse contexto foi realizado um estudo por De Vuyst et al (2015) em que o miR-124-2 foi avaliado como marcador de nível de metilação junto com os genes *CADM1* (gene codificador da molécula de adesão celular 1) e *MAL* (codificador de proteína associada à maturação de linfócito T), com intuito de realizar uma triagem em pacientes HPV positivas, visto que alterações na metilação dos genes das células hospedeiras se acumulam ao longo do tempo em uma infecção transformadora. A análise dos marcadores de metilação realizada junto com o teste de HPV pode oferecer uma estratégia de rastreamento molecular completa para muitas mulheres infectadas pelo HIV que também são positivas para HPV de alto risco.

#### **4.2 Infecção por Protozoário**

Xie et al. (2014) demonstrou em seu trabalho que o *let-7i* tem um papel regulador na expressão de *SIRT1* (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) em células epiteliais biliares humanas em resposta a infecção pelo protozoário *Cryptosporidium parvum*, sugerindo um novo papel desse miRNA na regulação da resposta imune inata epitelial mediada por NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear kappa B). Células epiteliais biliares humanas (H69-colangiócitos) foram infectadas por *C. parvum* e observou-se a diminuição na expressão de *let-7i* nessa linhagem.

O miRNA *let-7i* tem como alvo o mRNA de *SIRT1*, se liga a sua região codificadora e impede sua expressão, já a enzima SIRT1 atua inibindo a atividade de NF- $\kappa$ B através da promoção da desacetilação na região p65. Estudos de ganho e perda de função revelaram que a *let-7i* modula a ativação de NF- $\kappa$ B através da modificação da expressão da SIRT1. No contexto da baixa expressão desse miRNA há uma alta expressão da enzima, conseqüentemente uma baixa ativação das vias dependentes da atividade de NF- $\kappa$ B, como vias inflamatórias e do sistema imune, regulando assim a resposta à infecção (PANTENBURG et al., 2010).

#### **4.3 Infecção Parasitária**

No estudo de He et al. (2013) observou-se que o miRNA pode ser utilizado como biomarcador para detecção de infecção parasitária, no presente artigo foi sugerido o miR-223 circulante como um novo biomarcador para infecção por *Schistosoma japonicum*. No presente estudo, foi visto uma alta expressão do miR-223 em células hepáticas após a infecção, principalmente nas células de Kupffer, sugerindo que o elevado nível encontrado no soro era oriundo do fígado infectado. Esse miRNA atua regulando a atividade do processo de transcrição, de fatores de transcrição e de ligação ao DNA.

As células de Kupffer são essenciais para o desenvolvimento da inflamação induzida pela infecção, os resultados do estudo demonstram que o miR-223 pode desempenhar um papel importante na patogênese e na progressão da esquistossomose, através da regulação da transcrição de alguns genes importantes que vão modular a função dessas células, e consequentemente o processo inflamatório. Além disso, a avaliação de seus níveis pode ser utilizada junto com outros biomarcadores para o diagnóstico desse tipo de infecção (BARRON & WYNN, 2011).

#### **4.4 Infecção Bacteriana**

##### *4.4.1 Helicobacter pylori*

Teng et al (2013) demonstraram que o miRNA let-7b está envolvido no processo inflamatório e na ativação da resposta imune na infecção por *Helicobacter pylori*. O let-7b tem como alvo o mRNA de TLR4 (*Toll-like receptor 4*), consequentemente regulando NF- $\kappa$ B e a expressão dos genes envolvidos na inflamação e na resposta imune. A expressão de let-7b diminui em amostras de mucosa gástrica infectadas, e quando se induz uma alta expressão desse miRNA nas linhagens infectadas há uma atenuação da atividade de NF- $\kappa$ B, confirmando que essa via TLR4-NFKB está envolvida na regulação do sistema imunitário do epitélio gástrico após a infecção.

No estudo de Ye et al (2015) se constatou que células epiteliais gástricas tratadas com LPS (Lipopolissacarídeo) de *H. pylori* podem induzir a ativação da via de sinal JAK/STAT3, através da inibição dos miRNAs: miR-375 e miR-106b, que tem como alvos para a repressão gênica os genes dessa via. Demonstrando que a infecção consegue inibir o papel desses miRNAs e induzir essa via que está envolvida na progressão maligna de cânceres humanos.

Li et al (2012) demonstraram em sua pesquisa que o miR-222 é regulado positivamente na mucosa gástrica infectada por *H. pylori* e também em pacientes com câncer gástrico. O miR-222 atua inibindo a expressão do gene RECK, que tem como função suprimir a metástase tumoral, por isso a alta expressão desse miRNA está relacionada com alta proliferação celular e formação de colônias in vitro. Os dados demonstram que a partir da inibição de RECK, o miR-222 promove proliferação celular e pode estar relacionado com a progressão da carcinogênese gástrica.

A família de miRNAs mir-30 é extensamente expressa em múltiplos tecidos e tipos de células. Demonstrou estar envolvido em uma ampla gama de atividades fisiológicas em tecidos normais e tecidos cancerosos, incluindo diferenciação celular, desenvolvimento, proliferação,

apoptose, senescência e metástase de câncer. Desta maneira vários grupos estudam a relação dos miRNAs desta família com diferentes vias na tumorigênese para o desenvolvimento de terapia dirigida contra o câncer (STARK et al., 2010). Em 2012, Tang et al., demonstram que o MIR30B ataca diretamente *ATG12* e *BECN1*, que são importantes proteínas envolvidas na autofagia, sendo assim, a autofagia comprometida pela regulação positiva de mir-30b pode beneficiar a sobrevivência intracelular do *H. pylori*.

Outro miRNA da família Mir30 foi avaliado por Yang et al. (2016) e foi observado que a repressão da autofagia pelo mir-30d pode ajudar o *H. pylori* intracelular a evitar a remoção autofágica através da seleção dos genes alvo *ATG2B*, *ATG5*, *ATG12*, *BECN1* e *BNIP3L*. Estas descobertas fornecem um novo mecanismo molecular para a ocupação persistente do *H. pylori*, dados que estabelece uma base que será útil para a futura avaliação do mir-30d em infecções por *H. pylori*.

#### 4.4.2 *Mycobacterium tuberculosis*.

Ni et al (2014) atestaram que os miRNAs: miR-132 e miR-26a, agem como reguladores negativos do coativador transcricional p300, um componente da cascata de sinalização do IFN- $\gamma$  em macrófagos humanos, na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. A regulação negativa realizada por esses miRNAs demonstram um mecanismo pelo qual esse tipo de infecção pode regular a ativação da cascata de sinalização, consequentemente a resposta dos macrófagos.

A partir do estudo realizado por Liu et al (2011) foi observado que pacientes infectados por *M. tuberculosis* apresentavam alta expressão de miR-144, principalmente em suas células T. Esse miRNA age inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e também a proliferação de células T. Os resultados do estudo constataram que o miR-144 está envolvido na regulação da resposta imune à infecção por *M. tuberculosis*, através da modificação na produção das citocinas e na proliferação celular.

Fu et al (2016) observaram que em células THP-1 infectadas com *M. tuberculosis*, o nível de miR-206 foi altamente regulado e a expressão do seu alvo TIMP3 foi diminuída, quando a secreção de citocinas inflamatórias foi aumentada. Também se observou que quando esse miRNA era inibido havia uma supressão da secreção de citocinas inflamatórias. Os achados do estudo sugeriram que o miR-206 pode funcionar como um regulador inflamatório e também regular a expressão de seu gene alvo em células infectadas, indicando que esse miRNA tem potencial para ser utilizado como alvo terapêutico para pacientes com Tuberculose.

Lou et al (2017) demonstraram em seu estudo que o miR-20b consegue diminuir a resposta inflamatória em camundongos com tuberculose, isso se deve a ligação do miRNA com a região 3' UTR do NLRP3. Essa ligação regula negativamente a expressão de NLRP3 e a via NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$ . Além disso, em células epiteliais alveolares co-cultivadas com macrófagos esse miRNA diminuiu o processo inflamatório e a morte celular lítica dependente de Caspase-1 (piroptose). Os resultados fornecem base para uma potencial terapia com miR-20b para tuberculose.

Zhang et al. avaliaram que o miR-32-5p regula a inflamação e sobrevivência micobacteriana em macrófagos humanos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, e demonstraram que a superexpressão do gene *FSTLI* reverteu completamente o efeito aumentado de miR-32-5p no crescimento de micobactérias intracelulares induzidas por *M. tuberculosis*. Além disso, a superexpressão de *FSTLI* em células de macrófagos humanos foi suficiente para superar os efeitos inibitórios de miR-32-5p na inflamação induzida por *M. tuberculosis*, sugerindo que o *FSTLI* é o alvo limitante de miR-32-5p para a inibição da inflamação durante a infecção por M.tb. Este achado sugere que o *FSTLI* pode desempenhar um papel pró-inflamatório que é diretamente regulado pelo miR-32-5p. Coletivamente, esses achados delinearam o próprio papel da via de sinalização indispensável miR-32-5p/*FSTLI* em células imunes, como os macrófagos, para que possam desempenhar suas funções com eficácia.

Um grupo de estudos em microbiologia na China, avaliou mais de 80 pacientes com tuberculose e a partir da comparação com um grupo controle observaram uma diferença de expressão de miRNAs entre os grupos avaliados (CUI et al., 2017). Os autores identificaram que o miR-769-5p possuía uma baixa expressão em pacientes com tuberculose quando comparados com o grupo controle, a expressão deste miRNA já foi observada em alguns tipos de câncer, porém seu papel exato continua desconhecido (BUSCH et al., 2016). Destacando os achados de CUI et al. (2017). O miR-769-5p juntamente com outros miRNAs foram identificados como potenciais biomarcadores sanguíneos para a tuberculose.

#### **4.5 Painel de Expressão**

Os miRNAs discutidos no trabalho podem ser considerados potenciais biomarcadores para a composição de painéis de expressão de miRNA para quadros infecciosos, pois possuem associações com os variados tipos de infecções citados, sendo essas associações: diagnósticas ou prognósticas. Alguns dos miRNAs avaliados estão associados a mais de um tipo de infecção, sendo duas infecções virais, ou uma viral e uma bacteriana. Também podendo diferenciar entre associação diagnóstica ou prognóstica/preditiva (Tabela 2).

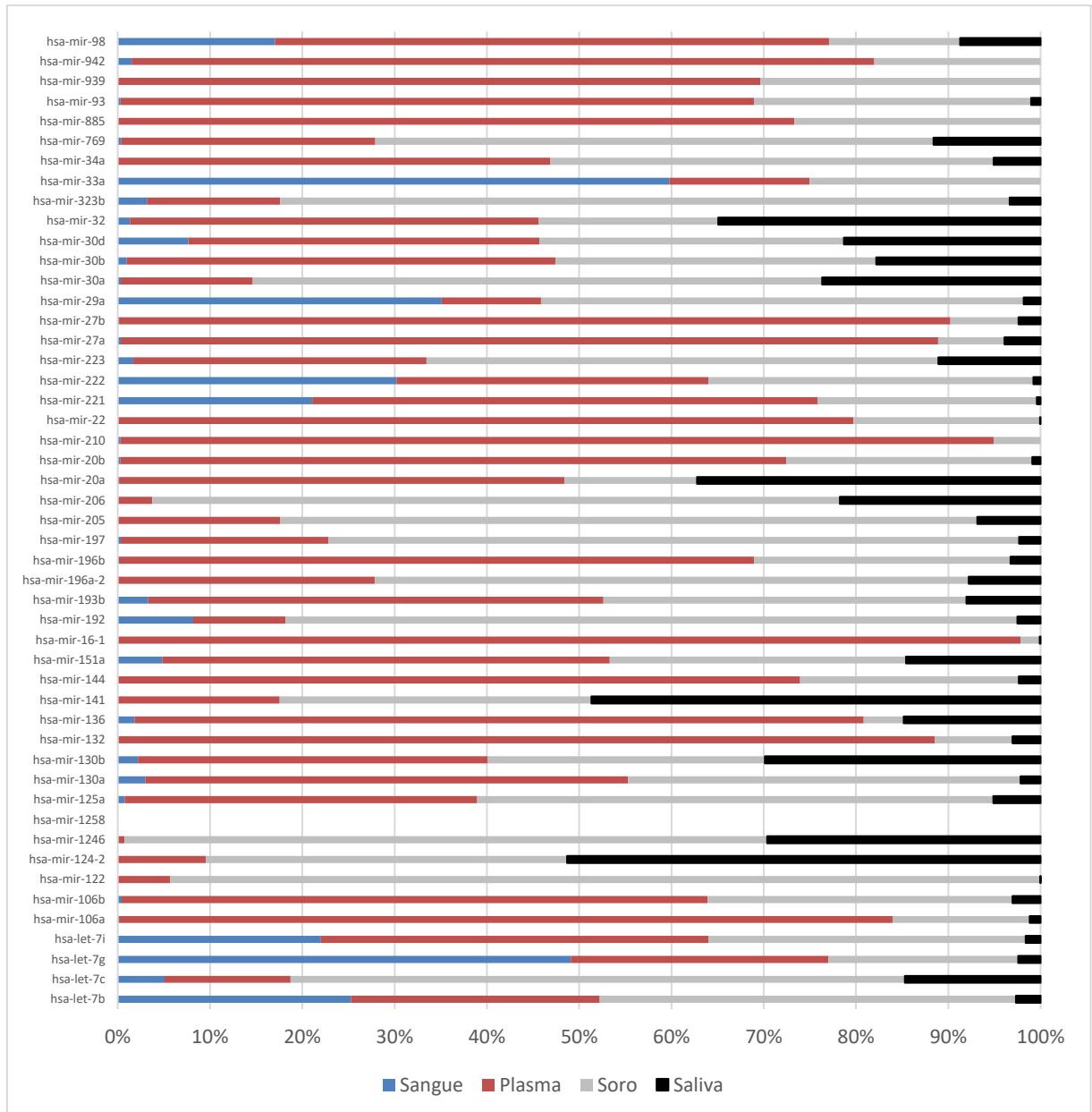
**Tabela 2-** miRNAs com associações a dois quadros infecciosos.

| miRNA    | Associação Diagnóstica | Associação prognóstica/preditiva | Expressão             |
|----------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Let-7g   |                        | HBV, HCV                         | Plasma, saliva e soro |
| miR-122  | HBV                    | HBV, HCV                         | Plasma, saliva e soro |
| miR-192  | HCV                    | HBV                              | (conclusão) o         |
| miR-27a  |                        | HCV, Adenovírus                  | Plasma, saliva e soro |
| miR-222  | HCV                    | <i>H. pylori</i>                 | Plasma, saliva e soro |
| miR-106b |                        | HIV, <i>H. pylori</i>            | Plasma, saliva e soro |
| miR-132  |                        | HIV, <i>M. tuberculosis</i>      | Plasma, saliva e soro |
| Let-7c   |                        | Influenza, Dengue                | Plasma, saliva e soro |

Fonte: Autora

Alterações nos níveis de expressão de miRNAs podem levar a um desequilíbrio no mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica que pode estar relacionado com a origem e progressão de diferentes patologias. Esse desequilíbrio já foi evidenciado em diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares, infecciosas, autoimunes e neurodegenerativas com isso inúmeros estudos têm constatado que miRNAs podem ser muito úteis para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da resposta terapêutica nessas doenças. A presença e a estabilidade de miRNAs em fluidos biológicos, demonstram sua capacidade de contribuir como potenciais biomarcadores em diversos quadros clínicos. (ARDILA-MOLANO, 2015).

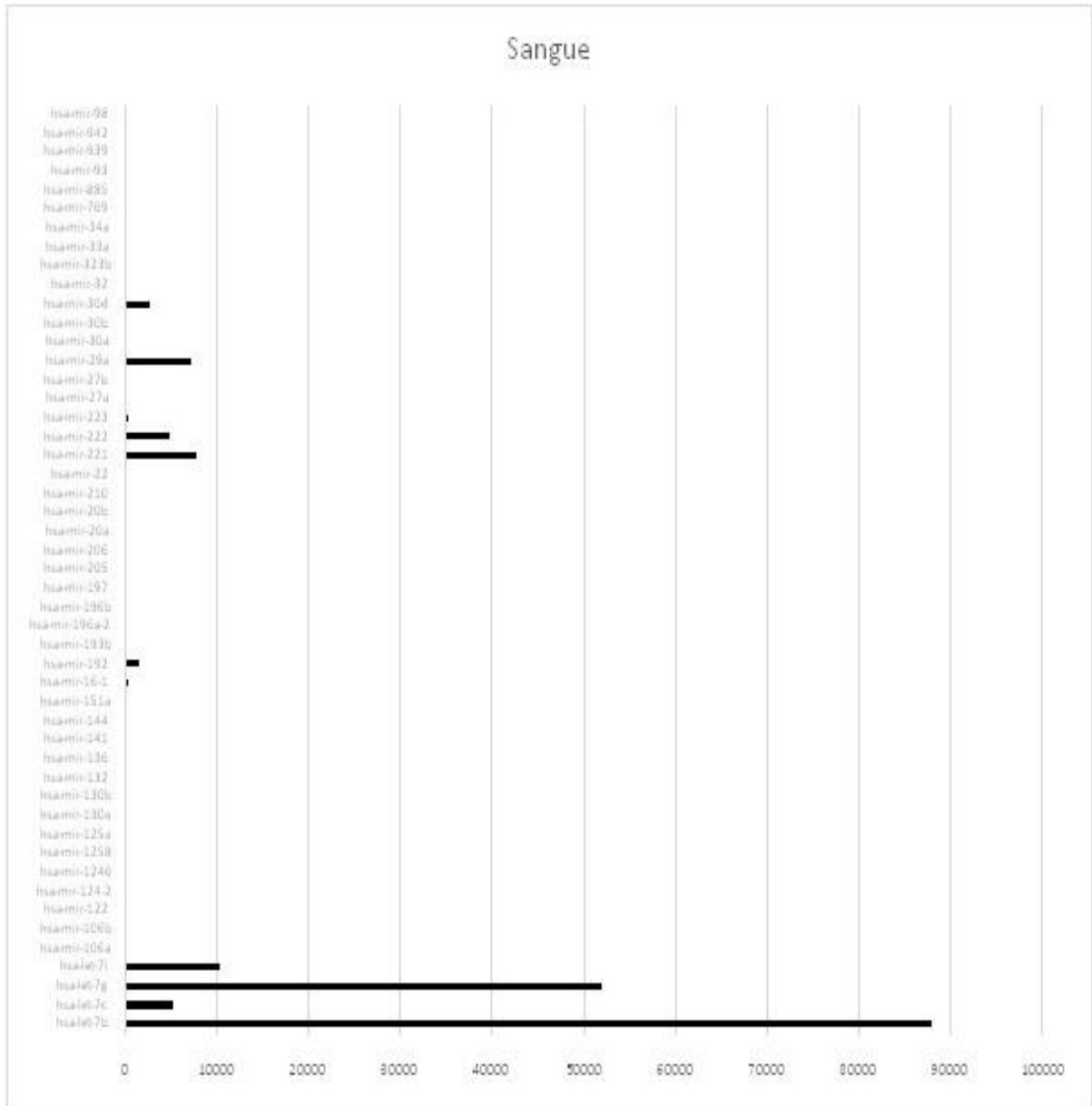
O miRNA-1258 não se expressou nos tecidos investigados (sangue, plasma, soro e saliva). Entretanto a maioria deles pode ser detectada em todos quatro tecidos, estando 41 expressos no sangue, 48 no plasma e soro, e 43 na saliva. A expressão dos miRNAs nos quatro tecidos é demonstrada nas figuras 5, 6, 7, 8 e 9. A figura 5 demonstra que muitos miRNAs podem ser detectados em vários dos tecidos e explicita o percentual de sua expressão em cada tecido/secreção.



Legenda: Eixo dos X: magnitude da expressão em reads por milhão (RPM) de leituras. Apenas o maior valor de RPM foi considerado. Fonte: miRmine, <http://guanlab.ccmb.med.umich.edu/mirmine/>.

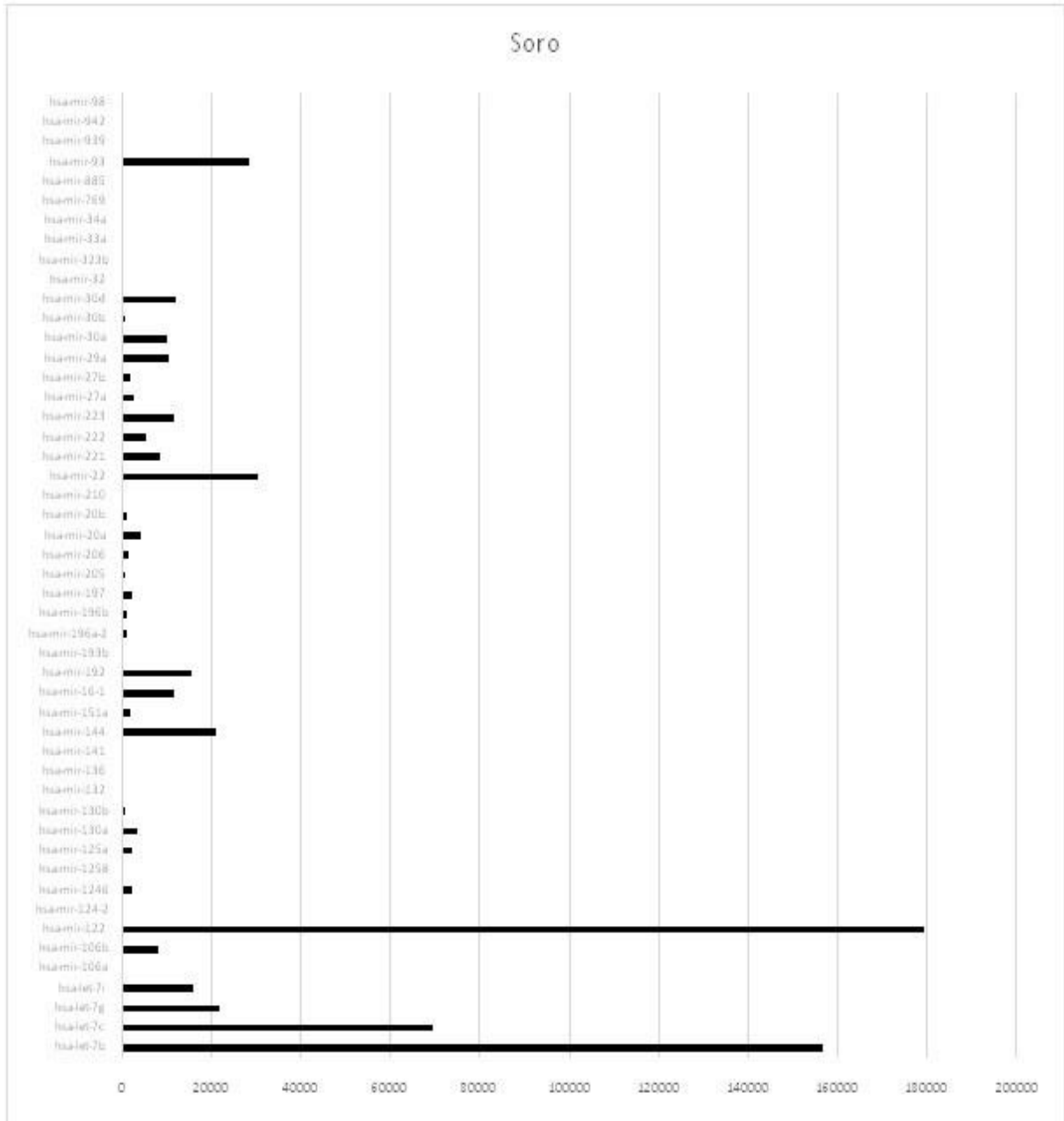
**Figura 5.-** Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas de acordo com o tecido.





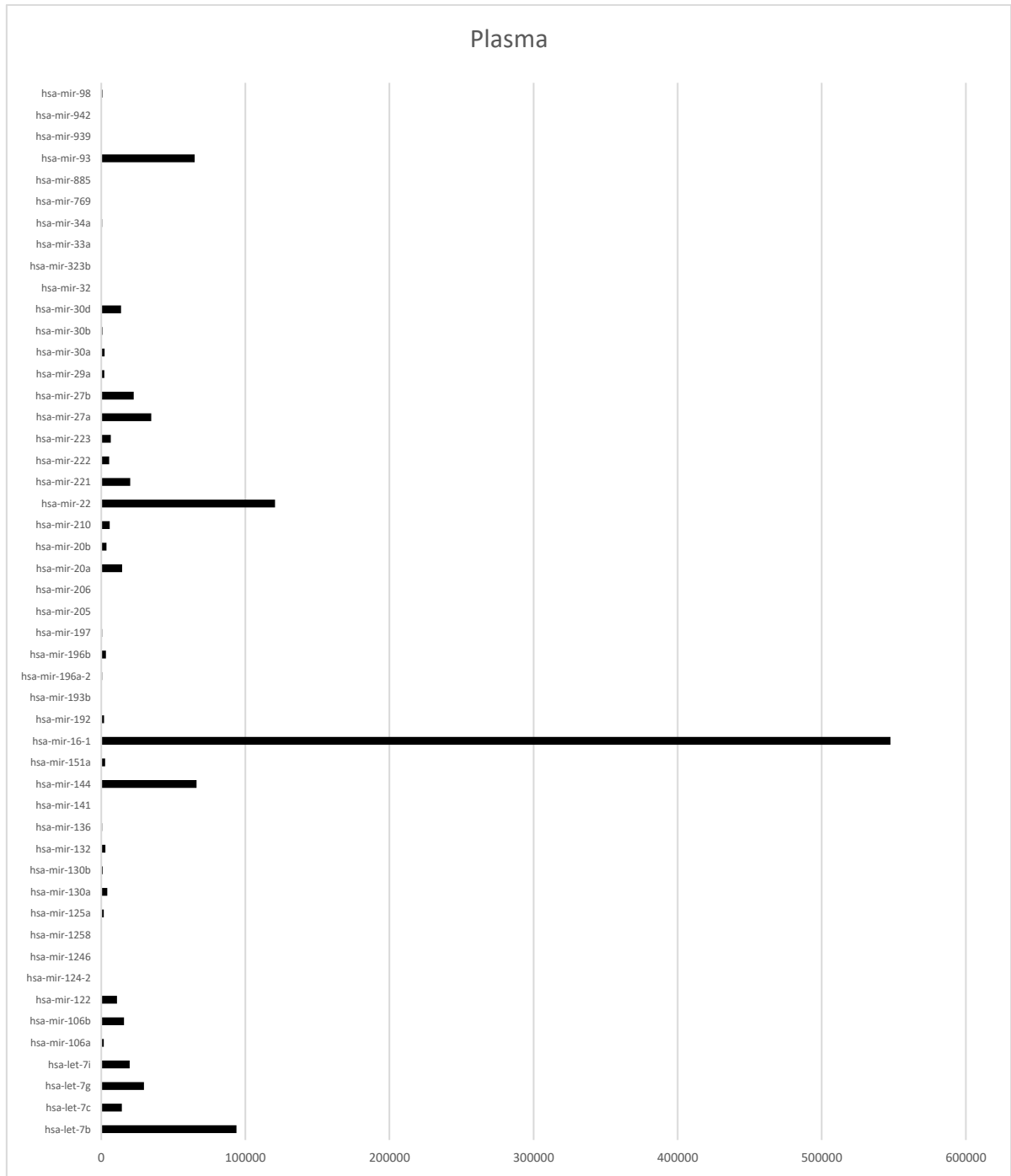
Legenda: Eixo dos X: magnitude da expressão em reads por milhão (RPM) de leituras. Apenas o maior valor de RPM foi considerado. Fonte: miRmine, <http://guanlab.cmb.med.umich.edu/mirmine/>.

**Figura 6.-** Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no sangue total de indivíduos normais.



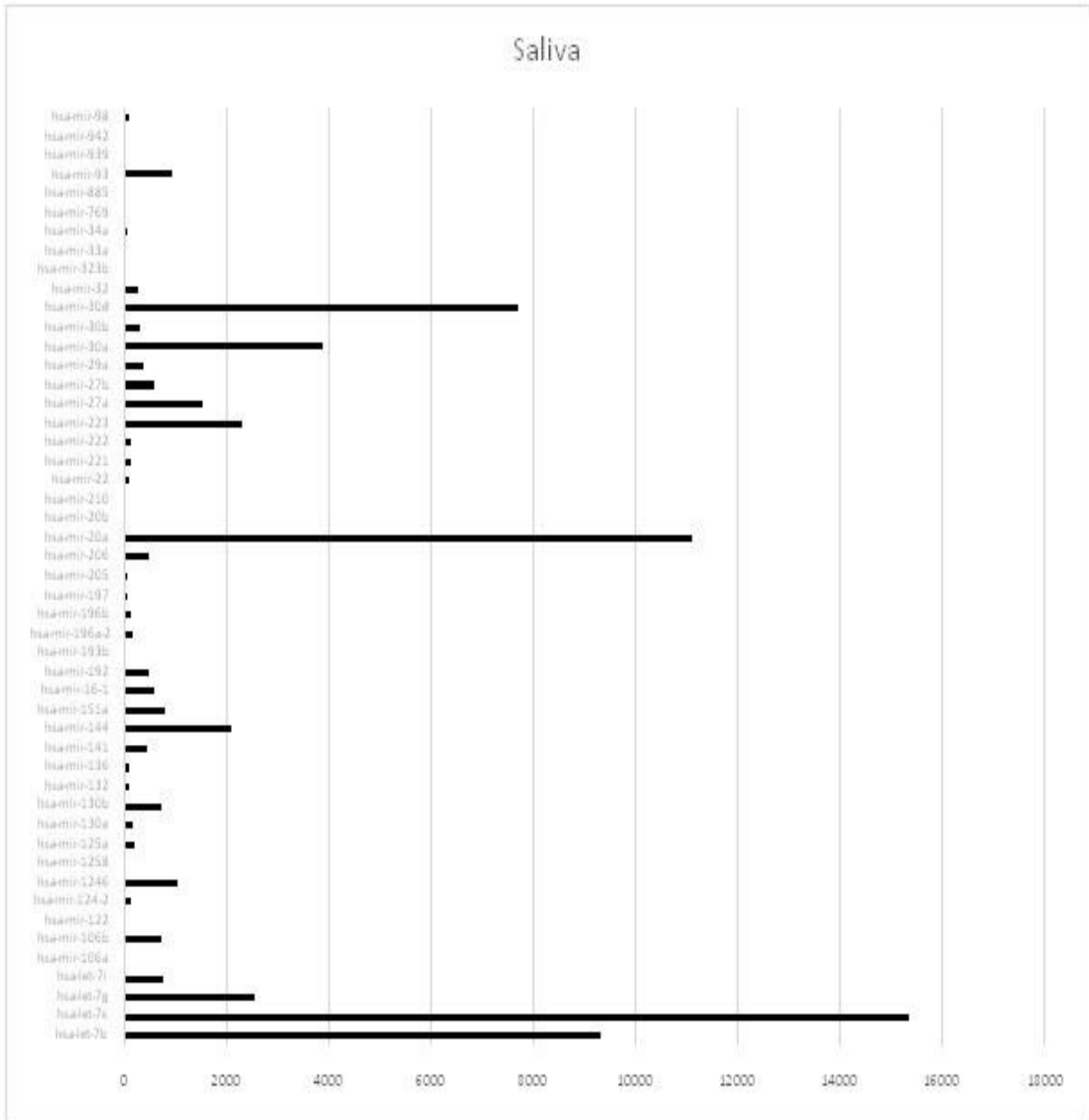
Legenda: Eixo dos X: magnitude da expressão em reads por milhão (RPM) de leituras. Apenas o maior valor de RPM foi considerado. Fonte: miRmine, <http://guanlab.cmb.med.umich.edu/mirmine/>.

**Figura 7-** Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no soro de indivíduos normais.



Legenda: Eixo dos X: magnitude da expressão em reads por milhão (RPM) de leituras. Apenas o maior valor de RPM foi considerado. Fonte: miRmine, <http://guanlab.cmb.med.umich.edu/mirmine/>.

**Figura 8** - Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas no plasma de indivíduos normais.



Legenda: Eixo dos X: magnitude da expressão em reads por milhão (RPM) de leituras. Apenas o maior valor de RPM foi considerado. Fonte: miRmine, <http://guanlab.cmb.med.umich.edu/mirmine/>.

**Figura 9** - Expressão de miRNAs funcionais associados a doenças infecciosas na saliva de indivíduos normais.

## 5 CONCLUSÃO

A análise e discussão do papel dos miRNAs citados no trabalho, atestam que os mesmos podem integrar painéis de expressão de miRNA para quadros infecciosos confeccionados a partir de uma análise exploratória teórica, baseada em estudos prévios e bancos de dados. A partir do levantamento de dados realizado neste estudo e em outros, é possível elaborar painéis de expressão de miRNAs customizados levando em conta as especificidades e particularidades de cada tipo de infecção, como demonstrado a seguir na tabela 3.

**Tabela 3-** Painéis de miRNAs e suas associações.

| <b>Painel de miRNAs</b>   | <b>Associação a doença Infecciosa</b>  |
|---|--|
| Let-7g, mir-122, mir-192, mir-15a, mir-16-1, mir-125-5p, mir-22 | Associação prognóstico desfavorável (Hepatocarcinoma celular em Infecções por HBV) |
| Let-7g, mir-122, mir-192, mir-106a, mir-210                     | Associação prognóstico favorável em Infecções por HBV (cronicidade da infecção)    |
| Let-7g, mir-192, mir-222, mir-221, mir-122                      | Associação diagnóstica em Infecções por HCV  |
| Let-7g, mir-122, mir-942, mir-27a                               | Associação prognóstico favorável em Infecções por HCV                              |
| Let-7g, mir-192, mir-222, mir-221, mir-122, mir-22              | Associação prognóstico desfavorável (Hepatocarcinoma celular em Infecções por HCV) |
| Let-7c, mir-136, mir-33a  | Associação prognóstico favorável em Infecções por Virus Influenzae                 |

Fonte: Autora.

Vale ressaltar que os painéis de miRNAs sugeridos precisaram ainda ser validados pelo uso de técnicas moleculares em laboratórios de pesquisa. Além disso, a possibilidade da detecção desses miRNAs em fluidos corporais, como: sangue, soro e saliva, facilita que esses painéis sejam incorporados futuramente na prática e rotina dos laboratórios de análises clínicas como biomarcadores, auxiliando no diagnóstico e prognóstico de pacientes acometidos por infecções.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALAM, M. M. & O'NEILL, L. A. MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. **European journal of immunology**, v. 41, n. 9, p. 2482-2485. 2011.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350. 2004.
- AMERES, S. L. & ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 475. 2013.
- AMERES, S. L.; HORWICH, M. D.; HUNG, J. H.; XU, J.; GHILDIYAL, M.; et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1534-1539. 2010.
- ARDILA-MOLANO, J.; VIZCAÍNO, M.; SERRANO, M. L. Circulating microRNAs as potencial cancer biomarkers. **Rev Colomb Cancerol**, v. 19, n. 4, p. 228-238. 2015.
- BADER, A. G. miR-34—a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 120. 2012.
- BANERJEE, S.; XIE, N.; CUI, H.; TAN, Z.; YANG, S.; et al. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6542-6549. 2013.
- BARRON, L. & WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis induced inflammation and fibrosis. **Eur J Immunol**, 41: 2509–2514. 2011.
- BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; IZAURRALDE, E. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 523-530. 2006.
- BI, Y.; LIU, G.; YANG, R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. **Journal of cellular physiology**, v. 218, n. 3, p. 467-472. 2009.
- BIHRER, V.; FRIEDRICH-RUST, M.; KRONENBERGER, B.; FORESTIER, N.; HAUPENTHAL, J.; et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. **The American journal of gastroenterology**, v. 106, n. 9, p. 1663. 2011.

BUSCH, A.; BUSCH, M.; SCHOLZ, C. J.; KELLERSMANN, R.; OTTO, C.; et al. Aneurysm miRNA signature differs, depending on disease localization and morphology. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, p. 81. 2016.

CALIN, G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R.; ZUPO, S.; et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15524-15529. 2002.

CARMAN, W. F.; HADZIYANNIS, S.; MCGARVEY, M. J.; JACYNA, M. R.; KARAYIANNIS, P.; et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *The Lancet*, v. 334, n. 8663, p. 588-591. 1989.

CHANG, J.; GUO, J. T.; JIANG, D.; GUO, H.; TAYLOR, J. M.; BLOCK, T. M. Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. **Journal of virology**, v. 82, n. 16, p. 8215-8223. 2008.

CHENG, G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 81, p. 75-93. 2015.

CHIANG, K.; LIU, H.; RICE, A. P. miR-132 enhances HIV-1 replication. **Virology**, v. 438, n. 1, p. 1-4. 2013.

CHO, H. J.; KIM, J. K.; NAM, J. S.; WANG, H. J.; LEE, J. H.; et al. High circulating microRNA-122 expression is a poor prognostic marker in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma who undergo radiofrequency ablation. **Clinical biochemistry**, v. 48, n. 16-17, p. 1073-1078. 2015.

CHOU, W. W.; HUANG, C. F.; YEH, M. L.; TSAI, Y. S.; HSIEH, M. Y.; et al. MicroRNA let-7g cooperates with interferon/ribavirin to repress hepatitis C virus replication. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 3, p. 311-320. 2016.

CHRISTOPHER, A. F.; KAUR, R. P.; KAUR, G.; KAUR, A.; GUPTA, V.; BANSAL, P. MicroRNA therapeutics: discovering novel targets and developing specific therapy. **Perspectives in clinical research**, v. 7, n. 2, p. 68. 2016.

COBB, B. S.; SMALE, S. T. Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. In: **Molecular Analysis of B Lymphocyte Development and Activation**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. p. 29-47.

COPPOLA, N.; POTENZA, N.; PISATURO, M.; MOSCA, N.; TONZIELLO, G.; et al. Liver microRNA hsa-miR-125a-5p in HBV chronic infection: correlation with HBV replication and disease progression. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e65336, 2013.

COULOUARN, C.; FACTOR, V. M.; ANDERSEN, J. B.; DURKIN, M. E.; THORGEIRSSON, S. S. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*, v. 28, n. 40, p. 3526. 2009.

CUI, J.Y.; LIANG, H.W.; PAN, X. L.; LI, D.; JIAO, N.; et al. Characterization of a novel panel of plasma microRNAs that discriminates between Mycobacterium tuberculosis infection and healthy individuals. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184113. 2017.

DE PLANELL-SAGUER, M. & RODICIO, M. C. Detection methods for microRNAs in clinic practice. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 10-11, p. 869-878. 2013.

DE VUYST, H.; FRANCESCHI, S.; PLUMMER, M.; MUGO, N. R.; SAKR, S. R.; et al. Methylation levels of CADM1, MAL, and MIR124-2 in cervical scrapes for triage of HIV-infected, high-risk HPV-positive women in Kenya. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 70, n. 3, p. 311-318. 2015.

DENEBERG, S.; KANDURI, M.; ALI, D.; BENGTZEN, S.; KARIMI, M.; et al. microRNA-34b/c on chromosome 11q23 is aberrantly methylated in chronic lymphocytic leukemia. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 910-917. 2014.

DING, C. L.; XU, G.; REN, H.; ZHAO, L. J.; ZHAO, P.; et al. HCV infection induces the upregulation of miR-221 in NF- $\kappa$ B dependent manner. **Virus research**, v. 196, p. 135-139. 2015.

DRUSCO, A.; & CROCE, C. M. MicroRNAs and cancer: A long story for short RNAs. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, 2017. p. 1-24.



EISENBERG, I.; ERAN, A.; NISHINO, I.; MOGGIO, M.; LAMPERTI, C.; et al. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 17016-17021. 2007.

ESCALERA-CUETO, M.; MEDINA-MARTINEZ, I.; DEL ANGEL, R. M.; BERUMEN-CAMPOS, J.; GUTIÉRREZ-ESCOLANO, A. L.; YOCUPICIO-MONROY, M. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. **Virus research**, v. 196, p. 105-112. 2015.

ESQUELA-KERSCHER, A. & SLACK, F. J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259. 2006.

EULALIO, A.; SCHULTE, L.; VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 742–750, 2012.

FEHR, C.; CONRAD, K. D.; NIEPMANN, M. Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases. **Cell Cycle**, v. 11, n. 2, p. 277-285. 2012.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Rev. Genet.**; 9: 102-114. 2008.

FU, X.; ZENG, L.; LIU, Z.; KE, X.; LEI, L.; LI, G. MicroRNA-206 regulates the secretion of inflammatory cytokines and MMP9 expression by targeting TIMP3 in Mycobacterium tuberculosis–infected THP-1 human macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 477, n. 2, p. 167-173. 2016.

FU, Y.; XU, W.; CHEN, D.; FENG, C.; ZHANG, L.; et al. Enterovirus 71 induces autophagy by regulating has-miR-30a expression to promote viral replication. **Antiviral research**, v. 124, p. 43-53. 2015.

GAO, D.; ZHAI, A.; QIAN, J.; LI, A.; LI, Y.; et al. Down-regulation of suppressor of cytokine signaling 3 by miR-122 enhances interferon-mediated suppression of hepatitis B virus. **Antiviral research**, v. 118, p. 20-28. 2015.

GHOLAMI, M.; RAVANSHAD, M.; ALAVIAN, S. M.; BAESI, K.; MOALLEMI, S. Evaluation of miR-122 level in the plasma of chronically HCV infected patients. **Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 242-245. 2016.

GŁOBIŃSKA, A.; PAWEŁCZYK, M.; KOWALSKI, M. L. MicroRNAs and the immune response to respiratory virus infections. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 7, p. 963-971, 2014.

GRAFF, J.W.; DICKSON, A.M.; CLAY, G.; MCCAFFREY, A.P.; WILSON, M.E. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21816-21825. 2012.

GRILLARI, J.; & GRILLARI-VOGLAUER, R. Novel modulators of senescence, aging, and longevity: Small non-coding RNAs enter the stage. **Experimental gerontology**, v. 45, n. 4, p. 302-311, 2010.

GUHA, D.; MANCINI, A.; SPARKS, J.; AYYAVOO, V. HIV-1 Infection Dysregulates Cell Cycle Regulatory Protein p21 in CD4+ T Cells Through miR-20a and miR-106b Regulation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1902-1912, 2016.

GULYAEVA, L. F.; & KUSHLINSKIY, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 143, 2016.

HE, X.; SAI, X.; CHEN, C.; ZHANG, Y.; XU, X.; et al. Host serum miR-223 is a potential new biomarker for Schistosoma japonicum infection and the response to chemotherapy. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 272. 2013.

HONG, Z.; HONG, H.; LIU, J.; ZHENG, X.; HUANG, M.; ET AL. miR-106a is downregulated in peripheral blood mononuclear cells of chronic hepatitis B and associated with enhanced levels of interleukin-8. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

HOU, J.; WANG, P.; LIN, L.; LIU, X.; MA, F.; et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2150-2158. 2009.

HU, Y.; JIANG, L.; LAI, W.; QIN, Y.; ZHANG, T.; et al. MicroRNA-33a disturbs influenza A virus replication by targeting ARCN1 and inhibiting viral ribonucleoprotein activity. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 1, p. 27-38. 2016.

HUNT, E. A.; BROYLES, D.; HEAD, T.; DEO, S. K. MicroRNA detection: current technology and research strategies. **Annual review of analytical chemistry**, v. 8, p. 217-237. 2015.

HUUMONEN, K.; KORKALAINEN, M.; VILUKSELA, M.; LAHTINEN, T.; NAARALA, J.; et al. Role of microRNAs and DNA methyltransferases in transmitting induced genomic instability between cell generations. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 139. 2014.

IVANOVSKA, I.; BALL, A. S.; DIAZ, R. L.; MAGNUS, J. F.; KIBUKAWA, M.; et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 7, p. 2167-2174. 2008.

JANSSEN, H. L.; REESINK, H. W.; LAWITZ, E. J.; ZEUZEM, S.; RODRIGUEZ-TORRES, M.; et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 18, p. 1685-1694. 2013.

JOPLING, C. L.; YI, M.; LANCASTER, A. M.; LEMON, S. M.; SARNOW, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. **science**, v. 309, n. 5740, p. 1577-1581. 2005.

KARTHA, R. V. & SUBRAMANIAN, S. MicroRNAs in cardiovascular diseases: biology and potential clinical applications. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 3, n. 3, p. 256-270. 2010.

KAWAHARA, Y. Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. **Congenital anomalies**, v. 54, n. 1, p. 12-21. 2014.

KIM, J. H.; LEE, C. H.; LEE, S. W. Hepatitis C virus infection stimulates transforming growth factor- $\beta$  1 expression through up-regulating miR-192. **The Journal of Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 520. 2016.

KIM, Y.; LEE, J.; RYU, H. Modulation of autophagy by miRNAs. **BMB reports**, v. 48, n. 7, p. 371. 2015.

KOSCIANSKA, E.; STAREGA-ROSLAN, J.; SZNAJDER, L. J.; OLEJNICZAK, M.; GALKA-MARCINIAK, P.; et al. Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers. **BMC molecular biology**, v. 12, n. 1, p. 14. 2011.

KOTURBASH, I.; ZEMP, F.J.; PROGRIBNY, I.; KOVALCHUK, O. Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 722, n. 2, p. 94-105. 2011.

KOZOMARA, A. & GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D68-D73. 2013.

KUMAR, M. S.; LU, J.; MERCER, K. L.; GOLUB, T. R.; JACKS, T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. **Nature genetics**, v. 39, n. 5, p. 673. 2007.

KUTAY, H.; BAI, S.; DATTA, J.; MOTIWALA, T.; POGRIBNY, I.; et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 671-678, 2006.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; YALCIN, A.; MEYER, J.; LENDECKEL, W.; et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Current biology**, v. 12, n. 9, p. 735-739. 2002.

LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-862. 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854. 1993.

LEE, Y. S. & DUTTA, A. MicroRNAs in cancer. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 199-227. 2009.

- LI, N.; TANG, B.; ZHU, E. D.; LI, B. S.; ZHUANG, Y.; et al. Increased miR-222 in H. pylori-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK. **FEBS letters**, v. 586, n. 6, p. 722-728. 2012.
- LI, P.; XU, Q.; ZHANG, D.; LI, X.; HAN, L.; et al. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer. **FEBS letters**, v. 588, n. 5, p. 705-712, 2014.
- LIU, F. J.; WEN, T.; LIU, L. MicroRNAs as a novel cellular senescence regulator. **Ageing research reviews**, v. 11, n. 1, p. 41-50. 2012.
- LIU, Y.; WANG, X.; JIANG, J.; CAO, Z.; YANG, B.; et al. Modulation of T cell cytokine production by miR-144\* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. **Molecular immunology**, v. 48, n. 9-10, p. 1084-1090. 2011.
- LOU, J.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; QIU, W. MiR-20b inhibits mycobacterium tuberculosis induced inflammation in the lung of mice through targeting NLRP3. **Experimental cell research**, v. 358, n. 2, p. 120-128. 2017.
- LU, L. F. & LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. **Immunology**, v. 127, n. 3, p. 291-298, 2009.
- MA, Y. J.; YANG, J.; FAN, X. L.; ZHAO, H. B.; HU, W.; et al. Cellular microRNA let-7c inhibits M1 protein expression of the H1N1 influenza A virus in infected human lung epithelial cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 10, p. 2539-2546. 2012.
- MACHITANI, M.; SAKURAI, F.; WAKABAYASHI, K.; NAKATANI, K.; TACHIBANA, M.; MIZUGUCHI, H. MicroRNA miR-27 inhibits adenovirus infection by suppressing the expression of SNAP25 and TXN2. **Journal of virology**, v. 91, n. 12, p. e00159-17. 2017.
- MAUDET, C.; MANO, M.; EULALIO, A. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. **FEBS letters**, v. 588, n. 22, p. 4140-4147. 2014.
- MEHRAEIN, Y.; SCHMID, I.; EGGERT, M.; KOHLHASE, J.; STEINLEIN, O. K. DICER1 syndrome can mimic different genetic tumor predispositions. **Cancer letters**, v. 370, n. 2, p. 275-278. 2016.

MEYER, S. U.; KAISER, S.; WAGNER, C.; THIRION, C.; PFAFFL, M. W. Profound effect of profiling platform and normalization strategy on detection of differentially expressed microRNAs—a comparative study. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38946. 2012.

MIRMINA - HUMAN MIRNA EXPRESSION DATABASE. Disponível em: <<http://guanlab.ccmb.med.umich.edu/mirmine/>> Acesso em: 28 de março de 2018.

MONTEYS, A. M.; SPENGLER, R. M.; WAN, J.; TECEDOR, L.; LENNOX, K. A.; et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. **Rna**, v. 16, n. 3, p. 495-505. 2010.

MOTAVAF, M.; SAFARI, S.; ALAVIAN, S. M. Targeting microRNA-122: walking on cutting edge of hepatitis C virus infection therapy. **Acta Virol**, v. 58, n. 4, p. 301-8. 2014.

MOTAWI, T. K.; SHAKER, O. G.; EL-MARAGHY, S. A.; SENOUSY, M. A. Serum microRNAs as potential biomarkers for early diagnosis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137706. 2015.

MURPHY, J. & BUSTIN, S. A. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard?. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 9, n. 2, p. 187-197. 2009.

NAKAMURA, M.; KANDA, T.; JIANG, X.; HAGA, Y.; TAKAHASHI, K.; et al. Serum microRNA-122 and Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein are useful tools for liquid biopsy of the patients with hepatitis B virus and advanced liver fibrosis. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177302, 2017.

NI, B.; RAJARAM, M. V.; LAFUSE, W. P.; LANDES, M. B.; SCHLESINGER, L. S. Mycobacterium tuberculosis decreases human macrophage IFN- $\gamma$  responsiveness through miR-132 and miR-26a. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 9, p. 4537-4547. 2014.

ONO, C.; FUKUHARA, T.; MOTOOKA, D.; NAKAMURA, S.; OKUZAKI, D.; et al. Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006374. 2017.

OU, X.; LEE, M. R.; HUANG, X.; MESSINA-GRAHAM, S.; BROXMEYER, H. E. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. **Stem cells**, v. 32, n. 5, p. 1183-1194. 2014.

PANTENBURG, B.; CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; DANN, S. M.; CONNELLY, R. L.; LEWIS, D. E.; et al. Human CD8<sup>+</sup> T cells clear *Cryptosporidium parvum* from infected intestinal epithelial cells. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 82, n. 4, p. 600-607. 2010.

PARK, S.O; KUMAR, M.; GUPTA, S. TGF- $\beta$  and iron differently alter HBV replication in human hepatocytes through TGF- $\beta$ /BMP signaling and cellular microRNA expression. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39276, 2012.

PASQUINELLI, A. E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M. Q.; KURODA, M. I.; et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86, 2000.

PAULEY, K. M.; SATOH, M.; CHAN, A. L.; BUBB, M. R.; REEVES, W. H.; et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 4, p. R101. 2008.

PERRY, M.M.; MOSCHOS, S.A.; WILLIAMS, A.E.; SHEPHERD, N.J, LARNER-SVENSSON, H.M.; et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5689-5698. 2008.

POTENZA, N.; PAPA, U.; MOSCA, N.; ZERBINI, F.; NOBILE, V.; et al. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 12, p. 5157-5163. 2011.

QIN, J.; KE, J.; XU, J.; WANG, F.; ZHOU, Y.; et al. Downregulation of microRNA-132 by DNA hypermethylation is associated with cell invasion in colorectal cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 3639, 2015.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **nature**, v. 403, n. 6772, p. 901. 2000.

ROM, S.; ROM, I.; PASSIATORE, G.; PACIFICI, M.; RADHAKRISHNAN, S.; et al. CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 7, p. 2292-2300. 2010.

RÜEGGER, S. & GROßHANS, H. MicroRNA turnover: when, how, and why. **Trends in biochemical sciences**, v. 37, n. 10, p. 436-446. 2012.

SCHMITTGEN, T. D.; JIANG, J.; LIU, Q.; YANG, L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 4, p. e43-e43. 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; LEE, E. J.; JIANG, J.; SARKAR, A.; YANG, L.; et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 31-38. 2008.

SHENG, M.; ZHONG, Y.; CHEN, Y.; DU, J.; JU, X.; ZHAO, C.; et al. Hsa-miR-1246, hsa-miR-320a and hsa-miR-196b-5p inhibitors can reduce the cytotoxicity of Ebola virus glycoprotein in vitro. **Science China Life Sciences**, v. 57, n. 10, p. 959-972. 2014.

SHI, C. & XU, X. MicroRNA-22 is down-regulated in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 5, p. 375-380. 2013.

SHINGARA, J.; KEIGER, K.; SHELTON, J.; LAOSINCHAI-WOLF, W.; POWERS, P.; et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. **Rna**, v. 11, n. 9, p. 1461-1470. 2005.

SKALSKY, R. L. & CULLEN, B. R. Viruses, microRNAs, and host interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 123-141. 2010.

SMITH-VIKOS, T. & SLACK, F. J. MicroRNAs and their roles in aging. **J Cell Sci**, v. 125, n. 1, p. 7-17. 2012.

STARK, M. S.; TYAGI, S.; NANCARROW, D. J.; BOYLE, G. M.; COOK, A. L.; et al. Characterization of the melanoma miRNAome by deep sequencing. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9685. 2010.

TAKAMIZAWA, J.; KONISHI, H.; YANAGISAWA, K.; TOMIDA, S.; OSADA, H.; et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer research**, v. 64, n. 11, p. 3753-3756. 2004.

TAKATA, A.; OTSUKA, M.; OHNO, M.; KISHIKAWA, T.; YOSHIKAWA, T.; et al. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let-7. **Scientific reports**, v. 6, p. 23237. 2016.



TAM, S.; DE BORJA, R.; TSAO, M. S.; MCPHERSON, J. D. Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. **Laboratory investigation**, v. 94, n. 3, p. 350. 2014.

TANG, B.; LI, N.; GU, J.; ZHUANG, Y.; LI, Q.; et al. Compromised autophagy by MIR30B benefits the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1045-1057. 2012.

TANG, W. F.; HUANG, R. T.; CHIEN, K. Y.; HUANG, J. Y.; LAU, K. S.; JHENG, J. R.; et al. Host microRNA miR-197 plays a negative regulatory role in the enterovirus 71 infectious cycle by targeting the RAN protein. **Journal of virology**, v. 90, n. 3, p. 1424-1438. 2016.

TENG, G. G.; WANG, W. H.; DAI, Y.; WANG, S. J.; CHU, Y. X.; et al. Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with *Helicobacter pylori* infection by targeting Toll-like receptor 4. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56709. 2013.

THOMSON, D. W.; BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J. Experimental strategies for microRNA target identification. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 16, p. 6845-6853. 2011.

THUM, T.; GALUPPO, P.; WOLF, C.; FIEDLER, J.; KNEITZ, S.; et al. Thomas et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. **Circulation**, v. 116, n. 3, p. 258-267, 2007.

TIWARI, J.; GUPTA, G.; ANDREOLI PINTO, T. J.; SHARMA, R.; PABREJA, K.; et al. Role of microrNas (mirNas) in the pathophysiology of diabetes mellitus. **Panminerva Medica**, v. 60, n. 1, p. 25-28. 2018.

TOWLER, B. P.; JONES, C. I.; NEWBURY, S. F. Mechanisms of regulation of mature miRNAs. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 6, p. 1208-1214. 2015.

TSONGALIS, G. J.; CALIN, G.; CORDELIER, P.; CROCE, C.; MONZON, F.; et al. MicroRNA analysis: is it ready for prime time?. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 343-347. 2013.

VALASEK, M. A. & REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in physiology education**, v. 29, n. 3, p. 151-159. 2005.

VAN ROOIJ, E. The art of microRNA research. **Circulation research**, v. 108, n. 2, p. 219-234. 2011.

VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; LIU, N.; WILLIAMS, A. H.; MCANALLY, J.; et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18255-18260. 2006.

VÁRALLYAY, E.; BURGYÁN, J.; HAVELDA, Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. **Nature protocols**, v. 3, n. 2, p. 190. 2008.

VERONESE, A.; PEPE, F.; CHIACCHIA, J.; PAGOTTO, S.; LANUTI, P.; et al. Allele-specific loss and transcription of the miR-15a/16-1 cluster in chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 1, p. 86. 2015

VIDAL, L.; BLAGDEN, S.; ATTARD, G.; DE BONO, J. Making sense of antisense. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 18, p. 2812-2818. 2005.

VISWANATHAN, S. R.; POWERS, J. T.; EINHORN, W.; HOSHIDA, Y.; NG, T. L.; et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. **Nature genetics**, v. 41, n. 7, p. 843. 2009.

WANG, G. K.; ZHU, J. Q.; ZHANG, J. T.; LI, Q.; LI, Y.; et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. **European heart journal**, v. 31, n. 6, p. 659-666. 2010.

WANG, J. H.; JIANG, D.; RAO, H. Y.; ZHAO, J. M.; WANG, Y.; et al. Absolute quantification of serum microRNA-122 and its correlation with liver inflammation grade and serum alanine aminotransferase in chronic hepatitis C patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. 52-56. 2015.

WANG, P.; QU, X.; ZHOU, X.; SHEN, Y.; JI, H.; FU, Z.; et al. Two cellular microRNAs, miR-196b and miR-1290, contribute to HIV-1 latency. **Virology**, v. 486, p. 228-238. 2015.

WANG, Y.; JIANG, L.; JI, X.; YANG, B.; ZHANG, Y.; et al. Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 25, p. 18484-18493. 2013.

WEI, H.; ZHANG, J.; TAN, K.; SUN, R.; YIN, L.; et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 11, p. 27058-27071. 2015.

WÓJCIK, K.; PIEKARSKA, A.; SZYMAŃSKA, B.; JABŁONOWSKA, E. Hepatic expression of miR-122 and antioxidant genes in patients with chronic hepatitis B. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 3. 2016.

XIE, H.; LEI, N.; GONG, A. Y.; CHEN, X. M.; HU, G. Cryptosporidium parvum induces SIRT1 expression in host epithelial cells through downregulating let-7i. **Human immunology**, v. 75, n. 8, p. 760-765. 2014.

XIE, Q. H.; HE, X. X.; CHANG, Y.; SUN, S. Z.; JIANG, X.; et al. MiR-192 inhibits nucleotide excision repair by targeting ERCC3 and ERCC4 in HepG2. 2.15 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 410, n. 3, p. 440-445. 2011.

XU, W. D.; LU, M. M.; PAN, H. F.; YE, D. Q. Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. **Inflammation**, v. 35, n. 4, p. 1525-1529. 2012.

XUE, J. MicroRNAs in cancer therapeutic response: friend and foe. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 4, p. 730-743. 2014.

YANG, J. S.; PHILLIPS, M. D.; BETEL, D.; MU, P.; VENTURA, A.; et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. **Rna**, v. 17, n. 2, p. 312-326. 2011.

YANG, X. J.; SI, R. H.; LIANG, Y. H.; MA, B. Q.; JIANG, Z. B.; et al. Mir-30d increases intracellular survival of Helicobacter pylori through inhibition of autophagy pathway. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 15, p. 3978. 2016.

YANG, Y.; LIU, Y.; XUE, J.; YANG, Z.; SHI, Y.; et al. MicroRNA-141 targets Sirt1 and inhibits autophagy to reduce HBV replication. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 310-322. 2017.

YE, F.; TANG, C.; SHI, W.; QIAN, J.; XIAO, S.; et al. A MDM2-dependent positive-feedback loop is involved in inhibition of miR-375 and miR-106b induced by Helicobacter pylori lipopolysaccharide. **International journal of cancer**, v. 136, n. 9, p. 2120-2131. 2015.

YEUNG, M. L.; YASUNAGA, J. I.; BENNASSER, Y.; DUSETTI, N.; HARRIS, D.; et al. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53–induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8976-8985. 2008.

YU, F.; YANG, J.; OUYANG, J.; ZHENG, Y.; CHEN, B.; et al. Serum microRNA-210 levels in different groups of chronic hepatitis B patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 450, p. 203-209. 2015.

ZHANG, Y.; JIA, Y.; ZHENG, R.; GUO, Y.; WANG, Y.; et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 12, p. 1830-1838. 2010.

ZHANG, Z. M.; ZHANG, A. R.; XU, M.; LOU, J.; QIU, W. Q. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 12, p. 1830-1838. 2010.

ZHAO, L.; ZHU, J.; ZHOU, H.; ZHAO, Z.; ZOU, Z.; LIU, X. Identification of cellular microRNA-136 as a dual regulator of RIG-I-mediated innate immunity that antagonizes H5N1 IAV replication in A549 cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 14991. 2015.

ZHOU, A.; LI, S.; WU, J.; KHAN, F.A.; ZHANG, S. Interplay between microRNAs and host pathogen recognition receptors (PRRs) signaling pathways in response to viral infection. **Virus research**, v. 184, p. 1-6. 2014.