

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE BIOMEDICINA  
PAULO SZWARC

**CARACTERIZAÇÃO DO RNA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS  
DE PACIENTES COM SEPSE**

CURITIBA

2017

PAULO SZWARC

**CARACTERIZAÇÃO DO RNA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS  
DE PACIENTES COM SEPSE**

Trabalho de Conclusão de Curso realizado no Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, apresentado à disciplina TCC II do Curso de Graduação em Biomedicina do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Ono  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lysangela Ronalte Alves

CURITIBA

2017

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Lys, pelo acompanhamento, apoio e compreensão durante este período importante da minha vida.

Aos companheiros do laboratório, por compartilhar conhecimento e pelos momentos de diversão.

À melhor professora da UFPR, a Lucy, pelo apoio e direção durante minha graduação.

A Don e Gol, meus companheiros caninos que pedem atenção enquanto estudo e leio artigos.

À minha avó, minhas tias, meus primos e todos da minha família que sempre estiveram lá.

A meus irmãos, Camila e Uri, que me fizeram rir durante os anos que torturei eles. Camila, espero que nossas jornadas acadêmicas possam trazer coisas boas. Uri, espero que você cresça e seja maior que eu.

À minha namorada Ana, que me aguentou, cuidou e acompanhou durante todo esse tempo e sempre esteve lá para uma pizza, cerveja, série e abraços.

À minha mãe, cuja mente insana sempre se manifestou na minha.

Ao meu pai, cuja força, caráter e sabedoria são o modelo do que quero ser.

Ao meu avô. Caminhamos muito juntos. E continuaremos, até Massachusetts.

*“A la realidad le gustan las simetrías y los leves anacronismos...”*

Jorge Luis Borges, *“El Sur”*, 1953

## RESUMO

O presente trabalho investigou o conteúdo de ácido ribonucleico (RNA) associado a vesículas extracelulares (EVs), chamado de evRNA, presentes no sangue periférico humano de pacientes diagnosticados com sepse. Por falta de técnicas diagnósticas eficazes e alta mortalidade, a sepse acaba por ser uma síndrome com impacto social e econômico elevado. Nesse sentido, um kit diagnóstico barato e específico beneficiaria a saúde da população, por facilitar o diagnóstico e consequentemente permitir um tratamento antecipado. A possibilidade de utilização de evRNA como um biomarcador que diferencie sepse de outras doenças seria uma alternativa interessante para o desenvolvimento do kit, sendo esse o objetivo deste trabalho. Para isso foram selecionados pacientes com diferentes graus de sepse, sendo comparados com um grupo controle de doadores de sangue saudáveis. Foi realizado o isolamento das EVs e subsequente isolamento do evRNA por meio de kits comerciais. As EVs foram caracterizadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão e rastreamento de nanopartículas. Uma biblioteca de cDNA, gerada a partir do evRNA isolado, foi sequenciada na plataforma Illumina® e os dados foram analisados utilizando a ferramenta de bioinformática CLC Genomics Workbench. A base de dados miRBase foi utilizada para alinhamento e identificação de microRNAs (miRNAs) nas amostras. Alguns miRNAs foram detectados nas amostras, porém não foi observada uma expressão diferencial entre o grupo de sepse e controles. A quantidade de sequências no grupo dos pacientes foi pronunciadamente menor que no grupo controle, possivelmente afetando as análises subsequentes. Um erro na concentração de cDNA sequenciada pode ter afetado os dados finais. Uma revisão dos protocolos utilizados e mais sequenciamentos devem ser realizados, visando obter dados mais representativos.

**Palavras-Chave:** vesículas extracelulares, RNA, diagnóstico, sepse

## ABSTRACT

This research thesis focuses on the RNA content associated with extracellular vesicles (EVs), called evRNA, contained in human peripheral blood obtained from patients diagnosed with sepsis. Due to lacking diagnostic techniques and high mortality, sepsis presents itself as an economic and societal burden. A cheap and specific diagnostic kit with high selectivity would benefit the population by reducing diagnosis time and therefore promoting lifesaving prompt treatment. The possibility of using evRNA as a biomarker that distinguishes sepsis from other diseases would be an interesting basis for the development of this kit, this being the projects' main objective. Patient plasma samples were acquired from individuals who had different degrees of sepsis severity, and compared to a healthy blood donor control group. The EVs and evRNA from these samples were isolated using commercial kits. EVs were analysed by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking. A cDNA library was generated from isolated evRNA and sequenced on the Illumina® platform. Raw data was analysed using the CLC genomics Workbench software. The microRNA (miRNA) database miRbase was used for alignment and miRNA identification in samples. Some miRNAs were detected on the samples, but no clear differential expression was observed between sepsis and control groups. The total number of sequences on the sepsis group was significantly lower than in controls, possibly affecting downstream statistical analysis. A concentration measurement error during cDNA preparation and loading onto the sequencing chip may have affected output data. Protocols for preparation of cDNA will be reviewed, and sequencing of more samples will be done to obtain more relevant data for the continuation of the project.

**Keywords:** extracellular vesicles, RNA, diagnostic, sepsis

## LISTA DE ABREVIATURAS

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
DAMPs – Padrões moleculares associados a danos  
DENV – Vírus da Dengue  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ESCRT – *Endosomal sorting complexes responsible for transport*  
EUA – Estados Unidos da América  
EV – Vesícula extracelular  
evRNA – RNA de vesícula extracelular  
HMGB1 – Proteína *High mobility group box-1*  
HSPs – *Heat shock proteins*  
ILAS – Instituto Latino Americano da Sepsis  
ISEV – Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares  
ILVs – Vesículas intraluminares  
LPS – Lipopolissacarídeo/Endotoxina  
LTs – Linfócitos T  
MP – Membrana plasmática celular  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a metilina  
MVEs – Corpos/endossomos multivesiculares  
NTA – Análise de rastreamento de nanopartículas  
PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos  
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões  
RNA – Ácido ribonucleico  
SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade  
SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica  
SOFA – *Sepsis-related organ failure assessment score*  
SSC – Campanha de Sobrevivência à Sepsis  
TEM – Microscopia eletrônica de transmissão  
USD\$ - Dólar americano  
UTI – Unidade de terapia intensiva  
cDNA – DNA complementar  
lncRNA – RNA longo não codificante

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – micro RNA

ncRNA – RNA não codificante

rRNA – RNA ribossômico



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
2.1 SEPSE .....	11
2.1.1 Definição.....	11
2.1.2 Epidemiologia .....	12
2.1.3 Fisiopatologia.....	15
2.1.4 Diagnóstico .....	19
2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	19
2.3.1 Definição, nomenclatura e biologia .....	19
2.3.2 RNA associado a EVs e Sepses.....	23
2.3.3 Sepses, EVs e RNA.....	25
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
5.1 AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM SEPSE .....	28
5.3 ISOLAMENTO DE EVs DO PLASMA.....	30
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) .....	30
5.5 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA) .....	30
5.6 ISOLAMENTO DO RNA CONTIDO NAS EVs .....	31
5.7 QUANTIFICAÇÃO DE RNA.....	31
5.8 CARACTERIZAÇÃO E QUALIDADE DO RNA.....	31
5.9 RNA-SEQ E PREPARO DE BIBLIOTECA DE cDNA.....	32
5.10 PROCESSAMENTO DE SEQUÊNCIAS, ALINHAMENTO E COMPARAÇÃO .....	32
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS E RNA .....	34
6.2 CARACTERIZAÇÃO DO evRNA.....	36
6.5 DADOS BRUTOS DO SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTO .....	37
6.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS .....	40
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>8 CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>46</b>
<b>7 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E FINANCIAMENTO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A sepse é uma síndrome que pode ser definida como uma disfunção de órgãos com elevado risco de morte, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção (SINGER et al., 2016). Dentro desta definição, a disfunção de órgãos é avaliada clinicamente, em conjunto com alguns biomarcadores. O estado mais grave desta síndrome, denominado choque séptico, é caracterizado por sepse em adição a uma falha circulatória aguda e hipotensão arterial, necessitando o uso de vasopressores (VINCENT; MIRA; ANTONELLI, 2016).

Esta síndrome é uma das causas principais de morte em pacientes hospitalizados (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014). Nos Estados Unidos da América (EUA) o custo aproximado relacionado à hospitalização de pacientes com sepse chegou a 23,7 bilhões de dólares, proporcional a 6,2% dos gastos hospitalares totais anuais em 2013 (TORIO; MOORE, 2016). No Brasil, é estimado que 12,9% de todas as mortes ocorridas durante o período de 2002 a 2010 tenham sido relacionadas à sepse (TANIGUCHI et al., 2014), uma situação alarmante e difícil de combater pelo sistema de saúde nacional já sobrecarregado. Uma fração populacional muito acometida por esta síndrome são os idosos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), devido a muitos fatores de risco que facilitam infecções e complicam a recuperação (NASA; JUNEJA; SINGH, 2012).

Apesar dos processos patológicos envolvidos na sepse serem complexos e incertos, muitos estudos elucidaram vias inflamatórias e imunes pelas quais a síndrome se estabelece (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). A sepse se origina quando a resolução de uma infecção não ocorre, levando o hospedeiro a um estado de inflamação sistêmica e imunodepressão. O desequilíbrio homeostático das defesas do indivíduo, junto com a progressão da infecção, torna a sepse uma situação clínica de extrema severidade (VAN DER POLL et al., 2017). O atraso na identificação do patógeno e início do tratamento adequado aumenta o risco de morte de forma alarmante, tornando essencial o estudo de novos biomarcadores e estratégias de tratamento (CHUN et al., 2015).

Dentre os diversos biomarcadores investigados para uso no diagnóstico, o ácido ribonucleico (RNA) circulante nos diversos fluídos corporais apresenta-se como uma opção interessante a ser explorada (ESSANDOH; FAN, 2014). Sua associação e compartimentalização a vesículas extracelulares (EVs), nas quais passa a ser

denominado RNA de vesícula extracelular (evRNA), indica que estas vesículas podem carregar informações importantes acerca do estado do paciente. Dessa forma, o evRNA pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico da sepse (TICLEA et al., 2017).

Apesar do interesse crescente, relativamente poucos estudos exploram a utilização do evRNA como biomarcador na sepse (TERRASINI; LIONETTI, 2017), sendo este um tópico de estudos ainda na sua “infância”. Nesse sentido, investigações acerca da possível aplicação de evRNA para diagnóstico da sepse possuem mérito científico e social.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SEPSE

#### 2.1.1 Definição

A definição “clássica” da sepse, estabelecida em 1991 (BONE et al., 1992), a denomina como uma Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada a uma infecção. Dentro dessa definição se encontra a subcategoria de sepse severa, caracterizada como sepse aliada à disfunção de órgãos. O choque séptico, superior em termos de severidade, é caracterizado pelos sintomas comuns da sepse em conjunto com hipotensão arterial e falha circulatória fazendo-se necessário o uso de vasopressores. Esta definição permaneceu relativamente inalterada até ser revista em 2001 (LEVY et al., 2003). Com o crescente estudo dos processos biológicos ocorrentes nesta síndrome (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008), junto a inconsistências entre as definições de sepse e observações clínicas (VINCENT et al., 2013), criou-se a necessidade de uma atualização dos seus conceitos básicos.

Entre os anos de 2014 e 2015 um grupo de especialistas se reuniram organizados pela *European Society of Intensive Care Medicine* e a *Society of Critical Care Medicine* (SINGER et al., 2016). O objetivo das reuniões realizadas foi avaliar e atualizar, de forma ampla, as definições e recomendações acerca de sepse e choque séptico. O resultado gerou novas definições e ampliou o espectro do que entendemos como “sepse”, que se distingue pela não-homeostase da resposta do hospedeiro frente à uma infecção (SINGER et al., 2016).

O novo consenso entende sepse como sendo uma disfunção de órgãos com elevado risco de morte, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. O termo “sepse severa” deixa de existir, pois refere-se à sepse em conjunto com disfunção orgânica, o que está incluso na definição atual como sendo parte da sepse. Os termos “síndrome séptica” e “septicemia” não são contemplados, por redundância: a sepse já é uma síndrome e a sua definição já inclui a presença de uma infecção. O termo choque séptico refere-se a um subtipo de sepse onde as anormalidades celulares e circulatórias são suficientemente sérias para provocar aumento significativo de mortalidade (SINGER et al., 2016). Este projeto de pesquisa

faz uso das definições atualizadas de sepse e choque séptico, porém entende-se que pesquisas realizadas anteriormente à atualização não sigam essa nova classificação.

### 2.1.2 Epidemiologia

Dentre as causas de morte em pacientes hospitalizados, a sepse é uma das mais prevalentes (DEUTSCHMAN; TRACEY, 2014). Somando à mortalidade excessiva, o custo de hospitalização e tratamento de pacientes com sepse é elevado (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). Pela falta de dados epidemiológicos foram desenvolvidos vários estudos na tentativa de coletar informações acerca da incidência, taxa de mortalidade e os grupos populacionais mais afetados (ALBERTI et al., 2004; MARTIN, 2012; NASA; JUNEJA; SINGH, 2012).

Uma iniciativa internacional notável foi a organização da *Surviving Sepsis Campaign* (Campanha de Sobrevivência à Sepse, SSC), onde foram desenvolvidas diretrizes para instruir os profissionais de saúde no tratamento correto da sepse e choque séptico (LEVY et al., 2010). A campanha foi realizada na Europa, América do Norte e América do Sul. No Brasil o projeto foi implantado pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), obtendo resultados animadores, porém ainda enfrentado obstáculos na integração das diretrizes e coleta de dados (TELES et al., 2008).

Estudos epidemiológicos sobre sepse foram realizados nos EUA, e diferenças na incidência são reportadas dependendo do tipo de UTI (MARTIN, 2012). Um estudo tipo coorte realizado em 2001 mostrou uma taxa de 3 casos para cada 1000 indivíduos nos EUA, com mortalidade de 28,6% e custo médio por paciente de USD\$ 22 mil (ANGUS et al., 2001). Em 2011 uma análise do custo de hospitalização de pacientes com sepse na rede hospitalar dos EUA obteve um valor estimado de USD\$ 20,3 bilhões, representando 5,2% dos gastos hospitalares anuais (TORIO; ANDREWS, 2013). O estudo foi repetido em 2013, onde se viu um custo total de USD\$ 23,7 bilhões, agora representando 6,2% dos gastos hospitalares anuais (TORIO; MOORE, 2016).

No Brasil alguns estudos prospectivos ou retrospectivos foram realizados na tentativa de agregar dados acerca da incidência e mortalidade da sepse. Os resultados de destaque estão compilados na tabela abaixo (Tabela 1).

TABELA 1: ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS BRASILEIROS IMPORTANTES SOBRE SEPSE NO BRASIL

ESTUDO	ANO	TIPO DE ESTUDO	DADOS	PREVALÊNCIA	MORTALIDADE	REF.
BASES	2004	Coorte/Prospectivo	1.383 pacientes em 5 UTIs	30,5/100 pacientes em UTI	47,3% em sepse severa	(SILVA et al., 2004)
PROGRESS	2005	Coorte/Prospectivo	982 pacientes em 7 UTIs	N.A.	56% em pacientes sépticos	(TELES et al., 2008)
Sepse Brasil	2006	Coorte/Prospectivo	3.128 pacientes em 75 UTIs	16,7% das admissões na UTI	46,6% em pacientes sépticos	(SALES JÚNIOR et al., 2006)
COSTS	2008	Coorte/Prospectivo	524 pacientes em 21 UTIs	N.A.	43,8% em pacientes sépticos	(SOGAYAR et al., 2008)
Relatório ILAS	2015	Retrospectivo	32.694 pacientes em 119 hospitais e centros	N.A.	42,2% em pacientes sépticos	(ILAS, 2015)
Análise do SIM	2014	Retrospectivo	Análise do Sistema de Informações de Mortalidade	N.A.	12,9% das mortes no Brasil	(TANIGUCHI et al., 2014)
SPREAD	2017	Prospectivo	2.632 pacientes em 227 UTIs	290 casos /100.000 adultos na população	233.409 mortes hospitalares por ano	(MACHADO; CAVALCANTI; BOZZA, 2017)

FONTE: O autor (2017)

O estudo *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES), o primeiro grande estudo nacional sobre o tema, foi realizado em 5 hospitais privados e públicos no sul e sudeste, observou 1.383 pacientes internados em UTIs até o 28º dia de internação. Foi obtida uma taxa de ocorrência de sepse “severa” de 27,3% e choque séptico de 23%, com taxas de mortalidade de 47,3% e 52,2%, respectivamente (SILVA et al., 2004).

O estudo Sepse Brasil acompanhou 3.128 pacientes em 65 hospitais espalhados por todas as regiões do Brasil. O acompanhamento foi até o 28º dia de internação em UTI, mostrando uma taxa de mortalidade de 46,6% para pacientes com sepse (SALES JÚNIOR et al., 2006). O estudo PROGRESS foi uma iniciativa internacional, onde no Brasil foram analisados 982 pacientes internados em UTI. A taxa de mortalidade observada foi maior no Brasil (56%) do que nos outros países categorizados como desenvolvidos (30%) e em desenvolvimento (45%) (TELES et al., 2008).

O estudo COSTS, realizado em 21 UTIs, observou uma mortalidade média de 44,3% relacionada a sepse. O custo global médio, referente a estadia do paciente no hospital e os custos associados a tratamento, foi USD\$ 10.595 (SOGAYAR et al., 2008).

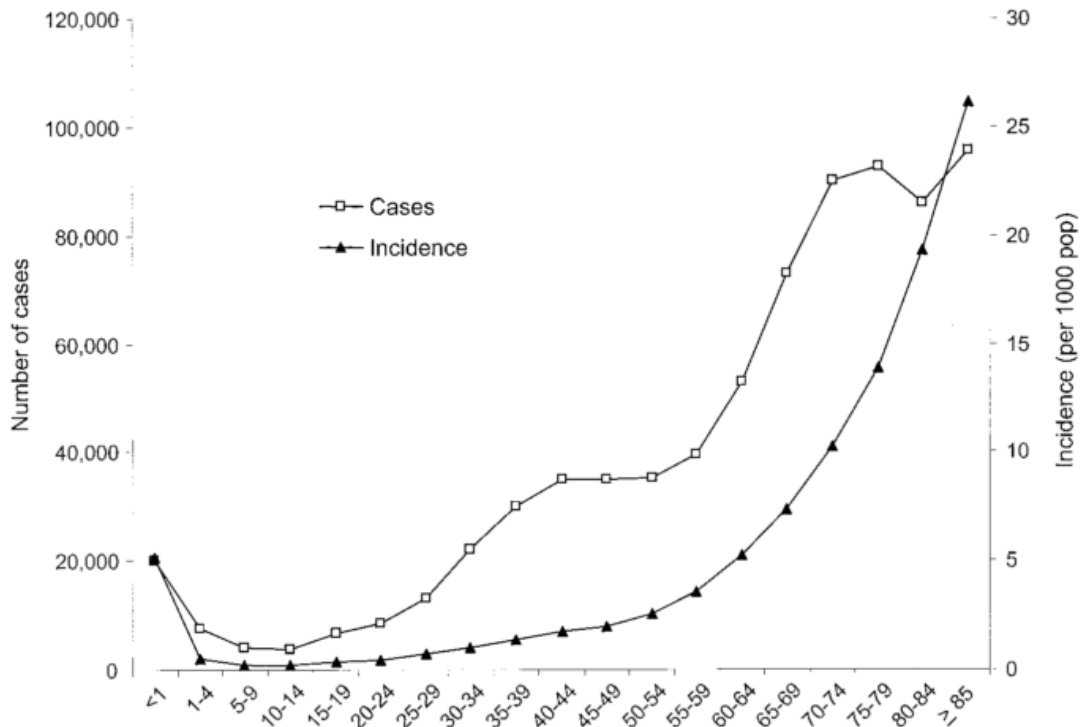
Recentemente, três estudos atualizaram os dados epidemiológicos sobre sepse no Brasil. Uma análise retrospectiva do Sistema de Informações de Mortalidade (SIM)

observou que no período entre 2002 e 2010 aproximadamente 12,9% de todas as mortes registradas no Brasil foram relacionadas à sepse, sendo que a taxa de mortalidade dessa doença aumentou durante o período estudado em 6,7% (TANIGUCHI et al., 2014). O estudo SPREAD (MACHADO; CAVALCANTI; BOZZA, 2017) estima mais de 233 mil mortes hospitalares por ano relacionadas à sepse, e o mais recente relatório nacional da ILAS (de 2005 a 2015) estima a mortalidade de pacientes sépticos em torno de 42,2%.

Existem diferenças reportadas na prevalência e taxas de mortalidade relacionada a sepse. Isso é observado nos estudos conduzidos no Brasil (TELES et al., 2008) e internacionais (MARTIN, 2012). As diferenças podem estar relacionadas a vários fatores. A diversidade de sistemas de saúde e as metodologias empregadas para o tratamento de pacientes sépticos pode influenciar nas taxas de mortalidade, como no caso de disponibilidade de UTIs, tempo até o tratamento e qualidade do tratamento empregado (MURTHY; WUNSCH, 2012).

A mortalidade associada à sepse se concentra principalmente em dois grupos populacionais: neonatos e idosos. Um estudo tipo coorte realizado em 2001 nos EUA obteve dados acerca dos números de casos, incidência e mortalidade em relação aos grupos etários populacionais. Observamos na Figura 1 que a incidência é alta nos menores de um ano de vida (5,3/1000 de população), reduz drasticamente durante a juventude e começa a crescer de forma lenta na vida adulta. Entre as idades 60-64 a incidência já é relativamente grande (5,3/1000 de população) e nos idosos com idade maior ou igual a 85 anos a incidência sobe em um pico (26,2/1000 da população) (ANGUS et al., 2001).

FIGURA 1: GRÁFICO DE CASOS E INCIDÊNCIA DE SEPSE NOS EUA POR FAIXA ETÁRIA.



FONTE: ANGUS et al. (2001)

NOTA: No eixo Y, *Number of cases* se refere a número de casos e *Incidence (per 1000 pop)* se refere a incidência. O eixo X corresponde à faixa de idade dos pacientes com sepse.

### 2.1.3 Fisiopatologia

A sepse é uma síndrome complexa e dinâmica, cuja “arquitetura” é produto de vários sistemas biológicos interligados (ALVERDY; KREZALEK, 2016; BOSMANN; WARD, 2012; LUAN et al., 2014; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; VAN DER POLL et al., 2017). Estudos elucidaram as bases etiológicas e os principais mecanismos pelos quais a sepse se desenvolve, porém o conhecimento ainda é incompleto. A sepse se origina quando uma infecção, na maior parte das vezes de origem bacteriana, não é adequadamente resolvida pelo hospedeiro e provoca um distúrbio na organização celular e metabólica. O prolongamento desse estado gera uma reprogramação celular no hospedeiro, culminando em uma resposta inflamatória excessiva e imunossupressão (VAN DER POLL et al., 2017). Apesar de superficialmente aparentar ser uma doença com etiologia definida e tratamento específico, nenhuma dessas suposições está correta, e a ineficácia do tratamento comprova sua complexidade. Um foco excessivo no tratamento da hiperinflamação foi a base para o desenvolvimento de drogas e terapias que não obtiveram resultados



clínicos satisfatórios (COHEN et al., 2015). Os novos conceitos sobre sepse (SINGER et al., 2016) vão além da dicotomia entre hiperinflamação e imunossupressão, entendendo que a fisiopatologia envolve a disfunção de diversos sistemas interligados. Os seus principais conceitos, a infecção e a resposta do hospedeiro, são revisados a seguir.

Nem toda infecção resulta em sepse, porém todo caso de sepse tem como origem uma infecção. Os principais tipos de microrganismos envolvidos em casos de sepse são as bactérias Gram-negativas, sendo encontradas em 62,2% dos casos. Bactérias Gram-positivas estão em segundo lugar (46,8%), com o número de casos aumentando. Fungos, parasitas e vírus representam um menor número de casos. Bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Acinetobacter* são as Gram-negativas mais encontradas. O *Staphylococcus aureus* e sua variante resistente a meticilina (MRSA) são as bactérias mais identificadas em casos de sepse, estando presentes em 20,5% dos casos. Dentre os fungos, o gênero mais representativo na sepse é *Candida*. Infecções por bactérias Gram-negativas estão associadas a maior mortalidade do que Gram-positivas. A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* possui a maior taxa de mortalidade em casos de sepse. Vale ressaltar que a maior parte dos estudos epidemiológicos foram realizados em países desenvolvidos (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). Uma observação importante é a ocorrência de sepse por mais de um organismo infectante, podendo originar-se em infecções nosocomiais e/ou oportunistas. A sepse polimicrobiana, onde duas ou mais espécies participam da infecção, tem maiores índices de mortalidade comparado à sepse com apenas um patógeno (ABED et al., 2010).

A origem da infecção que desencadeia a sepse pode ser variada. Em indivíduos cujo sistema imune está comprometido, uma bacteremia relativamente simples de se eliminar pode se expandir ao ponto de provocar a sepse, como observado em idosos. O sistema respiratório e genito-urinário são portas de entrada comuns para infecções, e representam uma grande parcela dos sítios de infecção iniciais na sepse (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). A ocorrência de traumas ou lesões (por exemplo queimaduras ou cortes) levam o indivíduo a perder o epitélio, a primeira linha de defesa essencial entre microrganismos e os tecidos internos estéreis do hospedeiro (NICHOLSON, 2016). Hospitalizações também podem contribuir para a infecção, pois a transmissão pode ocorrer por cateteres e contato humano. A ocorrência de sepse

após procedimentos cirúrgicos, em especial cirurgias invasivas e prolongadas, é elevada. Apesar de cirurgias invasivas serem realizadas em ambientes limpos, não há impedimento de microrganismos ali presentes aproveitarem a exposição dos tecidos profundos e a debilidade fisiológica do paciente para a infecção (KREZALEK et al., 2016). Ademais, diversos fatores associados ao risco de desenvolvimento da sepse (WANG et al., 2012) como doença crônica renal, pulmonar, diabetes e episódios cardíacos/circulatórios são razões frequentes para hospitalizações, podendo também contribuir para a origem da infecção.

Um indivíduo com o sistema imune sem comprometimento, integridade epitelial e nenhuma doença crônica pode também desenvolver sepse, caso seja infectado por um microrganismo com alta virulência. Um fator importante relacionado a virulência é o fenômeno crescente de resistência antimicrobiana. A alta disseminação de microrganismos multirresistentes a antibióticos gera imensa dificuldade no tratamento (CARLET; BEN ALI; CHALFINE, 2004; SULLIVAN et al., 2015), pois inviabiliza a terapia com antimicrobianos eficazes e acaba prolongando a infecção.

A resposta do hospedeiro a uma infecção inicia-se com a detecção do microrganismo invasor por meio do sistema imune inato (NICHOLSON, 2016). Moléculas características de patógenos, como o Lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de Gram-negativas, faz parte de um grupo diferenciado de compostos chamado Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (ANAS et al., 2010). Adicionalmente, moléculas sinalizadoras de danos celulares (DAMPs) também são liberadas pelo estresse em que as células se encontram (ANAS et al., 2010; KANG et al., 2015).

Estes PAMPs e DAMPs são a chave para a elaboração da resposta imune inicial, pois são reconhecidos por meio de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) presentes em células do sistema imune inato. A ativação de PRRs em neutrófilos e macrófagos promove a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, componentes ativadores do sistema complemento, componentes bactericidas e espécies reativas de oxigênio. O processo é amplificado por meio da migração de novas células imunes e a produção de segundos mensageiros que prolongam o estado pró-inflamatório (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

Os principais tipos de PRRs são os *Toll-like receptors* (TLRs), sendo o TLR4 o melhor caracterizado até agora. O fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B atua *downstream* (estimulando a transcrição) na via de sinalização, sendo acionado após a ativação do TLR4. Este fator estimula a transcrição de proteínas com papel pró-inflamatório, e é um dos principais coordenadores da resposta inflamatória (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016).

A indução da inflamação localizada e a resposta imune são elementos necessários para eliminar o microrganismo invasor, pois as células imunes que migram para o local efetuam a destruição do patógeno e “limpeza” do tecido. A produção de componentes bactericidas e espécies reativas de oxigênio contribuem nesse processo. Caso não ocorra a resolução da infecção, o processo se intensifica com o aumento da inflamação e migração de mais células imunes. O ambiente oxidativo danifica os tecidos do hospedeiro (BOSMANN; WARD, 2012). Os danos e morte celular elevam a concentração de DAMPs, e a replicação do microrganismo gera aumento de PAMPs. Os dois processos alimentam esse ciclo como um *feedback* positivo (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008), gerando mais citocinas pró-inflamatórias. A produção excessiva e desregulada de citocinas corresponde ao início do estágio hiperinflamatório observado na sepse, chamado de tormenta de citocinas (TISONCIK et al., 2012). Aqui, a inflamação que antes se restringia ao local de infecção inicial se torna uma inflamação sistêmica, danificando outros tecidos do hospedeiro (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

O debate entre a contribuição da inflamação, o sistema imune inato e o adaptativo na atual mortalidade da sepse é um dos tópicos mais relevantes e pouco entendidos até agora. O mecanismo da inativação de células imunes do sistema adaptativo ainda não é completamente entendido, porém existem evidências de como ela pode ocorrer (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013). Foi observada a ocorrência de apoptose em massa de células efetoras como linfócitos, gerando linfocitopenia. A resposta Th1 celular de linfócitos T (LTs), relacionada com a fase inicial da sepse, é desviada para uma resposta do tipo Th2 na fase tardia. A resposta Th2 está relacionada com imunossupressão na sepse. O aumento de LTs do subtipo regulatório em pacientes com sepse foi associado a pior prognóstico em pacientes, provavelmente pela indução de um estado anérgico (inativo) em linfócitos efetores (VENET et al., 2009). Várias outras células do sistema imune, como macrófagos,

células dendríticas, neutrófilos e células B, sofrem reprogramação que levam à queda de função ou indução de um estado pró-inflamatório excessivo prejudicial. (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013). Os estudos apontam para um papel importante da reprogramação dos subtipos celulares imunes no desenvolvimento e resolução da sepse, entretanto a atribuição direta com a mortalidade elevada desta síndrome ainda não é comprovada (ANGUS; OPAL, 2016).

#### 2.1.4 Diagnóstico

Os critérios clínicos utilizados para o diagnóstico da sepse, de acordo com o novo consenso, se baseiam no uso do indicador de disfunção de órgãos chamado *sepsis-related organ failure assessment (SOFA)* (SINGER et al., 2016). O indicador SOFA é utilizado como ferramenta para avaliar o paciente, e resulta em um escore que, sendo maior ou igual a 2, indica a possibilidade de sepse. No SOFA são avaliados: ventilação (por pressão arterial de O<sub>2</sub>), coagulação (por número de plaquetas), função hepática (por bilirrubina), sistema cardiovascular (por pressão arterial média e níveis de dopamina, noradrenalina e adrenalina), sistema nervoso central (pela escala de coma de Glasgow), e o sistema renal pela dosagem de creatinina (SINGER et al., 2016).

### 2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES

#### 2.3.1 Definição, nomenclatura e biologia

Um mecanismo de comunicação e transporte celular que tem tido sua importância ressaltada nos últimos anos é o transporte de moléculas por meio de vesículas extracelulares (EVs) (THÉRY; CURIE; INSERM, 2011). Nas últimas décadas foi observado que virtualmente todos os tipos celulares dos três domínios de organismos (WOESE; FOX, 1977) são capazes de secretar partículas compostas de membrana biológica e utilizar esse sistema elaborado como ferramenta de comunicação entre membros da mesma espécie e interespecie (BROWN et al., 2015; DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012; MANNING; KUEHN, 2013; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Dentre as vantagens desse mecanismo pode-se pensar a respeito da proteção que o conteúdo associado à vesícula possui. As moléculas liberadas livremente por secreção solúvel estão sujeitas à degradação enzimática por enzimas presentes no meio extracelular, enquanto aquelas encapsuladas na vesícula possuem maior resistência a enzimas (MANNING; KUEHN, 2013).

Outra característica vantajosa é a compartimentalização de compostos. Na secreção solúvel um composto liberado constantemente tende a estar presente em altas concentrações próximo à origem de secreção, porém encontra-se baixas concentrações quando em locais distantes. Isso ocorre pela dissipação e degradação do composto no ambiente. Em vesículas, uma alta concentração do composto pode ser transportada. Além disso, dois ou mais compostos que atuam em conjunto podem ser transportados pela vesícula, desta forma impedindo que se dissipem e não cheguem de forma associada ao destino.

As vantagens descritas acima, assim como outras específicas para certas espécies, geram uma maior funcionalidade das EVs aos organismos que as produzem. Bactérias Gram-negativas, por exemplo, podem usufruir de vesículas para transportar fatores de virulência para outros organismos, contribuindo para sua patogenicidade (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). Fungos exportam diversos tipos de RNA com papéis fisiológicos por meio de vesículas (PERES DA SILVA et al., 2015).

Nos eucariotos, sob foco da saúde humana, as EVs estão envolvidas em muitos processos fisiológicos e patológicos: evolução do ciclo viral infeccioso nas células (CHAHAR; BAO; CASOLA, 2015), interações relacionadas a aterosclerose entre o endotélio e células imunes (CHISTIYAKOV; OREKHOV; BOBRYSHV, 2015), estimulando processo de angiogênese (TODOROVA et al., 2017), doenças reumáticas (COSENZA et al., 2017), diabetes (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2017), doenças renais (ZHANG et al., 2016) e câncer (RASHED et al., 2017).

O repertório de EVs secretadas pelas células humanas é grande. Algumas já caracterizadas são as microvesículas, exossomos, ectossomos, oncossomos e corpos apoptóticos. A nomenclatura e classificação é debatida, pois existe sobreposição de características entre os tipos de vesículas (VAN DER POL et al., 2016).

Microvesículas se originam da protuberância direta da membrana plasmática celular, possuindo tamanho variado entre 100 nm até 1 µm (RAPOSO;

STOORVOGEL, 2013). Exossomos se originam a partir de corpos multivesiculares (MVEs) redirecionados para a membrana plasmática (MP), onde ocorre a fusão entre a MP e MVE e consequente liberação dos exossomos para o espaço extracelular (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Possuem tamanho aproximado entre 40-150 nm (KIM et al., 2017). Os corpos apoptóticos são liberados por células em apoptose, possuindo tamanho mais variado de 50 nm até 2 µm (ZABOROWSKI et al., 2015).

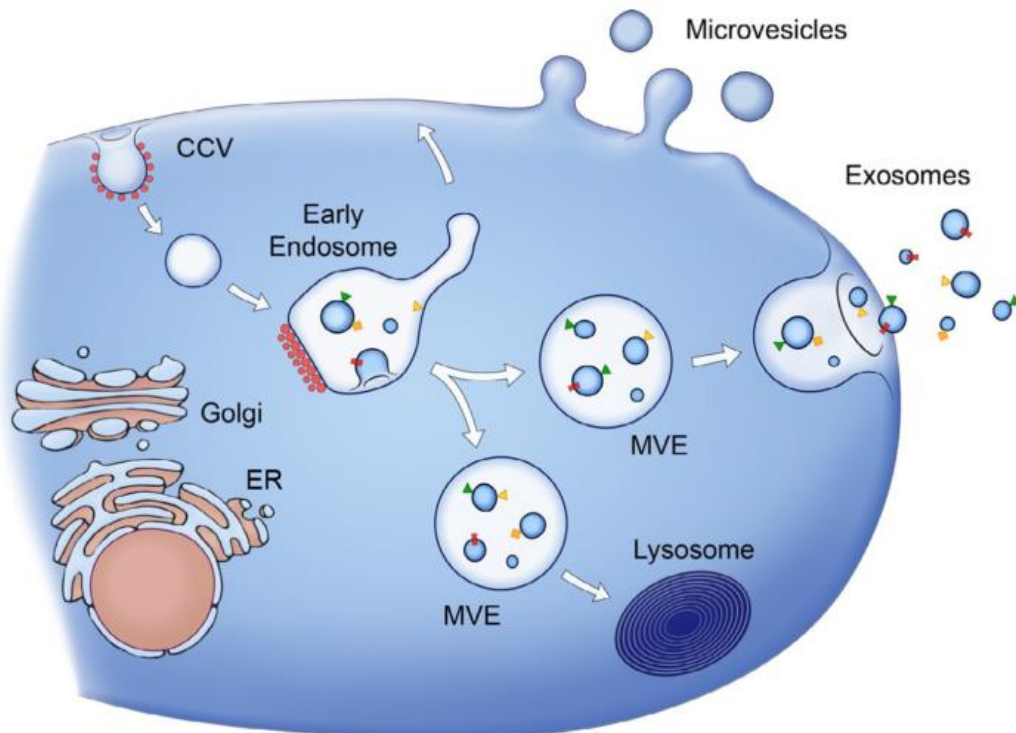
A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) reconhece o termo vesícula extracelular (EV) como englobando todas as definições de forma mais simples (VAN DER POL et al., 2016). Por este projeto explorar os exossomos e microvesículas presentes no plasma, com tamanho aproximado de 50 nm a 1 µm, será utilizado o termo geral EV para se referir coletivamente a essas vesículas.

Dentre as vias de produção desta secreção temos a via por MVEs, como no caso de exossomos, e a via de produção direta pela MP, como no caso das microvesículas (Figura 2).

Os MVEs são produzidos a partir de um endossomo primordial/jovem, que se desenvolve em um endossomo maduro. Neste endossomo são produzidas vesículas intraluminares (ILVs), um processo mediado por proteínas do denominado *endosomal sorting complexes responsible for transport* (ESCRT). A inserção de ILVs gera os chamados MVEs, que podem ser direcionados para degradação lisossomal ou fusão com a membrana plasmática e consequente liberação de exossomos (COCUCCI; MELDOLESI, 2015).

A presença de proteínas associadas a vias de produção e transporte endossomal, como RabGTPase e proteínas do complexo SNARE, evidenciam que a formação dos exossomos é possivelmente regulada por vias de transporte endossomal. O complexo ESCRT participa da produção de exossomos, porém vias de produção não-dependentes de ESCRT existem (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Apesar disso, o sistema ESCRT também participa da produção de microvesículas e outros tipos de EVs, portanto não são específicas para os exossomos.

FIGURA 2: FORMAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES



FONTE: RAPOSO; STOOVVOGEL (2013)

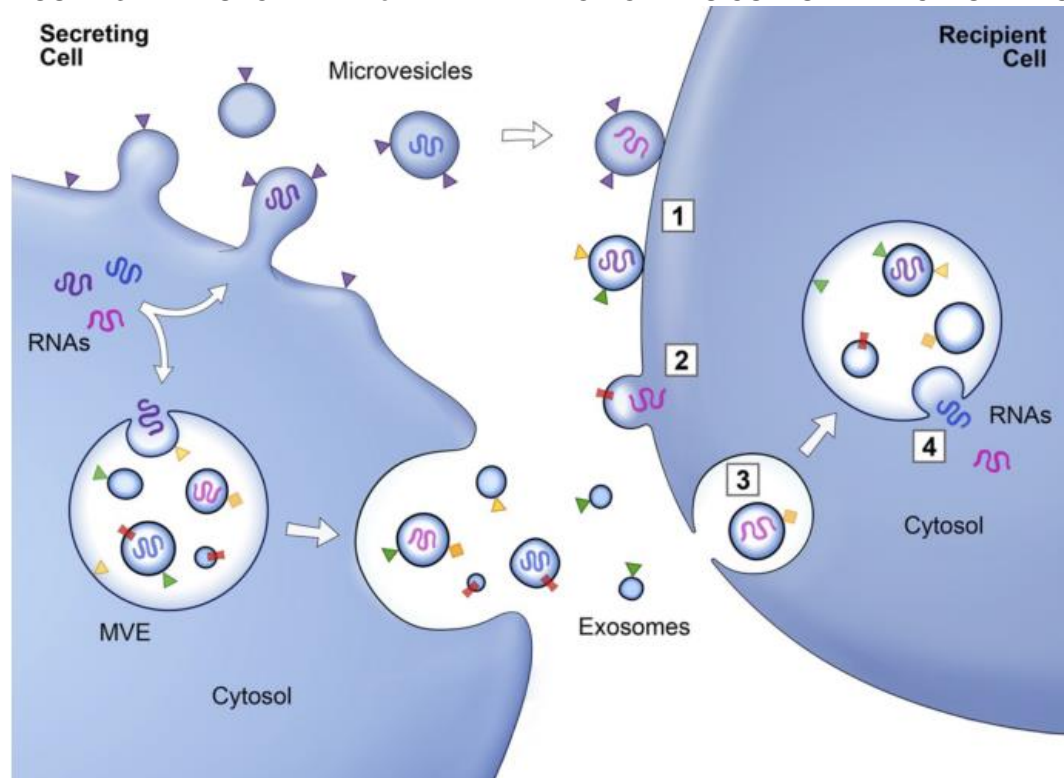
NOTA: Os exossomos são originados a partir de corpos multivesiculares. As microvesículas são originadas da protuberância e separação de uma parte da membrana plasmática. LEGENDA: ER-Retículo Endoplasmático; MVE-Corpo multivesicular; *Lysosome*-Lisossomo; CCV-Vesículas cobertas de clatrina; *Early endosome*-Endossomo primordial/jovem.

O conteúdo transportado por EVs varia com o tipo celular que a produz, assim como o ambiente em que a célula se encontra. Na última década foi descoberta a associação de moléculas de RNA à EVs e seu transporte para outras células, desencadeando respostas intracelulares variadas (KIM et al., 2017; VALADI et al., 2007). Este subtipo de RNA extracelular recebe o nome de evRNA (*extracellular vesicle RNA*), sendo o foco deste projeto (HILL et al., 2013). Adicionalmente foi observado o transporte de DNA (CAI et al., 2013) e uma grande variedade de proteínas (ZABOROWSKI et al., 2015) por meio de vesículas.

A interação entre as EVs e as células recipientes é chave para a comunicação celular a longa distância. Após serem secretadas, as EVs se aderem à membrana da célula recipiente por meio de receptores presentes na membrana da vesícula e na MP da célula recipiente (Figura 3). Um dos mecanismos de internalização do conteúdo da EV é via a fusão da sua membrana com a MP. Outro mecanismo é a endocitose da EV, e uma vez no interior da célula recipiente pode ser redirecionada à degradação

lisossomal ou liberar seu conteúdo diretamente no citoplasma (RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013).

FIGURA 3: TRANSPORTE DE evRNA MEDIADO POR VESÍCULAS EXTRACELULARES



FONTE: RAPOSO; STOOORVOGEL (2013)

NOTA: Após adesão da EV à MP (1) pode ocorrer a fusão de membranas entre EV e MP (2), ou endocitose da EV (3) e liberação do conteúdo no citoplasma (4). LEGENDA: MVE-Corpo multivesicular; *Secreting cell*-Célula secretora de EVs; *Recipient cell*-Célula receptora das EVs.

Compreendendo a origem e composição das EVs, pode-se afirmar que são um mecanismo de secreção versátil e com composição bastante diversificada. A captação de vesículas pelas células a qual foram destinadas pode modular vias de sinalização intracelular, justamente porque algumas biomoléculas associadas possuem essa capacidade. O estudo de evRNA, e suas funções, exploram esse processo.

### 2.3.2 RNA associado a EVs e Sepse

Os subtipos de evRNAs secretados são diversificados, sendo encontrados: RNAs mensageiros (mRNAs) intactos e fragmentados, microRNAs (miRNAs), RNAs longos não-codificantes (lncRNAs), RNA ribossomal (rRNAs), entre outros tipos. O conteúdo de evRNA observado é dependente do tipo celular que produziu a vesícula, assim como da metodologia utilizada para isolar a fração de RNA (YÁÑEZ-MÓ et al.,



2015). Por ser distinto de outras frações de RNA celular (p.ex. RNA nuclear, RNA citoplasmático) acredita-se que esse conteúdo seja produto de uma regulação delicada de internalização e secreção de RNAs específicos, e não meramente um processo estocástico que resulta em vazamento de RNAs citoplasmáticos nas EVs (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

Os miRNAs são RNAs regulatórios pequenos de aproximadamente 21 nucleotídeos. Sua biogênese é intrincada (HA; KIM, 2014), sua transcrição é dependente da RNAP II e processamento por RNAases tipo III. Estão associados à regulação pós-transcricional (BAEK et al., 2008) e servem como ferramenta diagnóstica para certas doenças (GUSTAFSON; TYRYSHKIN; RENWICK, 2016). Os miRNAs compõem uma fração dos evRNAs observados.

Potencialmente, todos os fluidos humanos, incluindo plasma, soro, urina, lágrimas, líquido amniótico e saliva, possuem miRNAs detectáveis (FOSTER et al., 2016). Cada tecido e fluido possui um espectro relativo de miRNAs (WEBER et al., 2010), sendo que em processos de patogênese pode ocorrer alterações nas concentrações de miRNAs específicos. Quando detectado, a mudança de espectro pode ser útil como indicador clínico da patogenia em questão, ou seja, como um biomarcador (WANG et al., 2015).

Existem vários miRNAs em EVs já associados ao câncer, provindos de vários tecidos, alguns sendo utilizados atualmente como ferramenta de diagnóstico (VERMA et al., 2015). Similarmente, diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia e outras síndromes metabólicas também geram alterações de perfil de miRNAs associados a EVs (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2017). Alterações endometriais que levam a modificações na receptividade e implantação do embrião, assim como doenças do endométrio, possuem miRNAs candidatos para biomarcadores (FOSTER et al., 2016). O potencial biomarcador das EVs para o câncer de próstata é grande, e os miRNAs miR-375 e miR-141 associados a EVs já foram fortemente correlacionados com esta doença (FOSTER et al., 2016). Muitas pesquisas estão sendo realizadas para descobrir o potencial diagnóstico de miRNAs em doenças renais. Foram observadas alterações do perfil de miRNAs em pacientes com doença renal crônica, nefropatia obstrutiva e outras doenças associadas a danos renais (ZHANG et al., 2016).

### 2.3.3 Sepses, EVs e RNA

O envolvimento de RNAs como reguladores na sepse está sob estudo. O miR-155 possui expressão aumentada em macrófagos após estímulo por LPS, tendo influências diretas nas vias pró-inflamatórias. MiR-146a e miR-23b também foram identificados como possuindo ações regulatórias associadas à repressão de moléculas chave na resposta imune (BENZ et al., 2016). Vários outros miRNAs estão envolvidos na função de linfócitos, com ações primordialmente intracelulares. A possibilidade de ação parácrina em outras células na proximidade pode influenciar em como a resposta imune adaptativa se desenvolve em infecções (DE CANDIA et al., 2014).

Sobre o potencial diagnóstico do evRNA na sepse, existem descobertas interessantes. Alguns estudos relatam expressão diferencial de miRNAs no plasma ou soro entre pacientes com sepse e controles (Tabela 2).

TABELA 2: OS miRNAs ASSOCIADOS COM A SEPSE E CHOQUE SÉPTICO

miRNA	Associação com a sepse	Indicador	Referência
miR-150	Diminuído em vários estudos. Alta predição de mortalidade.	Prognóstico	(MA et al., 2013),(PUSKARICH et al., 2015), (RODERBURG et al., 2013)
miR-25	Diminuído na sepse. Possível papel diferenciador contra SIRS.	Diagnóstico	(YAO et al., 2015)
miR-16	Em conjunto com outros miRs. Elevados em EVs de modelo CLP	Diagnóstico	(WANG et al., 2012a),(WANG et al., 2012b)
miR-133a	Elevado em amostras de plasma.	Prognóstico	(TACKE et al., 2014)
miR-125b-5p	Elevado em EVs no plasma.	Diagnóstico	(REITHMAIR et al., 2017)
miR-34a	Elevado em amostras de plasma, indicando choque séptico.	Prognóstico	(GOODWIN et al., 2015)
miR-15a	Diminuído em amostras de plasma.	Prognóstico	(GOODWIN et al., 2015)
miR-27a	Diminuído em amostras de plasma.	Prognóstico	(GOODWIN et al., 2015)
miR-143	Aumentado em amostras de plasma.	Diagnóstico	(HAN et al., 2016)
miR-574-5p	Elevado em pacientes com sepse, associado com severidade.	Prognóstico	(WANG et al., 2012d)
miR-483-5p	Elevado papel preditivo de sepse em associação com outros miRs	Diagnóstico	(WANG et al., 2012b)

FONTE: O autor (2017)

Os níveis de miR-133a plasmático encontram-se elevados em associação com pacientes sépticos (TACKE et al., 2014). Os níveis plasmáticos de miR-150 encontram-se baixos em pacientes críticos, e possuem correlação com mortalidade. Apesar de apresentar um potencial prognóstico, não diferencia sepse de outras doenças (RODERBURG et al., 2013).

Existem evidências de diferenciação entre SIRS e sepse por meio de miRNAs, sendo isso um resultado estimulante para os casos de diagnóstico com hemocultura negativa (CASERTA et al., 2016). Uma análise do perfil de miRNAs em uma fração

isolada de EVs desvendou o miR-125b-5p como estando aumentando apenas na fração de EVs em indivíduos com sepse. Outros miRNAs foram identificados com expressão diferencial nas frações de soro e de células do sangue (REITHMAIR et al., 2017).

Em resumo, vários miRNAs sofrem alteração de expressão durante a sepse. Estudos que analisam o conteúdo de evRNA (plasmático ou do soro) de pacientes sépticos podem elucidar miRNAs passíveis de se converterem em biomarcadores clínicos (BENZ et al., 2016). Vale notar a necessidade de se utilizar mais do que um único miRNA para o diagnóstico molecular, dado que o uso combinatório de múltiplos miRNAs pode trazer melhor acurácia e especificidade (CASERTA et al., 2016).

Os miRNAs selecionados poderiam ser detectados em laboratório de forma rápida, assim auxiliando no diagnóstico clínico quando o tempo é valioso. Dentre as vantagens oferecidas por tal método, podemos citar a rapidez na análise e a não-dependência de hemocultura positiva. A implementação de análise de miRNAs específicos para sepse poderia melhor situar os profissionais de saúde que formulam a estratégia para tratar o paciente.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o conteúdo de evRNA isolado de vesículas do plasma de pacientes com sepse, na tentativa de identificar moléculas de miRNA com possível valor diagnóstico.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de EVs no plasma: isolamento das EVs presente no plasma de pacientes com sepse; com dengue e controles. Análise das EVs por microscopia.

- Isolamento do evRNA contido nas EVs: caracterização do tamanho das moléculas e concentração do evRNA isolado das EVs, especificamente visando isolar a fração de miRNAs.

- Sequenciamento do evRNA e montagem de sequências: alinhamento das sequências de evRNA obtidas com banco de dados de miRNA.

- Comparação entre grupos e análise estatística: análise de abundância de certos miRNA entre os grupos para inferir miRNA em concentrações distintas nos indivíduos com sepse.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM SEPSE

Amostras de sangue de pacientes com sepse foram obtidas do Hospital de Clínicas/UFPR (Curitiba, PR) e preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. Também, para controle de infecção, foram obtidas amostras de pacientes com Dengue. O controle negativo (indivíduos saudáveis) foram amostras obtidas em banco de sangue.

A seguir estão tabelados os dados principais dos 12 pacientes com sepse selecionados, sendo que todos possuem entre 18 a 66 anos (Tabela 3). Todos foram diagnosticados com sepse ou uma doença relacionada (SIRS ou choque séptico). Nenhum paciente possui infecção por HIV ou doença base (renal, cardíaca, diabetes, entre outras).

A seleção de pacientes nesta faixa de idade contempla o permitido por lei para a doação de sangue, desta forma permitindo a comparação com um grupo de doadores de sangue saudáveis. Também foram escolhidas frequências semelhantes de ambos os sexos.

TABELA 3: PACIENTES SELECIONADOS

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico	Hemocultura	Desfecho	Análise
38	M	32	SIRS	N	A	Seq.
50	F	38	Sepse grave	N	A	Seq.
52	M	18	SIRS	N	A	Seq.
62	M	27	Sepse grave	N	A	Seq.
68	F	23	Sepse	N	A	Seq.
81	M	26	Sepse	N	A	Seq.
104	F	37	SIRS	N	A	Seq.
133	F	27	SIRS	N	A	Seq.
152	M	36	Sepse	KPC	A	Seq.
194	M	26	Sepse grave	N	A	Seq.
211	M	66	Choque	<i>Candida tropicalis</i>	O	Micros.
101	M	51	Sepse	KPC	A	Micros.

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A coluna “Diagnóstico” se refere ao diagnóstico que o paciente recebeu na unidade de tratamento em que foi internado. A coluna “Hemocultura” se refere a detecção de algum microorganismo após cultura microbiana. A coluna “Desfecho” refere-se a se o paciente obteve alta (“A”) da unidade de tratamento, ou veio a óbito (“O”). A coluna “Análise” refere-se ao tipo de análise que foi realizada com a amostra de plasma do paciente, sequenciamento (“Seq”) ou microscopia (“Micros”). KPC-*Klebsiella pneumoniae* resistente a Carbapenema.

As amostras de plasma foram divididas em 3 grupos de número amostral entre 9 e 12: pacientes com sepse (GS, Tabela 3), doadores de sangue saudáveis (GC) e pacientes infectados com Dengue (GD). A presença de uma infecção pelo vírus da Dengue (DENV) gera uma resposta imune por parte do hospedeiro, e as EVs presentes no plasma passam a ter alterações de expressão de evRNA (CHAHAR; BAO; CASOLA, 2015), portanto pode ser utilizado como um grupo controle de infecção viral. Hipoteticamente, espera-se que o evRNA em abundância nas EVs seja distinto entre os três grupos e permita análises comparativas.

Organizando as amostras da forma descrita, temos uma amostragem do evRNA presente em situação normal (GC), durante uma infecção viral (GD) e durante a sepse (GS). A maior parte das amostras do grupo GS foram destinadas exclusivamente para sequenciamento (10 amostras) e o restante para análise por NanoSight e Microscopia (2 amostras).

### 5.3 ISOLAMENTO DE EVs DO PLASMA

As EVs foram isoladas das amostras de plasma utilizando o kit comercial *miRCURY™ Exosome Isolation Kit – Serum and Plasma* (Exiqon), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, o plasma mantido em refrigeração a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi descongelado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O plasma foi centrifugado para sedimentar células mortas, plaquetas e fibrina ( $10,000 \times g$  por 5 min). O sobrenadante foi misturado com o tampão de precipitação incluído no kit e incubado por 60 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foi realizada uma centrifugação leve ( $500 \times g$  por 5 min). O sobrenadante não foi analisado para identificar EVs. Descartando-se o sobrenadante, a fração de vesículas no sedimento foi ressuspensa em tampão de ressuspensão do kit. O princípio da precipitação de vesículas se baseia da redução da sua hidratação e conseqüente sedimentação após centrifugação. O kit utilizado possuiu rendimento adequado, sendo capaz de obter EVs de aproximadamente 40-150 nm (HELWA et al., 2017) dentro da faixa do que são considerados exossomos e microvesículas.

### 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

A suspensão de EVs foi enviada e analisada por TEM via um protocolo próprio na Plataforma de Microscopia Eletrônica de Transmissão do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz. As EVs são aderidas à grade do TEM em um volume de  $10\text{ }\mu\text{L}$  por 10 min, e contrastadas com uma solução de uranila 5%. A análise por TEM nos permite observar as características morfológicas das EVs.

### 5.5 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

A suspensão de EVs foi analisada pela metodologia de rastreamento de nanopartículas (NTA), utilizando o aparelho NanoSight LM10 (Malvern) de acordo com as seguintes especificações:  $25.4 - 25.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; limiar de detecção = 5; FPS = 25; nível da câmera = 9; velocidade de bombeamento da seringa = 50.

Os resultados obtidos pelo NanoSight nos permitem estimar a concentração de EVs, assim como seu tamanho médio. A NTA é uma metodologia óptica de visualização e caracterização de nanopartículas (VAN DER POL et al., 2010) amplamente utilizada nas pesquisas tratando com EVs (GARDINER et al., 2016).

## 5.6 ISOLAMENTO DO RNA CONTIDO NAS EVs

O RNA contido nas EVs foi isolado utilizando o kit comercial *miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids* (Exiqon), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a suspensão de EVs foi lisada utilizando o tampão de lise incluído no kit. Foram realizadas duas etapas de centrifugação com adição de etanol, permitindo a separação do RNA. Foi obtida uma fração de RNA total purificada, que engloba a fração de RNAs pequenos. O kit utilizado possui validação e bom rendimento de RNA (EL-KHOURY et al., 2016).

## 5.7 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

O RNA total foi analisado utilizando o kit comercial *Qubit® RNA HS Assay Kit* (ThermoFisher), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foram preparados padrões de RNA para a criação de uma curva de calibração. O RNA amostral e os padrões foram tratados com um tampão de trabalho incluído no kit, e posteriormente quantificados por método fluorométrico utilizando o aparelho *Qubit® 2.0 Fluorometer* (ThermoFisher). A dosagem de RNA deste kit nos permite estimar a concentração de RNA das amostras, e conseqüentemente ajustar por diluição a concentração de RNA.

## 5.8 CARACTERIZAÇÃO E QUALIDADE DO RNA

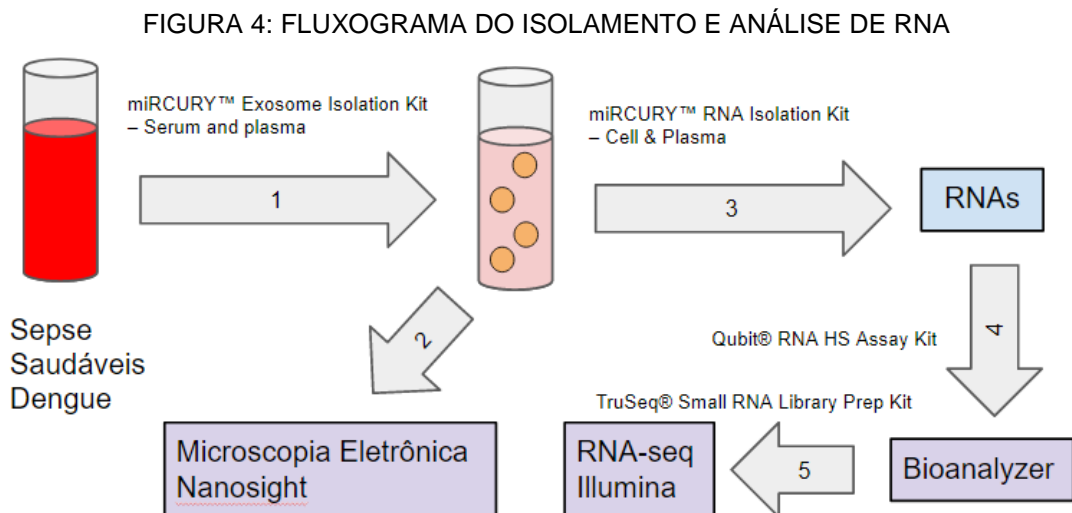
O RNA total foi analisado utilizando o kit *Agilent RNA 2100 Nano Kit* (Agilent Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, a amostra de RNA total é transferida para um *chip* contendo um gel de separação por eletroforese, junto com um padrão de RNA. O *chip* é inserido no aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*, onde o RNA é detectado por método fluorométrico. O resultado obtido nos permite avaliar a concentração, pureza relativa e o tamanho aproximado (em nucleotídeos) das moléculas de RNA amostrais.



## 5.9 RNA-SEQ E PREPARO DE BIBLIOTECA DE cDNA

A biblioteca de evRNA pequeno foi preparada para RNA-seq seguindo o protocolo do kit *TruSeq® Small RNA Library Prep Kit*. Resumidamente, moléculas adaptadoras foram ligadas ao RNA amostral em conjunto com outros reagentes. Foi realizado um ensaio de transcriptase reversa e amplificação, gerando uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) que foi posteriormente purificada. A biblioteca de cDNA foi passada por uma etapa de controle de qualidade e normalização, e posteriormente submetida ao sequenciamento.

O RNA-seq foi realizado utilizando o aparelho Illumina® MiSeq do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram sequenciadas em 50 pares de base *single end*. As etapas metodológicas estão representadas em conjunto no fluxograma da Figura 4.



FONTE: O autor (2017)

NOTA: A partir do plasma preservado dos pacientes foi realizado o isolamento de EVs (1), seguido de caracterização de EVs (2) e isolamento de RNA (3). O RNA foi quantificado, analisado qualitativamente (4) e sequenciado (5).

## 5.10 PROCESSAMENTO DE SEQUÊNCIAS, ALINHAMENTO E COMPARAÇÃO

Os dados do RNA-seq foram analisados utilizando o programa CLC Genomics Workbench v9.5.3 (QIAGEN Bioinformatics), que permite realizar o processamento dos dados de sequenciamento brutos e análises estatísticas entre os grupos. As sequências obtidas foram cortadas nos pontos de adaptadores (*trimming*) e

analisadas em questão ao seu tamanho, conteúdo de Guanina-Citosina, e escore PHRED de qualidade.

A base de dados miRBase (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014) foi utilizada como referência de alinhamento para a identificação das sequências correspondentes a miRNAs. Também foi utilizada uma base de dados de ncRNAs humanos disponível no programa CLC.

A comparação entre os grupos foi realizada por meio de testes estatísticos proporcionados no CLC. Os grupos foram normalizados em 1 milhão (RPKM) e posteriormente plotados em uma plotagem do tipo *Principal Component Analysis* para verificar diferença inter e intra-grupal (CONESA et al., 2016). Foi realizado o teste *Empirical Analysis of DGE* (EDGE Test) para verificar diferença estatística entre os grupos (ROBINSON; SMYTH, 2008). Também foi realizado o teste de proporções de Baggerley, visualizando os resultados sob correção de Bonferroni (mais conservadora) e FDR (mais relaxada).

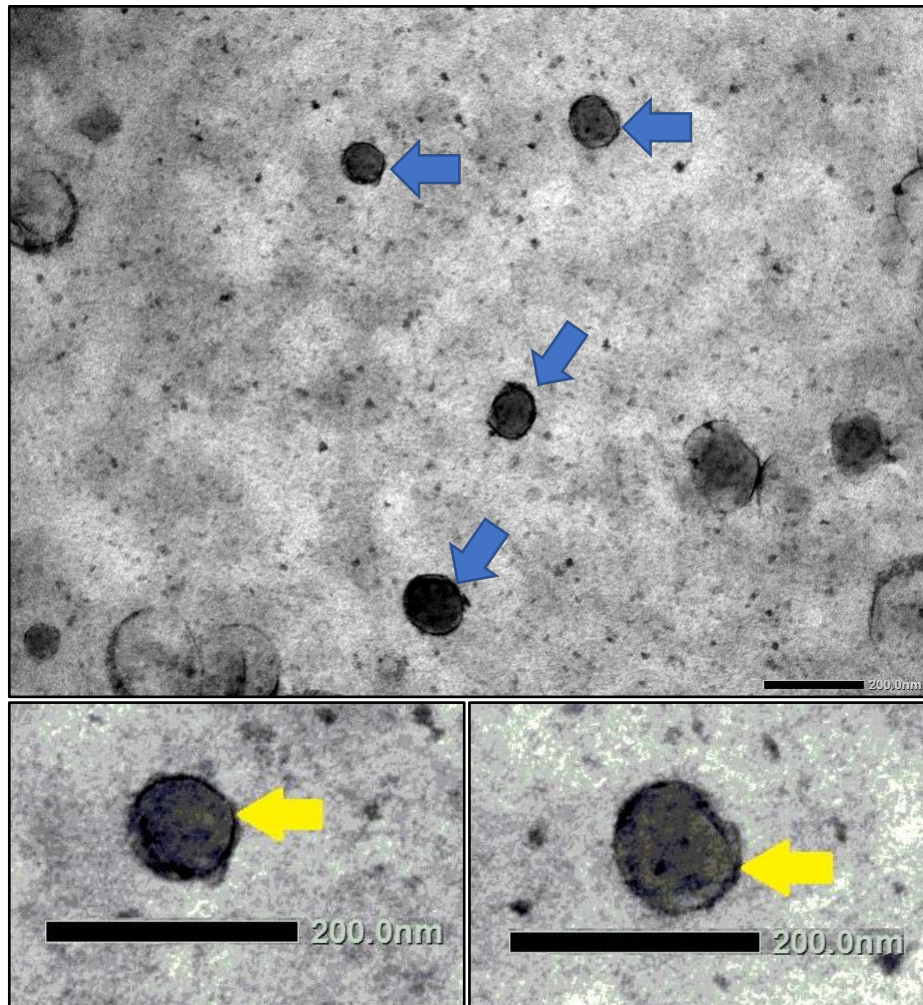
## 6 RESULTADOS

### 6.1 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS E RNA

As vesículas foram isoladas de acordo com o protocolo anteriormente descrito. De um total de 12 amostras do grupo GS (Sepse), 10 foram destinadas para o sequenciamento e as outras 2 para análise de microscopia e NanoSight. Agrupamos as amostras de tal forma para priorizar o sequenciamento, devido a quantidade e volume limitado. Além disso, 9 amostras do grupo GC (controle) foram sequenciadas em uma nova corrida no sequenciador. Até o momento de conclusão deste trabalho, o sequenciamento das amostras de pacientes com dengue e amostras adicionais de GS (que fazia parte dos objetivos iniciais do projeto do trabalho) não pôde ser realizado.

Após o preparo das amostras para microscopia eletrônica, foram identificadas algumas vesículas de tamanho inferior a 200 nm (Figura 5).

FIGURA 5: MICROSCOPIA ELETRÔNICA EVIDENCIANDO AS VESÍCULAS OBTIDAS DO PLASMA DO PACIENTE 211

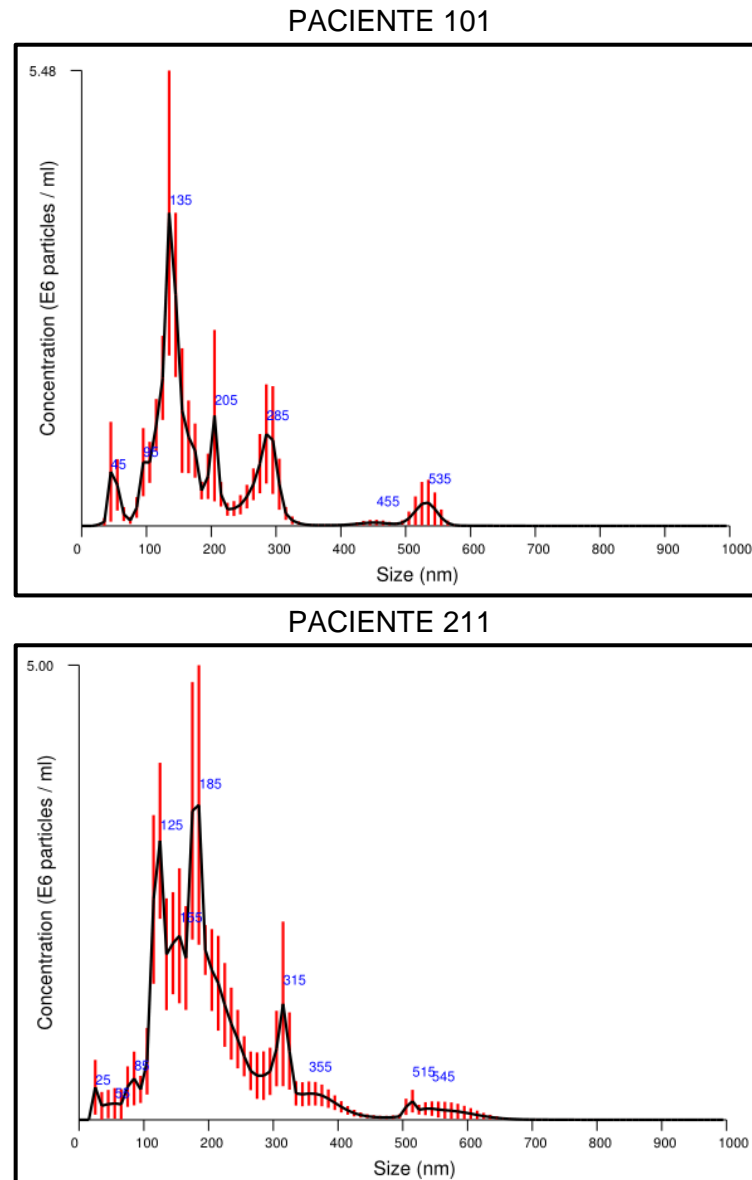


FONTE: O autor (2017)

NOTA: As flechas azuis indicam as EVs, possuindo diâmetro inferior a 200 nm. Podem ser diferenciadas morfológicamente dos outros artefatos e detritos. Régua = 200 nm.

O aparelho NanoSight identificou a concentração de vesículas na solução. No espectro de tamanho por concentração do paciente 211 foi obtido um diâmetro médio de 202,6 nm, e concentração de  $4,04 \times 10^7 \pm 3,94 \times 10^6$  vesículas/mL. Para o paciente 101 foi obtida uma média de 185,3 nm em uma concentração de  $2,55 \times 10^7 \pm 3,95 \times 10^6$  vesículas/mL. São observados picos de concentração nos gráficos dos pacientes, com o paciente 211 possuindo alta concentração de vesículas do tamanho 185 e 125 nm, e o paciente 101 com um pico pronunciado de 135 nm (Figura 6).

FIGURA 6: GRÁFICO DE ESPECTRO DE TAMANHO POR CONCENTRAÇÃO DAS VESÍCULAS ISOLADAS DOS PACIENTES 211 E 101



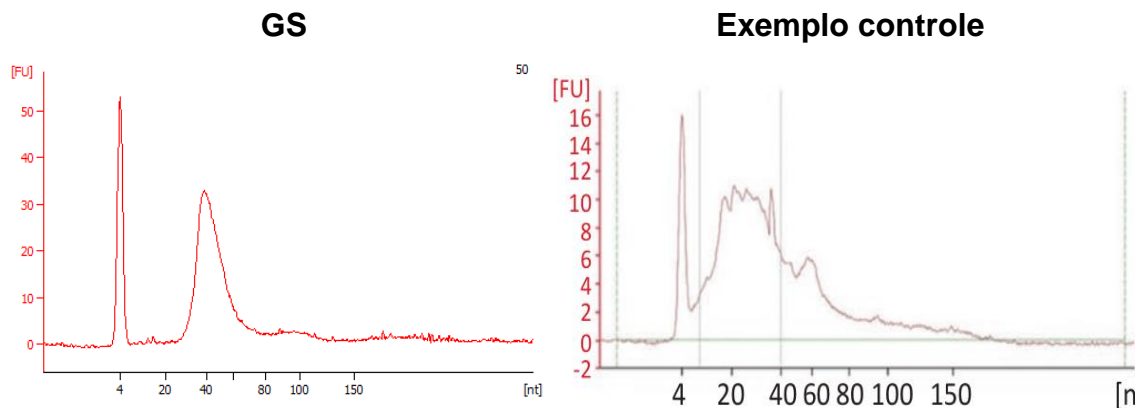
FONTES: O autor (2017)

NOTA: O eixo X se refere ao tamanho/diâmetro das vesículas detectadas. O eixo Y se refere à concentração de vesículas calculada a partir da velocidade da passagem da solução e o número de vesículas rastreadas.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DO evRNA

Após o isolamento das EVs, o evRNA foi extraído das vesículas utilizando o kit *miRCURY™ RNA Isolation Kit – Biofluids* (Exiqon), dosado com o Qubit e analisado no Bioanalyzer. O espectro de tamanho do evRNA isolado foi plotado em um gráfico de concentração e tamanho (Figura 7).

FIGURA 7: GRÁFICO DE ESPECTRO DE TAMANHO POR CONCENTRAÇÃO DO evRNA ISOLADO



Fonte: O autor (2017)

Fonte: Adaptado de Cheng e Hill (2017)

NOTA: O espectro de tamanho do evRNA obtido após eletroforese no chip Bioanalyzer. O eixo Y corresponde a taxa de Unidades de Fluorescência (FU), que é correlacionado com a concentração do RNA. O eixo X corresponde ao tamanho da molécula de RNA (em nucleotídeos) no espectro. Pode-se notar que a amostra de GS apresenta um pico que abrange tamanhos próximos a 40 nt, parte dos RNAs pequenos normalmente encontrados. O primeiro pico de 4 nt corresponde ao controle interno da corrida. LEGENDA: GS-Grupo sepse.

O evRNA isolado foi convertido em cDNA e transportado para a plataforma Illumina® MiSeq, onde foi sequenciado.

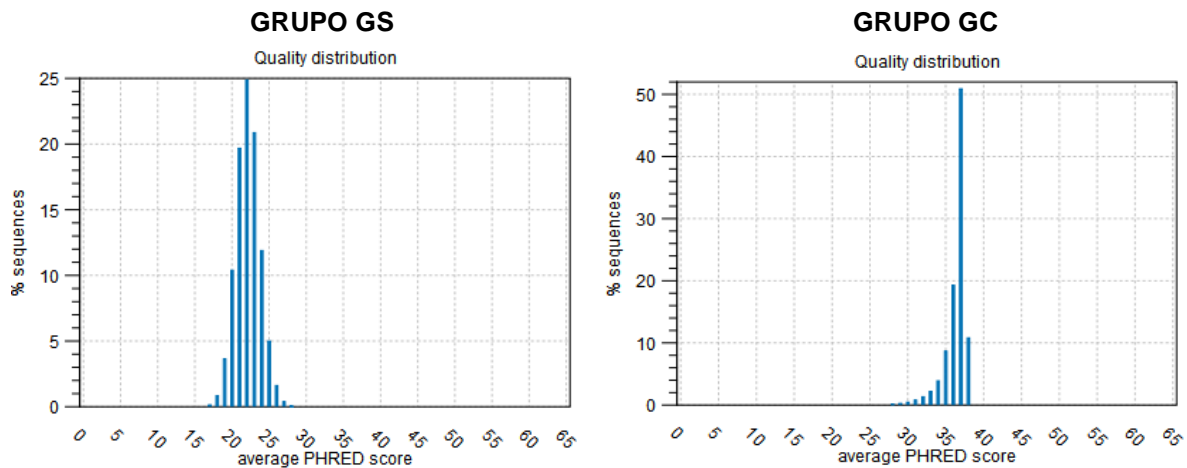
## 6.5 DADOS BRUTOS DO SEQUENCIAMENTO E ALINHAMENTO

Os dados obtidos do sequenciamento pela plataforma Illumina® são um conjunto de *reads*, resultado de várias leituras realizadas dos ácidos nucleicos. Os *reads* brutos foram transferidos para um computador em um formato “fastq”, permitindo a manipulação dos dados utilizando o programa CLC Genomics Workbench v9.5.3. Dentro do programa CLC, primeiramente foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa dos *reads*. O grupo de controles (GC) (n = 9) continha um total agregado de 11.955.751 *reads*, e o grupo dos pacientes (GS) (n = 10) 490.829 *reads*. O tamanho dos *reads* em todas as amostras se manteve próximo de 50 nucleotídeos. O conteúdo de Guanina-Citosina foi semelhante dado que a média esteve em torno de 55-60% em ambos os grupos. O número de bases ambíguas foi irrelevante para ambos.

O PHRED é um algoritmo de qualidade que representa a probabilidade de uma base ser incorretamente identificada, sendo que um score acima de 30 indica uma acurácia de 99,9%. Ou seja, um PHRED de 20 indica a possibilidade de erro de leitura em 1 base a cada 100. Um PHRED de 30 indica erro de 1 base a cada 1000. A média

de PHRED foi maior que 20 para ambos os grupos (Figura 8), porém o GC demonstrou um PHRED médio maior (>35) do que o GS (<24). Dados de Illumina® MiSeq são considerados de boa qualidade com PHRED > 30 (ILLUMINA, 2011), portanto o grupo GS obteve baixa qualidade de dados.

FIGURA 8: GRÁFICO DA QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS MEDIDA POR ESCORE PHRED

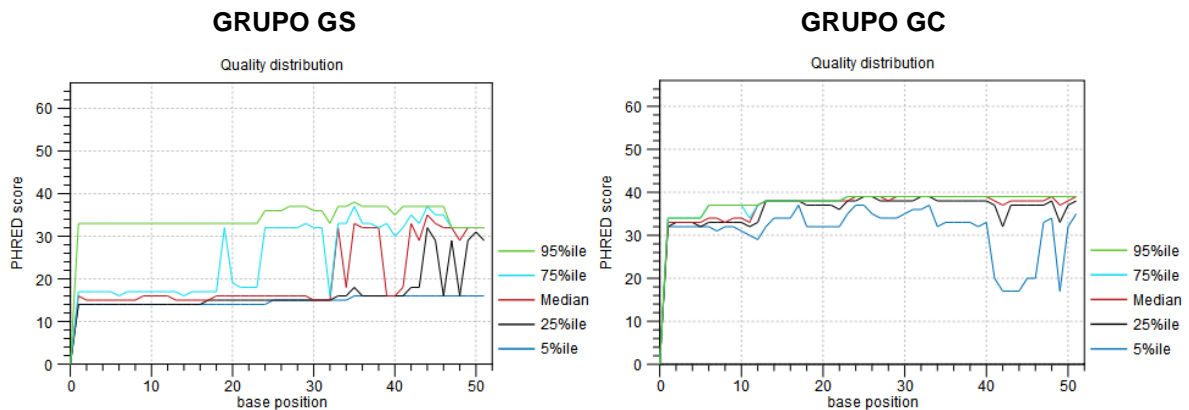


FONTE: O autor (2017)

NOTA: O eixo X representa a qualidade das sequências pelo escore PHRED. O eixo Y representa a porcentagem de sequências do total de sequências do grupo. LEGENDA: GS-Grupo sepse; GC-Grupo controle.

Isso reflete no gráfico de distribuição de qualidade nas *reads* (Figura 9), onde pode ser observado uma maior taxa PHRED distribuída pelos controles do que nos pacientes. O grupo GS não possui uma boa qualidade de *reads* ao indicado por este escore.

FIGURA 9: GRÁFICO DE DISTRIBUIÇÃO DE QUALIDADE DAS SEQUÊNCIAS MEDIDA POR ESCORE PHRED



FONTE: O autor (2017)

NOTA: O eixo X representa a posição de base da sequência. O eixo Y representa qualidade na respectiva posição de base. As cores indicam, do total de RNAs na amostra, a média de qualidade do percentil indicado. LEGENDA: GS-Grupo sepse; GC-Grupo controle.

Foi realizado o alinhamento das *reads* utilizando o banco de dados de miRNAs miRBase v21, disponível em (<http://www.mirbase.org/>). O organismo base escolhido foi o *Homo sapiens*. As configurações de alinhamento e agrupamento de *reads* foram mantidas como padrão do CLC. Na tabela abaixo (Tabela 4) são observados os percentuais de alinhamento dos reads com as sequências de miRNA do banco de dados.

TABELA 4: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS COM MIRBASE

Grupo GS	sRNA	Alinhados	%	Grupo GC	sRNA	Alinhados	%
<b>38</b>	25.862	81	0,3	<b>20</b>	2.931	548	18,7
<b>50</b>	4.030	5	0,1	<b>23</b>	2.390	338	14,1
<b>52</b>	9.793	23	0,2	<b>24</b>	2.048	140	6,8
<b>62</b>	38.292	108	0,3	<b>27</b>	5.509	1.119	20,3
<b>68</b>	20.703	51	0,2	<b>28</b>	3.405	779	22,9
<b>81</b>	40.120	137	0,3	<b>34</b>	2.122	233	11,0
<b>104</b>	61.657	130	0,2	<b>35</b>	5.172	913	17,7
<b>133</b>	21.594	26	0,1	<b>39</b>	4.254	764	18,0
<b>152</b>	33.449	99	0,3	<b>42</b>	1.820	78	4,3
<b>194</b>	12.873	22	0,2				
<b>Média</b>	26.837	68,2	0,25	<b>Média</b>	3.295	421,57	12,79

FONTE: O autor (2017)

NOTA: A coluna "sRNA" se refere a quantidade de sequências de RNA pequeno detectada em cada amostra. A coluna "Alinhados" se refere ao número de sequências que foram alinhadas com sucesso contra um miRNA da base de dados humano. A coluna "%" se refere a porcentagem de sequências alinhadas. LEGENDA: GS-Grupo sepse; GC-Grupo controle.



As sequências de evRNA também foram alinhadas com a base de dados de RNAs não codificantes do *Homo sapiens* (GRCh38.ncrna), disponível em (<http://rnacentral.org/>). Na tabela abaixo são observadas as taxas de alinhamento com os elementos dessa base de dados (Tabela 5).

TABELA 5: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS COM GRCH38/NCRNA

Grupo GS	sRNA	Alinhados	%	Grupo GC	sRNA	Alinhados	%
<b>38</b>	25.862	92	0,4	<b>20</b>	2.931	636	21,7
<b>50</b>	4.030	7	0,2	<b>23</b>	2.390	369	15,4
<b>52</b>	9.793	27	0,3	<b>24</b>	2.048	145	7,1
<b>62</b>	38.292	119	0,3	<b>27</b>	5.509	1.263	22,9
<b>68</b>	20.703	66	0,3	<b>28</b>	3.405	954	28,0
<b>81</b>	40.120	139	0,3	<b>34</b>	2.122	252	11,9
<b>104</b>	61.657	150	0,2	<b>35</b>	5.172	1.061	20,5
<b>133</b>	21.594	30	0,1	<b>39</b>	4.254	857	20,1
<b>152</b>	33.449	106	0,3	<b>42</b>	1.820	84	4,6
<b>194</b>	12.873	35	0,3				
<b>Média</b>	26.837	77,1	0,28	<b>Média</b>	3.295	366,59	16,91

FONTE: O autor (2017)

NOTA: A coluna “sRNA” se refere a quantidade de sequências de evRNA pequeno detectada em cada amostra. A coluna “Alinhados” se refere ao número de sequências que foram alinhadas com sucesso contra um RNA não codificante. A coluna “%” se refere aos dados de alinhamento em porcentagem de sequências alinhadas. LEGENDA: GS-Grupo sepse; GC-Grupo controle.

## 6.6 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS GRUPOS

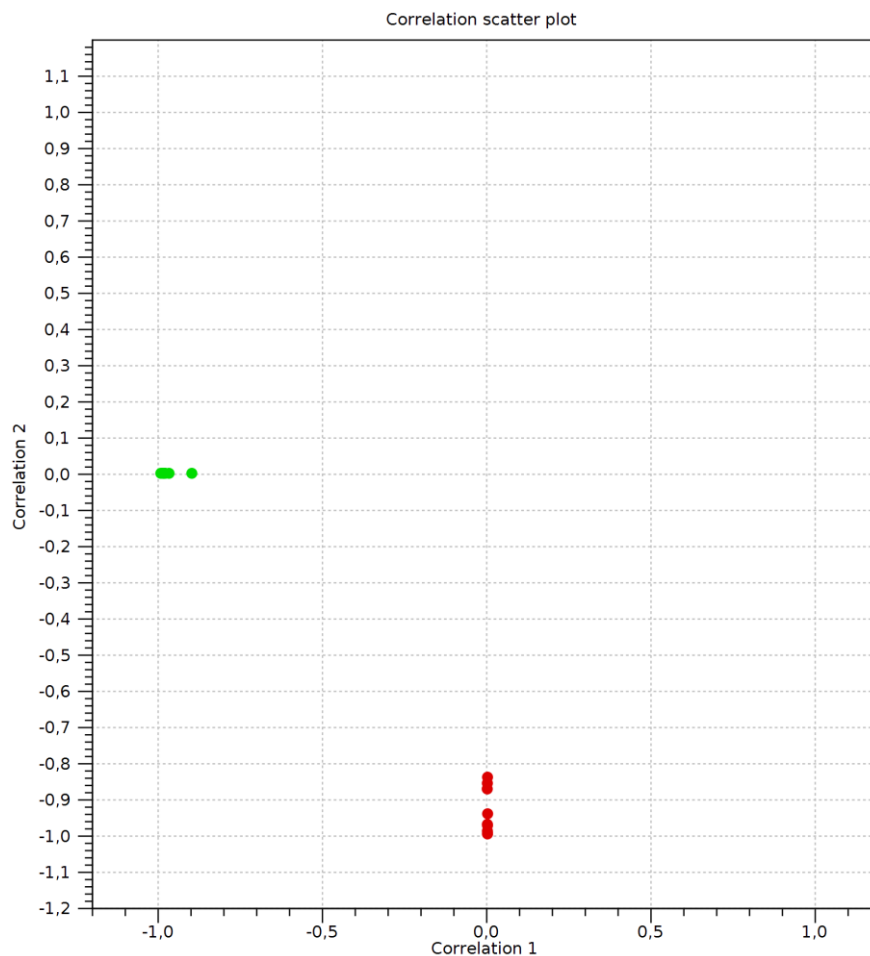
Com base nos dados alinhados no miRbase v21, foram realizadas análises comparativas entre o grupo de pacientes e o controle para identificar miRNAs diferencialmente expressos. Foi realizado uma comparação do tipo não pareada de dois grupos com os valores, seguida de normalização e testes estatísticos.

Os valores de quantidade de miRNAs específicos brutos (não normalizados), quando comparados entre os dois grupos mostraram valores de *Fold Change* infinitos, sem capacidade de comparação entre os dois grupos. O *Fold Change* é um indicador quantitativo de quantas vezes uma variável em um grupo é maior ou menor que em outro. O miR-486 apresentou diferença porém sem *Fold Change* mensurável. Os valores normalizados também não apresentaram *Fold Change* mensurável, exceto subvariantes de miR-486.

Um *Principal Component Analysis* (PCA) foi realizado com os valores normalizados, na tentativa de estabelecer uma diferença entre os grupos (Figura 10)

e verificar se as amostras foram distribuídas corretamente. Pode-se observar que no gráfico de correlação existe uma diferenciação entre ambos os grupos em dois clusters, e não existem amostras *outliers* (isoladas) significantes. O PCA realizado com os dados alinhados dos RNAs não codificantes não demonstrou diferença quantificável entre os grupos.

FIGURA 10: GRÁFICO DE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS DE CORRELAÇÃO ENTRE O GRUPO CONTROLE E SEPSE APÓS ALINHAMENTO COM MIRBASE

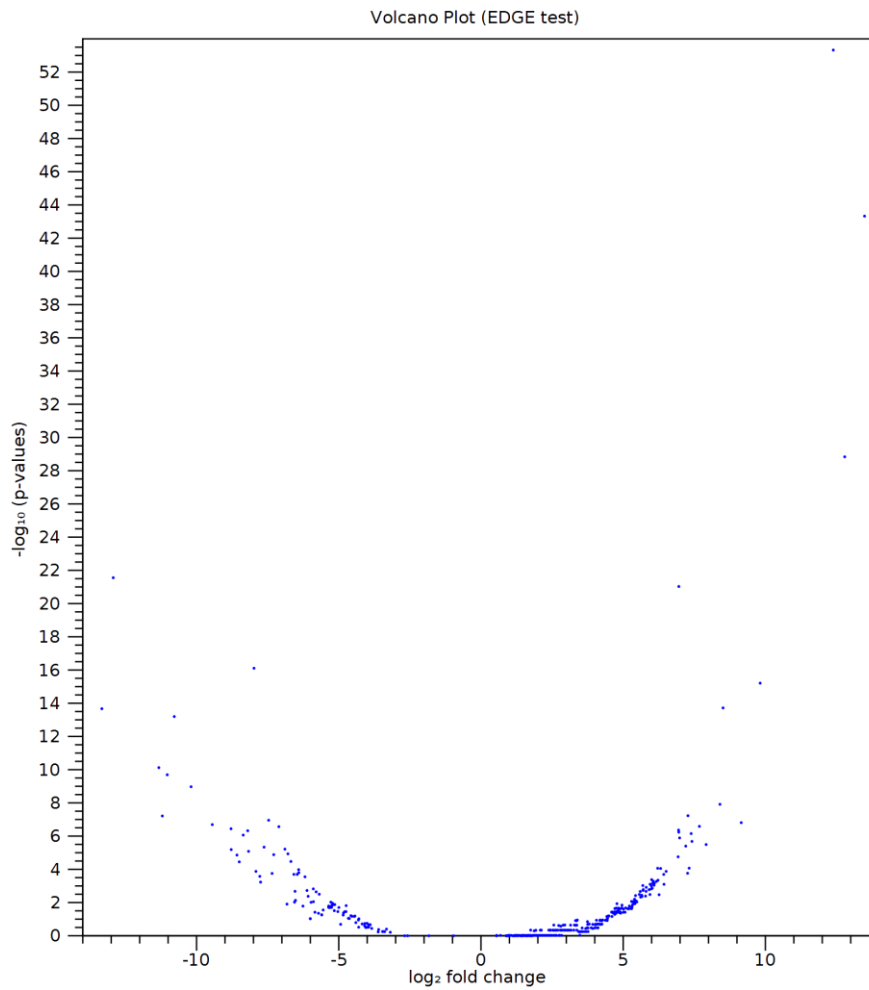


FONTE: O autor (2017)

NOTA: É evidenciado a formação de dois clusters, sendo que cada cor representa um grupo experimental. O GS é representado nos pontos vermelhos, e o GC nos pontos verdes.

Um *Volcano Plot* foi plotado a partir dos resultados do teste estatístico *Empirical Analysis of DGE* (EDGE Test) mostrando que poucos miRNAs estão diferencialmente expressos com significância quando comparados os grupos GC e GS (Figura 11). Como os resultados do EDGE Test foram na maior parte inválidos, a representação gráfica não é adequada.

FIGURA 11: GRÁFICO DO TIPO VOLCANO PLOT COM OS RESULTADOS DO EDGE TEST ENTRE OS GRUPOS GS E GC APÓS ALINHAMENTO NO MIRBASE



FONTE: O autor (2017)

NOTA: O eixo X representa o log<sub>2</sub> do Fold Change. O eixo Y representa o log<sub>10</sub> dos valores de p corrigidos por FDR. Os pontos azuis representam os reads comparados.

## 7 DISCUSSÃO

As EVs foram detectadas com sucesso (Figura 5) nas amostras de dois pacientes com sepse. Pelo NanoSight foi estimado um diâmetro médio entre 180-200 nm. Em um trabalho semelhante, Reithmair et al. (2017) isolou vesículas de pacientes com sepse com diâmetro aproximado de 154,4 +/- 40,2 nm e controles saudáveis com 225,2 +/- 24,3 nm, valores próximos dos que obtivemos.

Os exossomos e microvesículas possuem tamanho bastante variado, sendo que alguns tipos de microvesículas podem chegar a 1 µm de diâmetro. Portanto os nossos resultados evidenciam que o kit conseguiu isolar as vesículas presentes no plasma.

Os resultados do sequenciamento, até o momento, não foram completamente satisfatórios. Foi evidenciado que a quantidade de *reads* do sequenciamento do grupo GS foi notavelmente menor do que o grupo controle GC. Quando o número de *reads* é insuficiente, a representatividade dos dados cai significativamente, e com isso a qualidade é afetada. Isso foi observado pela baixa qualidade dos *reads* de GS no cálculo do escore PHRED (Figura 8), onde existe uma diferença contrastante com as *reads* do grupo GC.

A proporção de alinhamento com a base de dados miRBase também diferiu entre ambos os grupos. O grupo GS teve uma taxa de alinhamento média próxima a 0,25% do total de *reads*, enquanto o grupo GC esteve próximo a 12,79% (Tabela 4). Esse contraste se repetiu no alinhamento com a base de dados de RNAs não codificantes (Tabela 5).

Algumas explicações principais para a ausência de dados de qualidade podem ser contempladas: as vesículas em indivíduos com sepse carregam RNAs degradados ou não necessariamente miRNAs; o processo de isolamento do RNA gerou degradação e perda de qualidade dos dados; houve um erro no momento do sequenciamento, talvez na concentração da amostra, que produziu uma leitura errada no Illumina®. A seguir discutimos essas hipóteses.

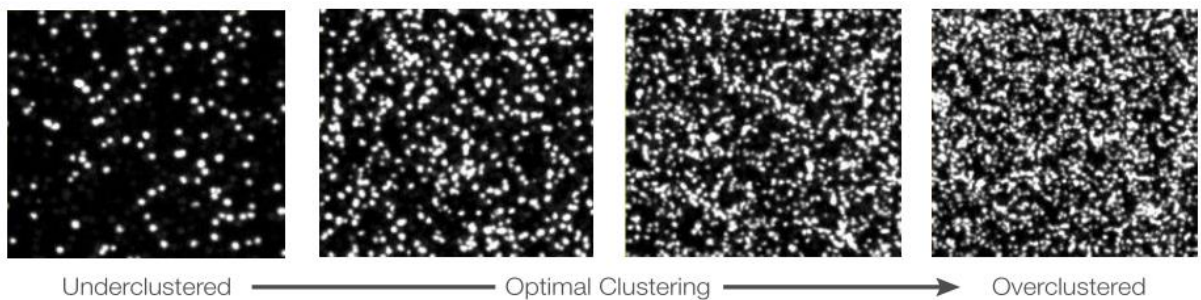
O evRNA presente nas vesículas do plasma (fisiologicamente) possui um repertório grande de ncRNAs (HUNTER et al., 2008) com um padrão detectável (CHENG; HILL, 2017). Apesar de que na sepse vários sistemas fisiológicos são alterados, e componentes inflamatórios são liberados em massa na circulação, o transporte de evRNA não é drasticamente alterado. Vários tipos celulares continuam secretando EVs com miRNA internalizado, e esses miRNAs puderam ser detectados

em modelos animais (WU et al., 2013) e em amostras humanas (REITHMAIR et al., 2017). De fato, a morfologia e quantidade de vesículas não aparenta mudar entre pacientes saudáveis e sépticos (REITHMAIR et al., 2017).

Sobre o processo de isolamento dos RNAs, nossos dados mostram que as vesículas foram isoladas com sucesso e os RNAs foram detectados na eletroforese do Bioanalyzer. Não houveram diferenças significativas entre os padrões de evRNA detectados no Bioanalyzer entre o grupo experimental e controle, portanto não houve degradação de RNA. Isso indica que o isolamento foi realizado de acordo com o especificado nos protocolos. Provavelmente não houve erros nesta parte da metodologia.

Possivelmente a falta de dados adequados teve origem no sequenciamento na plataforma Illumina®. Após o preparo da biblioteca de cDNA, a concentração/volume que deve ser inserida no chip de sequenciamento é meticulosamente mensurada. Essa é uma etapa crucial, pois o chip é manufaturado para trabalhar adequadamente em uma faixa muito estreita de concentração (Figura 12).

FIGURA 12: EXEMPLO DE FAIXAS OTIMIZADAS DE DENSIDADE DE CLUSTERS NO CHIP DO ILLUMINA



FONTE: (Disponível em: <https://support.illumina.com/>)

NOTA: A densidade de clusters gerados deve estar dentro de uma faixa específica para sequenciamento adequado, e isso é garantido com uma concentração específica de cDNA inicial.

Caso a concentração seja menor do que a adequada, não há leituras suficientes e ocorre perda de uma parte dos dados. Se a concentração for acima da adequada, ocorre o fenômeno de *overclustering*. Uma alta concentração de cDNA no *input* (volume final inserido no chip) gera uma densidade alta de *clusters* após amplificação, com cada *cluster* em proximidade com os outros.

Na etapa de sequenciamento a máquina realiza ciclos de síntese onde nucleotídeos fluorescentes (em 4 cores para cada um) são ligados aos *clusters*, emitindo fluorescência específica que é captada pelos sensores. Caso dois ou mais

*clusters* estejam muito próximos uns dos outros (*overclustering*), a fluorescência não é distinguida pelo sensor e o *read* é considerado de baixa qualidade. Esse é um filtro aplicado pelo sistema antes de entregar os dados finais para análise.

Uma grande parte dos nossos dados foi descartada pois as leituras não foram adequadamente detectadas pelo sensor da máquina. Isso pode ser resolvido com novos sequenciamentos, e reavaliação do protocolo para o *input* final de cDNA no chip. O ajuste da concentração final de cDNA pode promover um sequenciamento mais adequado e assim dados de alta qualidade.

Para a continuação do trabalho deverão ser feitos novos sequenciamentos com outras amostras. De forma a obter dados de uma mesma corrida no sequenciador para cada grupo amostral (GS, GC, GD) decidimos organizar o próximo sequenciamento com 3 amostras de pacientes com sepse e hemocultura negativa, 3 amostras com sepse e hemocultura positiva, 3 controles e 3 pacientes com dengue. Na tabela 6 estão as próximas amostras a serem sequenciadas do grupo GS.

TABELA 6: PRÓXIMAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

Paciente	Sexo	Idade	Diagnóstico	Hemocultura	Desfecho
38	M	32	SIRS	N	A
50	F	38	Sepse grave	N	A
52	M	18	SIRS	N	A
12	F	61	Sepse grave	<i>E. coli</i> ESBL	O
56	M	45	Sepse grave	<i>E. coli</i> ESBL	A
42	M	60	Sepse grave	KPC/ <i>Cryptococcus</i>	O

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A coluna “Diagnóstico” se refere ao diagnóstico que o paciente recebeu na unidade de tratamento em que foi internado. A coluna “Hemocultura” se refere a detecção de algum microorganismo após cultura microbiana. A coluna “Desfecho” refere-se a se o paciente obteve alta da unidade de tratamento, ou veio a óbito. sequenciamento ou microscopia. KPC-*Klebsiella pneumoniae* resistente a Carbapenemas; ESBL-beta lactamase de espectro estendido.

A concentração final de cDNA nos próximos experimentos, assim como o protocolo de sequenciamento, serão revistos meticulosamente antes de proceder.

## 8 CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

Até o momento de escrita deste trabalho não encontramos miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos. A qualidade dos dados obtidos do grupo de dez pacientes com sepse foi notavelmente afetada. Isso feriu o alinhamento com as bases de dados e comparações estatísticas com o grupo controle.

Os procedimentos de preparo de biblioteca de cDNA, e a concentração final de cDNA para *input* no sequenciador, serão revistos. Novos sequenciamentos serão realizados para a obtenção de dados fidedignos e que permitam uma análise de expressão diferencial entre os grupos experimentais.

## **7 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E FINANCIAMENTO**

Este projeto está integrado ao projeto maior intitulado “Estudo piloto para validação clínica de método molecular para detecção de patógenos em pacientes com septicemia”, tendo aprovação no CEP HC/UFPR (código 765.009).

Este projeto está sendo desenvolvido no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/Paraná (Curitiba, PR), sendo financiado pelo CNPq e Fundação Araucária.



## REFERÊNCIAS

- ABED, N. et al. Outcome of unimicrobial versus polymicrobial sepsis. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 62, 2010.
- ALBERTI, C. et al. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. **Critical Care**, v. 8, n. 3, p. 222–6, 2004.
- ALVERDY, J. C.; KREZALEK, M. A. Collapse of the Microbiome, Emergence of the Pathobiome, and the Immunopathology of Sepsis. **Critical Care Medicine**, n. 9, p. 337–347, 2016.
- ANAS, A. A. et al. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, n. 4, p. 147–52, 2010.
- ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.
- ANGUS, D. C.; OPAL, S. Immunosuppression and Secondary Infection in Sepsis Part, Not All, of the Story. **JAMA**, p. 15–17, 2016.
- BAEK, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**, v. 455, n. 7209, p. 64–71, 2008.
- BENZ, F. et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, 2016.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure: The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee report. **Chest**, v. 103, n. 2, p. 656, 1992.
- BOSMANN, M.; WARD, P. A. The inflammatory response in sepsis. **Trends in Immunology**, p. 1–8, 2012.
- BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–30, 2015.
- CAI, J. et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 227–238, 2013.
- CARLET, J.; BEN ALI, A.; CHALFINE, A. Epidemiology and control of antibiotic resistance in the intensive care unit. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 309–316, 2004.
- CASERTA, S. et al. Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

CHAHAR, H. S.; BAO, X.; CASOLA, A. Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. **Viruses**, v. 7, p. 3204–3225, 2015.

CHENG, L.; HILL, A. F. **Exosomes and Microvesicles**. [s.l.: s.n.]. v. 1545

CHISTIYAKOV, D. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRY SHEV, Y. V. Extracellular vesicles and atherosclerotic disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 14, p. 2697–2708, 2015.

CHUN, K. et al. Sepsis Pathogen Identification. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 2211–0682 (Electronic), p. 539–561, 2015.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 364–372, 2015.

COHEN, J. et al. Sepsis: A roadmap for future research. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 581–614, 2015.

CONESA, A. et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v. 17, n. 13, p. 1–19, 2016.

COSENZA, S. et al. Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 889, 2017.

DE CANDIA, P. et al. Serum microRNAs as biomarkers of human lymphocyte activation in health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. Feb, p. 1–6, 2014.

DEATHERAGEA, B. L.; COOKSONA, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948–1957, 2012.

DEUTSCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: Current dogma and new perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463–475, 2014.

EL-KHOURY, V. et al. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. **Scientific Reports**, v. 6, n. December 2015, p. 1–14, 2016.

ESSANDOH, K.; FAN, G. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 11, p. 2155–2162, 2014.

FOSTER, B. P. et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 8363, n. April 2017, 2016.

GARDINER, C. et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular**

**Vesicles**, v. 3078, n. April 2017, 2016.

GUSTAFSON, D.; TYRYSHKIN, K.; RENWICK, N. microRNA-guided diagnostics in clinical samples. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 563–575, 2016.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–24, 2014.

HELWA, I. et al. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–22, 2017.

HILL, A. F. et al. ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, p. 1–8, 2013.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–74, 2013.

HUNTER, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

ILLUMINA. **Quality Scores for Next-Generation Sequencing**. Disponível em: <[https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2017.

KANG, J. W. et al. DAMPs activating innate immune responses in sepsis. **Ageing Research Reviews**, v. 24, p. 54–65, 2015.

KIM, K. M. et al. RNA in extracellular vesicles. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, p. 1–14, 2017.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. October 2010, p. 68–73, 2014.

KREZALEK, M. A. et al. THE SHIFT OF AN INTESTINAL “MICROBIOME” TO A “PATHOBIOME” GOVERNS THE COURSE AND OUTCOME OF SEPSIS FOLLOWING SURGICAL INJURY. **Shock**, v. 45, n. 5, p. 475–482, 2016.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 0090–3493 (Print), p. 1250–1256, 2003.

LEVY, M. M. et al. The surviving sepsis campaign: Results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 2, p. 222–231, 2010.

LUAN, Y.-Y. et al. The significance and regulatory mechanisms of innate immune

cells in the development of sepsis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, n. 1, p. 2–15, 2014.

MACHADO, F. R.; CAVALCANTI, A. B.; BOZZA, F. A. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–10, 2017.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1–2, p. 131–141, 2013.

MARTIN, G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 6, p. 701–706, 2012.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. **Circulation Research**, v. 120, n. 10, p. 1674–1686, 2017.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4–11, 2014.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Advanced Review**, v. 8, n. June, p. 227–241, 2016.

MURTHY, S.; WUNSCH, H. Clinical review: International comparisons in critical care-lessons learned. **Critical Care**, v. 16, n. 2, p. 218, 2012.

NASA, P.; JUNEJA, D.; SINGH, O. Severe sepsis and septic shock in the elderly: An overview. **World Journal Of Critical Care Medicine**, v. 1, n. 1, p. 23–30, 2012.

NICHOLSON, L. B. The immune system. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. July, p. 275–301, 2016.

PERES DA SILVA, R. et al. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7763, 2015.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RASHED, M. H. et al. Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

REITHMAIR, M. et al. Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, p. 1–8, 2017.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 10, p. 776–787, 2008.

ROBINSON, M. D.; SMYTH, G. K. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. **Biostatistics**, v. 9, n. 2, p. 321–332, 2008.

RODERBURG, C. et al. Circulating MicroRNA-150 Serum Levels Predict Survival in Patients with Critical Illness and Sepsis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

SALES JÚNIOR, J. A. L. et al. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9–17, 2006.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605–19, 2015.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251–R260, 2004.

SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801–10, 2016.

SOGAYAR, A. M. C. et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **PharmacoEconomics**, v. 26, n. 5, p. 425–434, 2008.

SULLIVAN, R. et al. Extended Spectrum Beta- Lactamases: A Minireview of Clinical Relevant Groups. **Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 4, n. 4, 2015.

TACKE, F. et al. Levels of Circulating miR-133a Are Elevated in Sepsis and Predict Mortality in Critically Ill Patients. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

TANIGUCHI, L. U. et al. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 608, 2014.

TELES, M. et al. Surviving Sepsis Campaign in Brazil. **Shock**, v. 30, n. 1, p. 47–52, 2008.

TERRASINI, N.; LIONETTI, V. Exosomes in Critical Illness. **Critical Care Medicine**, n. 23, p. 1, 2017.

THÉRY, C.; CURIE, A. I.; INSERM, U. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. **F1000 Biology Reports**, v. 8, n. July, p. 1–8, 2011.

TICLEA, M. et al. The Use of Exosomes as Biomarkers for Evaluating and Monitoring Critically Ill Polytrauma Patients with Sepsis. **Biochemical Genetics**, v. 55, n. 1, 2017.

TISONCIK, J. R. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012.

TODOROVA, D. et al. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. **Circulation Research**, v. 120, n. 10, p. 1658–1673, 2017.

TORIO, C. M.; ANDREWS, R. M. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011. **Agency for Healthcare Research and Quality**, v. 31, n. 1, p. 1–12, 2013.

TORIO, C. M.; MOORE, B. J. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013. **Agency for Healthcare Research and Quality**, v. 204, p. 1–15, 2016.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Lipid Insights**, v. 2 1, n. 6, p. 27–40, 2007.

VAN DER POL, E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 12, p. 2596–2607, 2010.

VAN DER POL, E. et al. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 1, p. 48–56, 2016.

VAN DER POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, 2017.

VENET, F. et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25 +CD127-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. **Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 4, p. 678–686, 2009.

VERMA, M. et al. Extracellular vesicles: potential applications in cancer diagnosis, prognosis, and epidemiology. **BMC Clinical Pathology**, v. 15, n. 6, p. 1–9, 2015.

VINCENT, J. L. et al. Sepsis definitions: Time for change. **The Lancet**, v. 381, n. 9868, p. 774–775, 2013.

VINCENT, J. L.; MIRA, J. P.; ANTONELLI, M. Sepsis: Older and newer concepts. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 4, n. 3, p. 237–240, 2016.

WANG, H. E. et al. Chronic Medical Conditions and Risk of Sepsis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–7, 2012.

WANG, J. et al. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **Journal of Cellular Physiology**, n. May, 2015.

WEBER, J. A. et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–1741, 2010.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The

primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WU, S.-C. et al. Profiling Circulating MicroRNA Expression in Experimental Sepsis Using Cecal Ligation and Puncture. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77936, 2013.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015.

ZABOROWSKI, M. P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **BioScience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.

ZHANG, W. et al. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 311, n. 5, p. F844–F851, 2016.