

**IMPACTO DO TEMPO DE ISQUEMIA NA
ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL
EM TECIDOS CRIOPRESERVADOS**

ELOISA HELENA RIBEIRO OLIVIERI

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Dr. Antônio Hugo José Froes Marques
Campos**

Co-Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Olivieri, Eloisa Helena Ribeiro

Impacto do tempo de isquemia na análise de expressão gênica global em tecidos criopreservados / Eloisa Helena Ribeiro Olivieri - São Paulo, 2019.

85p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos

Descritores: 1. Bancos de Espécimes Biológicos/Biological Specimen Banks. 2. Isquemia/cirurgia/Ischemia/surgery. 3. Expressão gênica/Gene Expression. 4. Criopreservação/Cryopreservation. 5. Criobiologia/Cryobiology. 6. Controle Analítico de Qualidade/Analytical Quality Control. 7. Análise em Microsséries/Microarray Analysis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*À minha família, em especial
ao meu marido Tiago.*

*Dedico também à minha pequena Sofia,
que nasceu em um momento muito conturbado na
minha vida pessoal e profissional e na fase de
finalização de mais este desafio. Apesar da
privação crônica de sono nesses últimos 8 meses e
do cansaço acumulado nesses últimos anos, minha
vida está repleta de um amor que transborda e faz
tudo ter mais sentido. Te amo muito filha!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Hércio, meu alicerce, meu exemplo de vida e dedicação, por apoiar minhas escolhas, incentivar a busca pelo conhecimento e sobretudo pelo amor incondicional.

Ao meu esposo Tiago pelo amor e exemplo de sabedoria, pela parceria e estímulo permanente mesmo nos momentos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos, além de toda a ajuda na correção e discussão dessa tese.

À toda minha família, em especial à Elaine por simplesmente ser minha querida irmã.

À minha sogra Neide pela preocupação constante, mesmo de longe.

Ao meu orientador Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos, pela amizade, por acreditar no meu potencial e permitir o desenvolvimento desta pesquisa.

À Dra. Vilma por permitir o meu ingresso ao doutorado, pelas valiosas contribuições na correção dos relatórios e na defesa. Tenho profundo respeito e admiração por toda sua contribuição à pesquisa desse hospital.

À minha co-orientadora Dra. Dirce Maria Carraro, pelo aprendizado ao longo de mais de 10 anos, pelo carinho de sempre e pela abordagem técnica primordial no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Valeria Denninghoff pela amizade, pela alegria e pelas risadas, pelo estímulo no ingresso ao doutorado e por toda a contribuição neste trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Silvia Rogatto, Dr. Eduardo Reis e Dr. Fernando Soares, que contribuíram na correção dos relatórios ao longo da elaboração desta tese.

Ao Dr. Cristobal Fresno pelas análises iniciais de bioinformática neste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Fabio Marchi por assumir as análises de bioinformática em um prazo muito curto, obrigada pela paciência e pela valiosa contribuição com os resultados desse trabalho.

À amiga Dra. Elisa Napolitano pela amizade e pelo o auxílio nos experimentos.

Ao Oraci e Ana Margarita Uceda por toda a ajuda com o manuseio dos camundongos no biotério.

À Fundação Antônio Prudente, patrocinadora do Prêmio Ricardo Renzo Brentani, e aos colegas cujo trabalho realizado foi honrado com esta premiação. Tal conquista disponibilizou recursos financeiros para aquisição dos reagentes e materiais utilizados neste projeto, viabilizando sua realização.

A todos os funcionários do CIPE e do hospital que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente pela oportunidade de convívio e pelos ensinamentos.

Aos membros da banca de doutorado pela contribuição nesta etapa de conclusão.

A todos os colegas da Pós-Graduação com quem passei bons momentos.

À Suely Francisco da Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

Ao meu gerente Dr. Bernardo Peixoto e aos queridos amigos da minha equipe do Biobanco e do Laboratório de Histologia-IHQ-TMA do A.C.Camargo Ana Paula Suenaga, Louise Mota, Fernanda Monteiro, Lais Takata, Rafaela Cruz e Severino Ferreira.

A todos os meus queridos amigos, que de perto ou de longe me cercam de coisas boas, vibram com minhas conquistas e me permitem compartilhar amor. Em especial à Francine Blumental, Cristiane Pinho, Bruna Barros, Giovana Tardin, Bianca Lisboa, Tatiana Rica, Gustavo Molina, Hermano Bellato, Carolina Lorenzetti, e todos os outros não citados, mas que fizeram a diferença e torceram pelo meu sucesso.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Olivieri EHR. **Impacto do tempo de isquemia na análise de expressão gênica global em tecidos criopreservados**. São Paulo; 2019. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O perfil de expressão gênica tem passado do cenário da pesquisa básica para a prática clínica, sendo cada vez mais utilizado como ferramenta na classificação de subtipos moleculares do câncer. No entanto, deve-se ter cautela ao interpretar as assinaturas gênicas, uma vez que os métodos de manuseio e preservação da amostra podem afetar a expressão gênica. “Isquemia fria”, quando aplicada à coleta e preservação de tecidos para pesquisa, refere-se ao período transcorrido desde a retirada do órgão do corpo e coleta da amostra, até o momento do seu congelamento em nitrogênio líquido. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o impacto do tempo de isquemia fria na expressão gênica global pela técnica de *microarray* em um modelo animal. Avaliamos 3 órgãos (pulmão, fígado e rim) de 52 camundongos (*Mus musculus* C57Bl/6), gerando 312 tecidos submetidos a diferentes tempos de isquemia (zero ou referência, 15, 30, 45 e 60 minutos). A expressão gênica global foi avaliada na plataforma *SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray*, que cobre o genoma completo do camundongo. Como resultado deste trabalho, os RNA totais extraídos tiveram alta qualidade (RIN médio de 9,4) e observamos alterações em genes que podem ser atribuídas ao processo isquêmico *per se* ($p < 0.05$ e fold-change ≥ 2). Alguns desses genes são conhecidamente relacionados ao câncer: fatores de transcrição (*Fos*, *Hif3A*), oncogenes (*Ret*, *Srsf3*), supressores tumorais (*Btg1*, *Hnfla*), genes envolvidos no reparo do DNA, diferenciação e atividades de quinase. Esses genes devem ser olhados com cautela nas assinaturas genômicas para um desempenho analítico mais confiável. Foram encontradas variações de expressão gênica relacionadas a processos de controle de íons intracelulares e controle do pH. Evidenciou-se a importância da criopreservação imediata do tecido, ou, pelo menos, o mais rápido possível após a coleta, visando minimizar os efeitos de variação da expressão gênica decorrentes da isquemia.

Descritores: Bancos de Espécimes Biológicos. Isquemia/cirurgia. Expressão gênica. Criopreservação. Criobiologia. Controle Analítico de Qualidade. Análise em Microséries

SUMMARY

Olivieri EHR. [Impact of cold ischemia on global gene expression in cryopreserved tissues]. São Paulo; 2019. [Tese de doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Gene expression profile has been moved from basic research to clinical practice, and it is increasingly being used as a tool in the classification of molecular subtypes in cancer. However, caution should be exercised when interpreting gene signatures, as sample handling and preservation methods may affect gene expression. “Cold ischemia”, when applied to tissue collection and preservation for research, refers to the period from organ removal from the body and sample collection until it is frozen in liquid nitrogen. The general objective of this work was to evaluate the impact of cold ischemia time on global gene expression by microarray technique in an animal model. We evaluated 3 organs (lung, liver and kidney) from 52 mice (*Mus musculus* C57Bl / 6), generating 312 tissues submitted to different ischemia times (zero or reference, 15, 30, 45 and 60 minutes). Global gene expression was evaluated on the *SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray* platform that covers the complete mouse genome. As a result of this work, the extracted total RNAs had high quality (mean RIN of 9.4) and we evidenced changes in genes that can be attributed to the ischemic process *per se* ($p < 0.05$ and fold-change ≥ 2). Some of these genes are known to be related to cancer: transcription factors (*Fos*, *Hif3A*), oncogenes (*Ret*, *Srsf3*), tumor suppressors (*Btg1*, *Hnfla*), genes involved in DNA repair, differentiation and kinase activities. These genes should be viewed with caution in genomic signatures for more reliable analytical performance. Gene expression variations related to intracellular ion control and pH control processes were observed. The importance of immediate tissue cryopreservation, or at least as soon as possible after collection, was evidenced in order to minimize the effects of gene expression variation resulting from ischemia.

Key words: Biological Specimen Banks. Ischemia/surgery. Gene Expression. Cryopreservation. Cryobiology. Analytical Quality Control. Microarray Analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O “ciclo de vida” de uma amostra cirúrgica e variáveis pré e pós-analíticas que podem afetar a integridade molecular da amostra.....	8
Figura 2	Ilustração da retirada dos órgãos utilizados no estudo.....	20
Figura 3	Protocolo para formação das réplicas biológicas de pulmão	21
Figura 4	Protocolo para formação das réplicas biológicas de fígado.....	21
Figura 5	Protocolo para formação das réplicas biológicas de rim	22
Figura 6	Integridade do RNA total no gel de Eletroforese no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)	33
Figura 7	Clusterização hierárquica não supervisionada baseada nos genes totais nos tempos de isquemia 0 15, 30, 45 e 60 nas amostras de pulmão, fígado e rim.....	37
Figura 8	Diagrama de Venn para identificação de genes ortólogos comuns entre os 3 órgãos	41
Figura 9	Diagrama de Venn para identificação de genes ortólogos comuns nos tempos de isquemia em cada órgão isolado.....	41
Figura 10	Gráficos de perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em pulmão nos 5 tempos de isquemia avaliados.....	43
Figura 11	Gráficos de perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em fígado nos 5 tempos de isquemia avaliados.....	44

Figura 12	Gráficos de perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em rim nos 5 tempos de isquemia avaliados	45
Figura 13	Principais funções dos genes ortólogos encontrados com diferença de expressão significativa entre os tempos de isquemia (T00 x 15, T00 x 30, T00 x 45, T00 x 60) nos 3 órgãos de acordo com a classificação no GSEA enriquecido para genes de câncer.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ensaio das réplicas biológicas	22
Quadro 2	Representação dos 42 pools (destacado em azul no quadro) confeccionados.....	25
Quadro 3	Critérios de filtragem e anotação dos genes	29
Quadro 4	Dados de qualidade (pureza, concentração e integridade) dos 168 RNAs totais purificados nos três órgãos.....	34
Quadro 5	Os 10 genes mais e menos expressos nos 3 órgãos nos 4 tempos de isquemia. Baseada nos genes ortólogos entre camundongos e humanos, $p < 0.05$ e fold-change (FC) $ 2 $	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cRNA	RNA complementar
CY3/ CY5	Cianina 3 (verde) e 5 (vermelha)
FAP	Fundação Antônio Prudente
FC	<i>Fold-change</i>
GC	conteúdo de guanina-citosina
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
H&E	coloração com Hematoxilina-eosina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ISBER	<i>International Society for Biological and Environmental Repositories</i>
log₂	Logaritmo na base 2
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ng/ul	nanogramas/microlitro
nm	Nanômetros
ORA	<i>Overrepresentation Enrichment Analysis</i>
PEG	Perfil de expressão gênica
pHe	pH extracelular
pHi	pH intracelular
QC	Controle de qualidade (do inglês “quality control”)
R	Linguagem de programação R
R 260/230	Razão 260/230 lida no espectrofômetro
R 260/280	Razão 260/280 lida no espectrofômetro
RIN	<i>RNA integrity number</i>

rRNA	RNA ribossomal
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SMMHC	<i>Myosin heavy chain smooth muscle isoform</i>
snRNA	RNA nuclear pequeno
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
tRNA	RNA transportador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Análise de expressão gênica em pesquisa e na prática clínica.....	1
1.2	Qualidade da molécula de RNA.....	3
1.3	Variações pré-analíticas	7
1.4	Tempo de isquemia	11
1.4.1	Isquemia quente	12
1.4.2	Isquemia fria	13
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	METODOLOGIA	18
3.1	Casuística - modelo animal	18
3.2	Determinação do tempo de isquemia.....	19
3.3	Desenho do ensaio	20
3.4	Avaliação histológica.....	23
3.5	Avaliação de qualidade do RNA total.....	23
3.6	Confecção dos <i>pools</i>	24
3.7	Marcação e hibridação no <i>Microarray</i>	25
3.8	Pré-processamento: qualidade dos dados e filtragem	28
3.9	Análise dos dados de expressão gênica.....	29
4	RESULTADOS	32
4.1	Qualidade dos RNAs extraídos	32
4.2	Clusterização hierárquica.....	35
4.3	Genes diferencialmente expressos entre os grupos.....	38
4.4	Genes diferencialmente expressos - <i>time-series</i>	42
4.5	Análise de enriquecimento gênico (GSEA)	46

5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74

ANEXO

Anexo 1 Aprovação do CEUA/FAP

APÊNDICES

Apêndice 1 Genes com diferença de expressão significativa em pulmão, fígado e rim nos diferentes tempos de isquemia e de acordo com a classificação dos genes no GSEA com enriquecimento para os genes de câncer.

Apêndice 2 Principais processos biológicos (GO - *Gene Ontology*) enriquecidos para o câncer encontrados nos tempos de isquemia nos três órgãos do estudo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PESQUISA E NA PRÁTICA CLÍNICA

Muitas das descobertas provenientes de ciência básica tem sido traduzidas em assistência ao paciente na prática clínica, tais como a classificação molecular do câncer, o risco de câncer hereditário, a elegibilidade para terapias-alvos, bem como o desenvolvimento de ensaios clínicos inovadores, baseados em genômica (ROYCHOWDHURY e CHINNAIYAN 2016; XING et al. 2019; PAN et al. 2019; SAVCI-HEIJINK et al. 2019).

Os RNAs mensageiros (mRNAs) são expressos / transcritos em cada tipo celular e sua composição e níveis relativos podem variar de acordo com estado fisiológico ou patológico. O estudo da expressão gênica, ou seja, dos mRNAs produzidos nas células, pode servir para inferir sobre a presença de proteínas e a ativação de vias moleculares as quais elas pertencem.

A identificação de subtipos moleculares no câncer e o desenvolvimento de assinaturas gênicas prognósticas e preditivas através do perfil de expressão gênica tornou-se uma ferramenta poderosa para capturar a heterogeneidade biológica do câncer (LI et al. 2015; PELLEGRINI et al. 2015; LIU et al. 2017; HE et al. 2019).

Tecnologias de avaliação dos mRNAs, como a técnica de *microarray*, tem sido utilizadas como ferramentas de análises para obter dados que muitas vezes superam qualquer combinação das variáveis clínicas ou patológicas atualmente disponíveis

(BILD et al. 2006; TREVINO et al. 2007; KUMAR et al. 2012; YU e SNYDER 2016; HE et al. 2019).

Resumidamente, na técnica de *microarray*, o mRNA é isolado da amostra e utilizado para gerar alvos fluorescentes que são incubados em uma lâmina de vidro contendo sondas de DNA fita simples. Dezenas de milhares de sondas com sequências diferentes são dispostas no *microarray* de modo a mapear a maior número possível dos RNAs transcritos no espécime estudado. Os alvos terão marcações com fluoróforos diferentes e são hibridados permitindo o pareamento por complementaridade das sequências de ácidos nucleicos. A partir da intensidade associada a cada sonda detectada em um laser pode-se inferir a abundância relativa do RNA correspondente na amostra (PEIXOTO et al. 2006).

Na oncologia, essas tecnologias desempenham um papel clínico cada vez mais importante no fornecimento de informações individualizadas aos pacientes sobre sua doença, orientando assim a terapia. Para alguns tipos de câncer, exames que mostrem a atividade (expressão) de diversos genes de uma vez só podem ser úteis para prever o prognóstico. Estes exames, chamados painéis de expressão gênica, são realizados em amostras de tecidos e estão disponíveis para alguns tipos de câncer, incluindo mama, cólon e próstata. Tais exames ajudam a prever quais pacientes são mais propensos a apresentar recidiva após o tratamento.

Os testes de perfil de expressão gênica (PEG) medem a expressão ou a atividade biológica de vários genes em amostras de tumores. Eles podem fornecer uma imagem mais completa da assinatura molecular do tumor e permitir uma melhor estimativa do risco de recorrência à distância quando considerados juntamente com outras assinaturas moleculares e características clínicas. Com base nisto, passou-se a

especular que esses testes podem distinguir entre aqueles pacientes que se beneficiariam de quimioterapia adjuvante (isto é, assinaturas PEG de alto risco) e aqueles que não iriam (assinaturas PEG de baixo risco).

Em câncer de mama, por exemplo, vários classificadores baseados em expressão gênica estão atualmente disponíveis comercialmente, entre eles *MammaPrint* (Agendia, Holanda), *Oncotype DX* (Genomic Health, EUA) e *PAM50* (Nano String, EUA) (PEDERSEN et al. 2018). As assinaturas PEG comercialmente disponíveis são recomendadas para utilização em pacientes selecionados (MARRONE et al. 2015). Além disso, encontram-se em investigação testes de diagnósticos baseados no perfil de expressão gênica para outros tipos de tumores (IZUMI et al. 2019; PAN et al. 2019) e para doenças não-oncológicas (SCHMIDT et al. 2016).

Os dados de expressão genética por *microarrays* são conhecidos por estarem sujeitos a variação interplataformas, variação de processamento de laboratório e variação de análise estatística (SHI et al. 2005; SHI et al. 2006). Como os estudos de expressão gênica se tornam clinicamente aplicáveis, sua acurácia e relevância dos achados precisam ser confiáveis (SCHMIDT et al. 2016; AHASIC et al. 2015).

1.2 QUALIDADE DA MOLÉCULA DE RNA

Para escolha das plataformas e as ferramentas analíticas na biologia molecular, geralmente o único critério atualmente considerado é a integridade do RNA dada pelo algoritmo denominado RIN (do inglês: *RNA integrity number*). Esse algoritmo que representa o número de qualidade do RNA é medido com um equipamento denominado *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) que fornece uma nota de qualidade

que vai além da medição das razões das bandas 28S/18S visualizadas pelo gel de agarose e abrange mais de 10 critérios no eletroferograma em uma corrida de RNA (SCHROEDER et al. 2006). É de notar que a estabilidade do mRNA é considerada muito semelhante ao RIN ou à relação de rRNA 28S: 18S, mas isto não foi estudado de forma adequada e provavelmente varia com um transcrito específico e sistema orgânico (OPTIZ et al. 2010; HATZIS et al. 2011; LIU et al. 2013; MUSELLA et al. 2013).

A qualidade do RNA é representada pelos valores de pureza e integridade. Para avaliar a pureza e para quantificá-la, a opção é obter o espectro de absorvância da molécula. Utilizando-se um espectrofotômetro, como o *Nanodrop (NanoDrop ND-1000 spectrophotometer - Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA)*, com 1 ul do RNA total consegue-se mensurar concentrações superiores a 2 ng/ul. O pico de absorvância do RNA é a 260 nm e a pureza é avaliada pelas razões 260/280 e 260/230. Proteínas apresentam um pico de absorvância a 280 nm enquanto outros contaminantes (como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) apresentam pico de absorvância em torno de 230 nm. As razões 260/280 e 260/230 devem estar entre 1,8 a 2,2 para o RNA ser considerado puro. Isto é especialmente importante no caso em que o RNA será utilizado em reações enzimáticas, uma vez que estas exigem condições químicas específicas, além de serem suscetíveis a inibição por uma série de compostos.

Manter a integridade do RNA, ou seja, não deixar que as moléculas se fragmentem, é um dos maiores desafios da análise de expressão gênica, pois o RNA é considerado uma molécula frágil e degrada em determinadas condições, por exemplo quando em baixas concentrações (OLIVIERI et al. 2014). A instabilidade do RNA

acontece porque as células estão constantemente degradando-o e produzindo-o novamente. Além disso, há grande disponibilidade de enzimas líticas (RNases) no ambiente externo (saliva, tecido etc.).

Vários estudos mostraram o efeito prejudicial da degradação do RNA nos resultados da expressão do mRNA. Portanto, torna-se importante a verificação da integridade do RNA antes de aplicações *downstream* como RT-qPCR e *microarrays* (FLEIGE e PFAFFL 2006). Foi demonstrado também que o critério de escolha do valor do RIN para a análise de *microarrays* depende da plataforma escolhida. Em um estudo realizado em amostras cerebrais post-mortem, determinou-se que o indicador mais razoável para a qualidade de tecido é o índice de degradação do RNA e que existe uma boa correlação entre este e o pH da amostra (STAN et al. 2006).

OPTIZ et al. (2010) investigaram os efeitos da integridade da molécula de RNA na expressão gênica de biópsias tumorais de pacientes com câncer localmente avançado do reto, previamente coletados em *RNAlater*[®] e armazenados à temperatura de -80°C. Para poder simular o processo de degradação, o RNA total extraído foi submetido a degradação induzida pelo calor (60°C), utilizando-se os tempos de 0:00h 1:45h 2:30h e 3:15h. Os autores foram capazes de observar que a posição de hibridação da sonda para o experimento de *array*, o tamanho da molécula de RNA mensageiro e o conteúdo GC tiveram influência significativa na degradação da molécula de RNA para o uso em experimentos de expressão gênica. Entretanto, o uso de *RNAlater*[®] não é indicado como solução de armazenamento de todos os tecidos em um Biobanco pois ele altera as características do tecido, inviabilizando o corte do material para confecção do H&E e confirmação do laudo anatomopatológico da amostra coletada e ou estudos de imunohistoquímica, sobretudo em amostras muito pequenas. A avaliação histológica

do tecido é outro fator muito importante destacado por MORENTE et al. (2006, 2011) como critério de qualidade em Biobancos. A avaliação histológica de tecidos deve ser criteriosa, com boa representatividade, pois amostras com tecidos não homogêneos poderiam resultar em perfis de expressão gênica pouco informativos.

Por outro lado, há outros fatores que podem influenciar nos dados de expressão gênica, podendo ou não influenciar no valor do RIN. Variações *in vivo* e *ex vivo*, por exemplo, podem ter impacto sobre a integridade do ácido nucleico. As variações *in vivo* incluem a condição clínica do paciente, tempo de coleta (pré-operatório, intra-operatório e pós-operatório), medicação, dieta, estresse, sendo fatores difíceis de controlar e padronizar, devendo ser consideradas como parte da variação inter-individual de cada amostra gerada. Condições *ex vivo* incluem a coleta, transporte, processamento e armazenamento da amostra; materiais, reagentes e condições utilizadas no processamento da amostra (DEY-HAZRA et al. 2010; ENGEL e MOORE 2011). A capacidade de gerenciar e controlar variações pré-analíticas que impactam na integridade do bioespécime é fundamental para o fornecimento de amostras de tecidos de alta qualidade para a investigação nos Biobancos (BAKER, 2012). Controlar essas variações é um desafio, pois a influência da qualidade de uma amostra nos resultados moleculares obtidos depende não só da classe da biomolécula analisada (DNA, RNA, proteína, metabolito), mas também no tipo de método utilizado e a especificidade, sensibilidade e robustez do método.

A tecnologia dentro da biologia molecular avança exponencialmente, mas há ainda pouca informação em relação às variáveis pré-analíticas (BETSOU et al. 2013). Um dos principais objetivos da ciência voltada ao bioespécime é identificar e controlar o viés potencial devido ao processamento da amostra ou à qualidade das análises

moleculares. Vários estudos recentes têm reconhecido a influência de variáveis pré-analíticas sobre a integridade de biomoléculas (PEDERSEN et al. 2018).

1.3 VARIAÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS

Para introduzir o conceito de variáveis pré-analíticas é instrutivo considerar o “ciclo de vida” da amostra biológica no cenário clínico conforme demonstrado na **Figura 1**. Quando a amostra do paciente é removida no centro cirúrgico, a prioridade é que a amostra seja avaliada pelo patologista para fins de diagnóstico. No entanto, com as tendências atuais em programas de pesquisa translacional, uma parte da amostra pode ser coletada para a pesquisa, desde que o consentimento livre e esclarecido do paciente tenha sido devidamente obtido. Os tecidos coletados para fins de pesquisa devem ser processados de maneira padronizada, evitando os efeitos das variáveis pré-analíticas que podem afetar as análises posteriores (VAUGHT 2015).

Variáveis (exemplos):

Antibióticos
Outras drogas
Tipo de anestesia
Duração da Anestesia
Tempo de clampeamento arterial

Variáveis (exemplos):

Tempo em temperatura ambiente
Temperatura da sala
Tipo de fixação
Tempo no fixador
Taxa de congelamento
Tamanho das alíquotas



Fonte: Adaptado da página da web em *NCI Biospecimen Research Network*: <http://biospecimens.cancer.gov/researchnetwork/lifecycle.asp.4>

Figura 1 - O “ciclo de vida” de uma amostra cirúrgica e variáveis pré e pós-analíticas que podem afetar a integridade molecular da amostra.

Variações pré-analíticas são definidas como qualquer variação ocorrendo entre o momento da coleta da amostra e o momento da análise da amostra. Elas compreendem uma ampla gama de variáveis que afetam os tecidos, incluindo variáveis secundárias aos pacientes que são a fonte do tecido, tais como idade do paciente, raça, sexo, dieta, comorbidades, intervenções médicas prévias (terapia neoadjuvante, biópsia tecidual, cirurgia) e manipulação de tecidos (coleta, processamento e armazenamento de tecidos) (ATHERTON et al. 2016).

Entre os diferentes tipos de variabilidade que podem influenciar os resultados de qualquer ensaio biológico, as variabilidades interindividuais e pré-analíticas são as mais difíceis de gerir.

Vários fatores como os fornecedores, os kits, os reagentes e os consumíveis contribuem para a variabilidade dentro de um laboratório clínico e muitos erros na medição precisa das concentrações de analitos são, na verdade, devidos a variações pré-analíticas (BETSOU et al. 2013).

Devido à extrema variedade de desenhos experimentais, é muito difícil tirar conclusões científicas sobre a estabilidade de amostras e biomoléculas. Portanto a definição de um protocolo padrão normalizado de investigação dos bioespécimes facilitaria grandemente o avanço nessa área e ajudaria na interpretação de resultados duvidosos na prática clínica. Neste sentido os Biobancos têm um papel fundamental nessa padronização pré-analítica (BETSOU et al. 2013).

Dentro da oncologia, por exemplo, temos alguns tumores tipicamente bem heterogêneos (GERLINGER et al. 2012), e se para uma determinada análise, regiões morfológicamente distintas do mesmo tumor forem selecionadas, provavelmente os resultados serão diferentes.

A pesquisa dessas condições pré-ensaio aborda uma série de variáveis que podem potencialmente afetar o resultado das análises posteriores, mas que não estão relacionadas a diferenças inerentes das amostras. Os achados de alguns biomarcadores, por exemplo, poderiam impactar globalmente as análises subsequentes. Seria importante encontrar um perfil de biomarcadores "sensíveis" às condições pré-analíticas, identificá-los e excluí-los durante os estudos, pois não seriam clinicamente representativos da doença ou do problema em questão. Outra abordagem seria a identificação de biomarcadores ultra-sensíveis que podem ser usados como ferramentas de controle de qualidade (QC) para monitorar fatores específicos de variação pré-analítica.

Como exemplo de estudo com abordagem nas variáveis pré-analíticas, DEBEY et al. (2004) abordaram a coleta de sangue periférico para obtenção de RNA com o intuito de identificar uma assinatura molecular de expressão gênica característica de pacientes resistentes a um tratamento específico. Foi avaliado somente o tempo entre

a punção venosa e o isolamento do RNA, variando entre 15 minutos e 24 horas, aplicados em 14 indivíduos "normais" e 14 com doença. Neste exemplo, a única variável pré-analítica testada foi quanto ao "atraso de pré-centrifugação". Como resultado desse atraso houve alteração significativa dos níveis de expressão de genes associados com a hipóxia (*RTP801*, *ADM*, *VEGF*), função das células T (*CX3CR1*, *CCR2*, *TIA1*), interferon (*IFN*), sinalização (*MNDA*, *IRF2*, *GBP1*), choque térmico (*HSP701A*) ou genes de resposta precoce (*NR4A2*, *DTR*). Neste exemplo, eles indicam a exclusão desses genes na assinatura molecular associada à resistência ao tratamento.

Um bom exemplo de problemas pré-analíticos que afetam a prática clínica envolve o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e ensaios de tratamento do câncer de mama com o *Herceptin*[®]. Durante o período de 2005 a 2007, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO - *American Society of Clinical Oncology*) e o Colégio de Patologistas Americanos (CAP - *College of American Pathologists*) realizaram um estudo detalhado das práticas do ensaio HER2 e resultados de vários laboratórios clínicos (WOLFF et al. 2013; WOLFF et al. 2018). Os resultados mostraram que falsos positivos e falsos negativos nos resultados do ensaio HER2 ocorreram em taxas próximas a 20%. Essas discrepâncias resultaram em estresse para o paciente por falsos positivos e no caso de falsos negativos, danos significativos devido ao atraso no início do tratamento específico. Isso levou os membros da ASCO e da CAP a publicar recomendações para melhorar o desempenho do ensaio HER2, e dentre as recomendações, está a padronização de variáveis pré-analíticas, no caso, o tempo e duração da fixação de formalina das amostras de mama usadas nos ensaios. Essas e outras discrepâncias nas práticas laboratoriais levaram à variabilidade interlaboratorial dos resultados dos testes. A ASCO e a CAP tem

publicado atualizações nos ensaios do HER2 e nas diretrizes, incluindo recomendações detalhadas para os médicos informarem os seus pacientes sobre a importância do teste de HER2 e como suas amostras de tecido serão usadas nos ensaios e como os resultados serão interpretados (WOLFF et al. 2018). Para tecidos sólidos infelizmente ainda não dispomos de um método de fixação universal para todas as formas (biópsia, autópsia, cirurgia) que proporcionem resultados ótimos para todos os tipos de aplicações finais (morfologia, imunohistoquímica, expressão gênica, análise de DNA / genotipagem e análise proteômica). O HER2 é apenas um dos vários exemplos sobre o efeito de variáveis pré-analíticas em práticas clínicas laboratoriais.

Uma área que não tem sido amplamente explorada trata do efeito das condições de aquisição dos tecidos ou variáveis pré-aquisição sobre o perfil de expressão de genes tumorais. A maioria das publicações de expressão gênica indica que os tecidos foram congelados imediatamente (*Snap frozen*) após a cirurgia, mas poucos especificam quanto tempo e em que condições o espécime foi mantido antes desse “rápido” congelamento. Além disso, com o advento da laparoscopia e cirurgia robótica, as variáveis anteriores ao processamento dos tecidos tornaram-se ainda mais complexas, visto que os espécimes são submetidos a intervalos prolongados antes do congelamento do material para análise.

1.4 TEMPO DE ISQUEMIA

A alteração da maquinaria celular e a degradação molecular se iniciam logo após a interrupção do suprimento vascular a um órgão durante uma cirurgia, ou quando o tecido é removido e transferido para o local de armazenamento a temperaturas muito

baixas. Os períodos nos quais o órgão permanece sem o suprimento sanguíneo são denominados isquemia (KUMAR et al. 2015).

O tempo de isquemia antes da criopreservação é um fator muitas vezes ignorado quando o material é processado com finalidade de pesquisa, diagnóstica ou terapêutica (GRIZZLE et al. 2016).

1.4.1 Isquemia Quente

Define-se como tempo de isquemia quente o período compreendido entre a interrupção de perfusão do órgão através do clampeamento da irrigação sanguínea do mesmo, até a efetiva retirada deste órgão do corpo.

Controlar os efeitos da intervenção cirúrgica na amostra colhida representa um dos desafios mais significativos para a coleta de tecidos, mesmo porque qualquer tipo de controle poderia afetar o atendimento ao paciente. As variáveis relacionadas ao procedimento cirúrgico incluem o tipo de cirurgia, os efeitos da anestesia, a administração de líquidos e sangue, o tempo operatório e o dano tecidual intraoperatório; no entanto, o tempo de isquemia quente pode ser uma das variáveis mais importantes que afetam as alterações nas biomoléculas (SCHLOMM et al. 2008; GÜNDISCH et al. 2012; PEDERSEN et al. 2018).

GÜNDISCH et al. (2012) encontraram que 74% das proteínas no fígado estavam diminuídas nas amostras devido à isquemia quente em comparação com os respectivos espécimes de biópsia obtidos antes da ressecção cirúrgica. Em contraste, para próstata, SCHLOMM et al. (2008) relataram aumento da expressão de genes durante cerca de 90 minutos de isquemia quente, seguido por um ligeiro aumento na expressão, quando as prostatectomias radicais foram mantidas por vários períodos de

isquemia fria. Durante a isquemia quente e fria, 9% da expressão dos genes da próstata aumentaram com significância estatística.

Em um estudo recente de PEDERSEN et al. (2018), três mulheres com câncer de mama primário operável foram submetidas a biópsias *in situ* de tecido mamário e tumoral antes da mastectomia radical. Biópsias *ex vivo* de tecido normal e tumoral foram coletadas imediatamente após a excisão cirúrgica. Os efeitos putativos na expressão gênica de malignidade (tumor versus normal) e manipulação cirúrgica (pós versus pré-cirúrgica) foram investigados simultaneamente. Curiosamente, uma grande proporção de vias afetadas pela isquemia, especialmente no tecido tumoral, é de vias consideradas especificamente reguladas no tecido tumoral em comparação ao normal. Os resultados deste estudo sugerem que uma grande contribuição para essa expressão diferencial se origina da resposta alterada ao estresse nas células tumorais em vez de meramente representar diferenças *in vivo*. É importante ter isso em mente ao usar a análise de expressão gênica para deduzir a função biológica e ao coletar material para o perfil de expressão gênica.

1.4.2 Isquemia Fria

O tempo de isquemia fria ou *ex vivo*, quando aplicado à coleta de tecidos para pesquisa, refere-se ao período desde a retirada do órgão do corpo até o momento de sua preservação (por exemplo, através do congelamento em nitrogênio líquido). No caso de amostras de tecidos em um Biobanco deve-se ter especial atenção ao tempo desde a coleta até a preservação das amostras (deve reduzir-se ao mínimo possível o tempo entre a remoção de um tecido até o seu congelamento para evitar a ocorrência de processos degenerativos). A isquemia compreende não apenas a insuficiência de

oxigênio (hipóxia, anóxia), mas também a disponibilidade reduzida de substratos nutrientes e a retirada inadequada de metabólitos (KUMAR et al. 2015). Isquemia prolongada resulta, entre outras consequências, em uma redução do nível suprimento de energia, mudanças no metabolismo e na estrutura celular, levando ao acúmulo de metabólitos nocivos. A célula, privada do oxigênio, essencial para os processos oxidativos da respiração aeróbia, passa a obter energia por meio do metabolismo anaeróbico, o que resulta em acidose láctica. O meio ácido é inadequado para a cinética das enzimas, privando às células dos seus mecanismos normais de homeostase. A diminuição da oferta de sangue para os tecidos implica na formação de áreas com baixo nível de oxigênio, caracterizando o estado de hipóxia. O pulmão é um órgão de destaque por apresentar um tecido altamente vascularizado e oxigenado.

Esta condição afeta profundamente as propriedades celulares funcionais de produção de citocinas, expressão de receptores específicos, adesão, migração e sobrevivência das células. O complexo gênico *HIF-1a*, fator de transcrição expresso em condições adversas de falta de oxigênio, regula a expressão de genes de citocinas pró- ou antiinflamatórias e de fator de angiogênese *VEGF* (DEUDERO et al. 2008).

O tempo de isquemia fria também pode afetar o pH tecidual conforme demonstrado em nosso trabalho publicado recentemente na *Scientific Reports - Nature* (DENNINGHOFF et al. 2017). Neste artigo relatamos as variações de pH de acordo com o tempo de isquemia na mesma casuística deste trabalho e nos mesmos órgãos (fígado, rim e pulmão). Como conclusão do trabalho, sugerimos que a alcalose tecidual no tempo de isquemia fria pode ser um mecanismo subjacente das alterações da expressão gênica.

Contudo, ainda não está claro o impacto do tempo de isquemia fria na expressão gênica global e, como agravante, há ainda a influência da forma e rigor de registro nos Biobancos deste tempo, mesmo com a existência de protocolos operacionais padrão bem definidos para este controle.

Além disso, o tempo máximo aceito para coleta do tecido até seu armazenamento a baixa temperatura (tempo de isquemia fria) varia entre os Biobancos. É consenso na literatura o tempo máximo de 30 minutos para o congelamento do tecido (ISBER 2008; NCI 2010). Porém há grupos que aceitam o tempo de 60 minutos (CABOUX et al. 2007).

A coleta muito rápida de tecido exige um alto custo com infraestrutura e recursos humanos. Para coletar e processar amostras em ≤ 1 hora, pode ser necessário que o pessoal do Biobanco esteja presente e que toda uma estrutura e equipe esteja treinada e organizada para tal procedimento. Essas etapas podem ser muito difíceis quando existem várias salas de cirurgia e múltiplas amostras processadas concomitantemente. Embora a coleta de uma alíquota de uma grande ressecção de tecido (por exemplo, mastectomia radical) em 30 minutos seja possível, a identificação cuidadosa e a proteção das margens cirúrgicas requerem um tempo maior apenas para marcar e amostrar as margens para garantir sua precisão diagnóstica. Para o projeto Atlas do Genoma do Câncer-TCGA, por exemplo, destinou-se um alto aporte financeiro para que a coleta de tecidos fosse feita dentro de 1 hora de isquemia quente e fria (GRIZZLE et al. 2016).

Alguns Biobancos gastam recursos significativos na tentativa de obter esses tecidos para os investigadores no menor tempo possível, dessa forma é muito importante que os padrões para isquemia fria utilizados para coletas de tecidos tanto

para pesquisa quanto para uso clínico sejam baseados em evidências científicas em vez de “*pseudostandards*” baseados em opiniões (GRIZZLE et al. 2016).

Assim, o papel da isquemia fria na expressão gênica das amostras biológicas deve ser melhor investigada no sentido de controlar os primeiros minutos desde a retirada do espécime no centro cirúrgico até sua congelação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é avaliar o impacto do tempo de isquemia fria na expressão gênica pela técnica de microarray em um modelo experimental animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de expressão gênica diferencial em camundongos em três órgãos (pulmão, fígado, rim) nos 4 tempos de isquemia fria (15, 30, 45 e 60 minutos) utilizando a plataforma SurePrint G3 Mouse GE 8x60K *Microarray*;
- Traçar um perfil de expressão gênica ao longo do tempo de isquemia (time-series);
- Identificar genes em vias ou processos biológicos enriquecidos para isquemia, hipóxia ou processos relacionados à oncogênese;
- Desenvolver um índice de estresse isquêmico, ou seja, estabelecer um perfil de marcadores "sensíveis" à isquemia, independente de doença. Esse índice poderia ser usado como ferramenta de controle de qualidade (QC) para monitorar a confiança na qualidade das amostras para estudos ou testes que envolvam expressão gênica.
- Validar *in silico* os resultados de expressão gênica com os bancos de dados públicos

3 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA - MODELO ANIMAL

Este estudo utilizou a mesma casuística de um trabalho prévio do grupo (DENNINGHOFF et al. 2017). Foram utilizados 52 camundongos (*Mus musculus* C57Bl/6) livres de doença do Biotério do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center. Os procedimentos experimentais seguiram as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea). Os animais tiveram livre acesso à água e ração própria para a espécie. Os animais permaneceram em condições ambientais controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ruídos e ciclo de doze horas para luz (7.00-19.00 horas) e escuridão. Os animais foram eutanasiados quando atingiram 20-25 gramas de peso e a medida do peso de cada camundongo foi registrada. Para coleta dos órgãos os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com solução de cloridrato de quetamina (150 mg/Kg, Ketamina Agener - União Química, São Paulo), cloridrato de xilasina (10 mg/kg, Calmium- União Química, São Paulo) e então coletados os dois pulmões, dois rins e fígado (porções anterior e posterior). Este projeto foi aprovado pela CEUA/FAP - Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Antônio Prudente, sob número 049/12.

3.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ISQUEMIA

O procedimento envolvendo a remoção de órgãos foi realizado sob condições assépticas e dentro do equipamento de fluxo laminar, através da incisão cirúrgica da linha mediana. Os *timers* foram ativados para o registro dos diferentes tempos de isquemia do tecido (0 15, 30, 45 e 60 minutos). Ambos os pulmões, ambos os rins e duas porções iguais do fígado foram removidos e pesados (figura complementar Fig. S2 em DENNINGHOFF et al. 2017) e divididos em duas partes, uma para a determinação do pH tecidual que foi alvo do estudo prévio e uma parte para criopreservação - alvo desse estudo. O órgão removido foi deixado à temperatura ambiente até o tempo requerido ter decorrido (0 15, 30, 45 e 60 minutos) e então imediatamente congelado em nitrogênio líquido (**Figura 2**).

As justificativas para escolha dos tempos de isquemia foram:

- 0 min: tempo referente ao tecido coletado e imediatamente congelado e que serviu como baseline para os outros tempos.
- 15 minutos: foi o tempo médio registrado no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para a retirada da peça cirúrgica, transporte até a sala de congelação no CC, seleção do tecido e congelamento em nitrogênio líquido.
- 30 minutos: tempo máximo de coleta de tecido recomendado na literatura segundo as melhores práticas em Biobancos (ISBER 2008; NCI 2010).
- 45 minutos (tempo para avaliação pós 30 minutos).
- 60 minutos: tempo máximo aceito de acordo com algumas publicações (CABOUX et al. 2007).

Os pressupostos biológicos são:

- os animais são saudáveis.
- o sexo (masculino ou feminino) e a lateralidade do órgão (direito ou esquerdo) não constituem fator de interferência no experimento.
- O processo de isquemia fria é independente em cada órgão (pulmão, fígado ou rim).

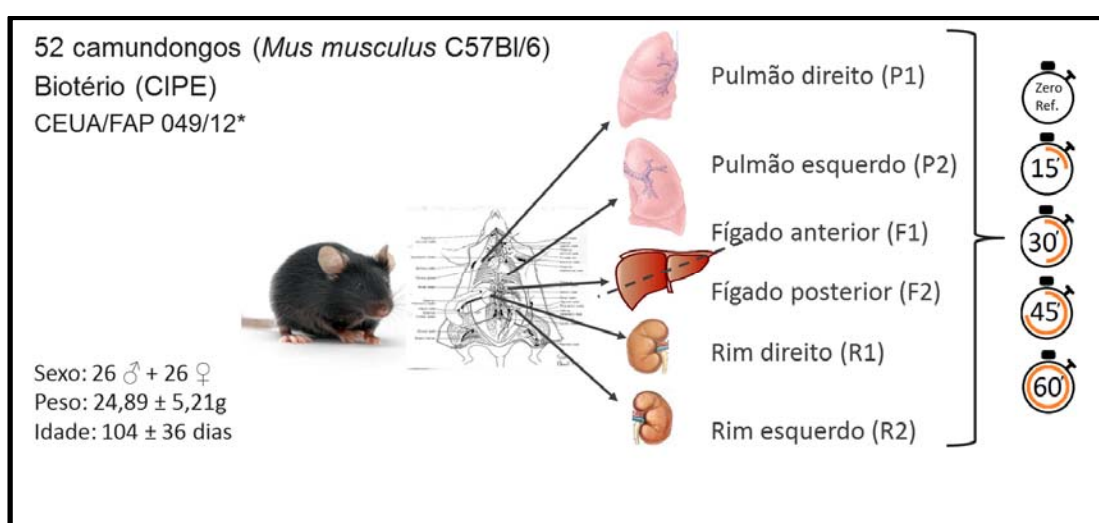


Figura 2 - Ilustração da retirada dos órgãos utilizados no estudo (P:pulmão, F:fígado, R:rim), dos camundongos C57Bl/6, de acordo com os diferentes tempos de isquemia.

3.3 DESENHO DO ENSAIO

O desenho do ensaio foi feito considerando 6 réplicas biológicas dos 3 órgãos diferentes de cada animal (pulmão - **Figura 3**, fígado - **Figura 4**, e rim - **Figura 5**) para os 4 tempos de criopreservação (15-30-45-60 minutos) mais o tempo zero que foi usado como referência, como mostrado resumidamente no **Quadro 1**. Dessa forma a análise dos dados é normalizada, dado que cada amostra independente estará

constituída pela mistura de 4 pseudo-replicas (6 réplicas biológicas de 4 animais para cada uma).

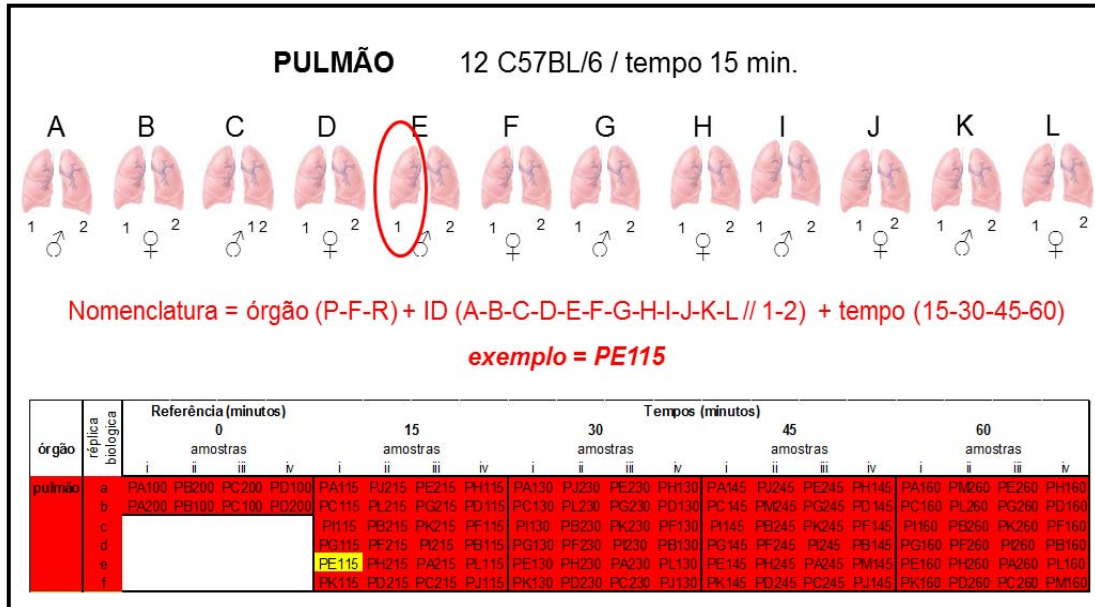


Figura 3 - Protocolo para formação das réplicas biológicas de pulmão. Neste exemplo está representada uma amostra no tempo de 15 minutos. i= ♂direita; ii= ♀esquerda; iii= ♂esquerda; iv= ♀direita.

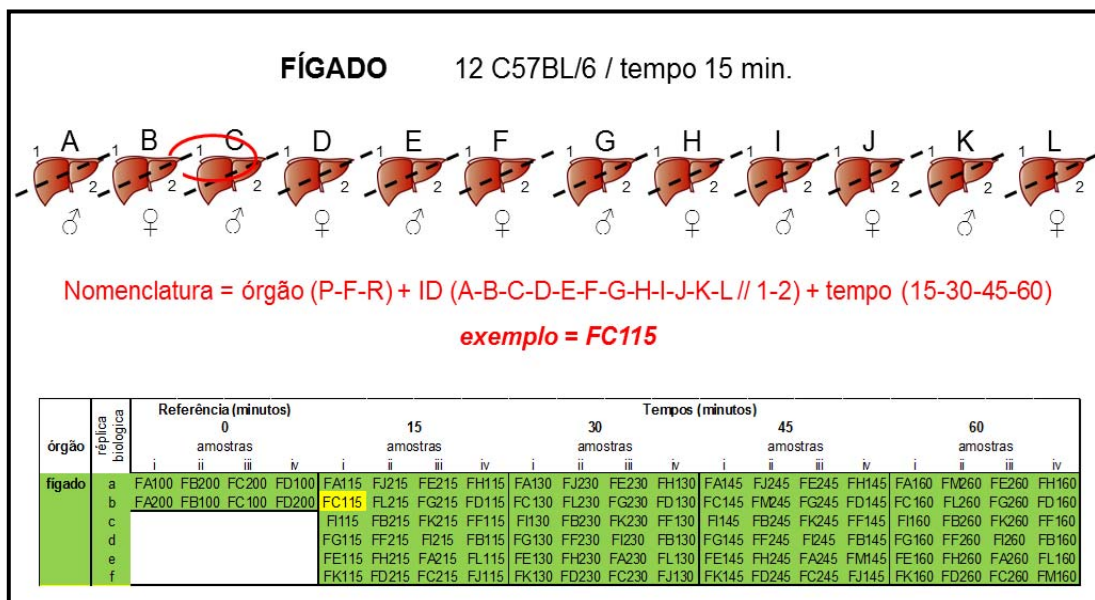


Figura 4 - Protocolo para formação das réplicas biológicas de fígado. Neste exemplo está representada uma amostra no tempo de 15 minutos. i= ♂anterior; ii= ♀posterior; iii= ♂posterior; iv=anterior.

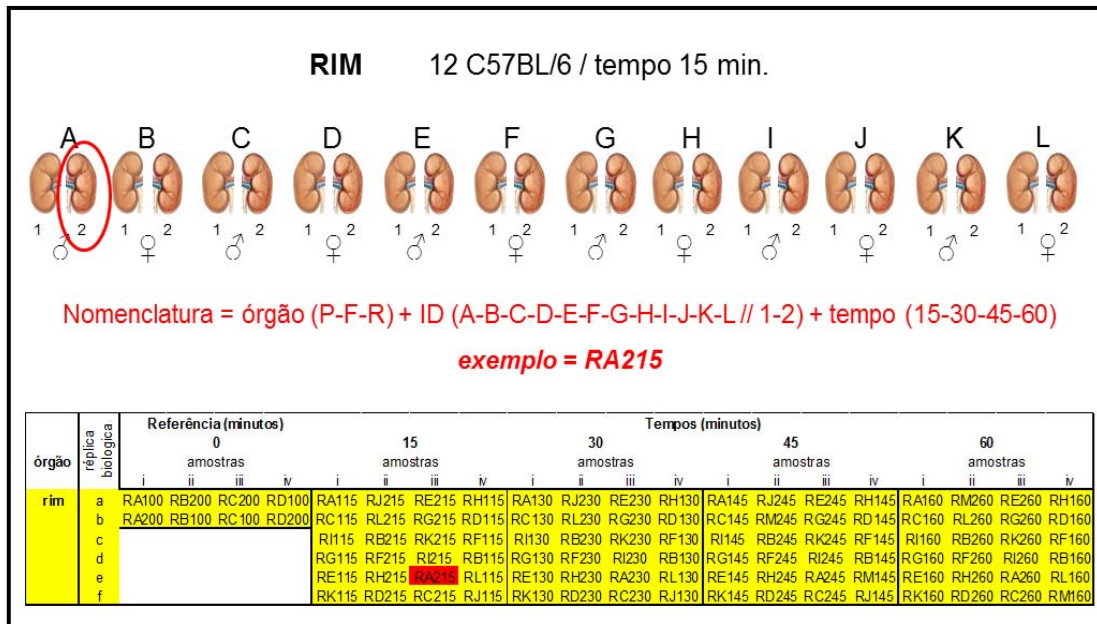


Figura 5 - Protocolo para formação das 6 réplicas biológicas de rim. Neste expemplo está representada uma amostra no tempo de 15 minutos. i= ♂direita; ii= ♀esquerda; iii= ♂esquerda; iv= ♀direita.

Quadro 1 - Ensaio das réplicas biológicas. i= ♂direita ou anterior; ii= ♀esquerda ou posterior; iii= ♂esquerda ou posterior; iv= ♀direita ou anterior.

órgão	réplica	Tempos (minutos)																			
		Zero amostras				15 amostras				30 amostras				45 amostras				60 amostras			
		i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv	i	ii	iii	iv
pulmão	1	A1	B2	C2	D1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	M2	E2	H1
	2	A2	B1	C1	D2	C1	L2	G2	D1	C1	L2	G2	D1	C1	M2	G2	D1	C1	L2	G2	D1
	3					I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1
	4					G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1
	5					E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	M1	E1	H2	A2	L1
	6					K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	M1
fígado	1	A1	B2	C2	D1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	M2	E2	H1
	2	A2	B1	C1	D2	C1	L2	G2	D1	C1	L2	G2	D1	C1	M2	G2	D1	C1	L2	G2	D1
	3					I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1
	4					G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1
	5					E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	M1	E1	H2	A2	L1
	6					K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	M1
rim	1	A1	B2	C2	D1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	J2	E2	H1	A1	M2	E2	H1
	2	A2	B1	C1	D2	C1	L2	G2	D1	C1	L2	G2	D1	C1	M2	G2	D1	C1	L2	G2	D1
	3					I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1	I1	B2	K2	F1
	4					G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1	G1	F2	I2	B1
	5					E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	L1	E1	H2	A2	M1	E1	H2	A2	L1
	6					K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	J1	K1	D2	C2	M1

No total foram geradas 288 amostras de tecidos nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos para os 3 órgãos, mais 24 referências no tempo zero, totalizando 312 amostras para extração do RNA total. A confecção dos *pools* de amostras que foram hibridadas nas lâminas de *microarray* consiste na junção de massas equivalentes do RNA total extraído de cada réplica biológica.

3.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Todos os tecidos foram submetidos à avaliação histológica antes da extração da molécula. Os tecidos congelados em freezer a -80°C foram retirados dos criotubos e imersos em Tissue-Tek® OCT Compound (Sakura® Finetek, Torrance, CA, EUA) para o corte de congelação. Secções de quatro micras do tecido foram cortadas em um criostato a -28°C e a lâmina foi avaliada com o auxílio de um microscópio pelo patologista Dr Antônio Hugo Campos.

3.5 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DO RNA TOTAL

A extração de RNA foi realizada pelo Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center seguindo o protocolo operacional padrão estabelecido internamente. Cerca de 30mg do tecido congelado foi homogeneizado pelo equipamento Precellys 24® (Carlsbad, California, USA) durante 4 ciclos de 10 segundos a 6.500rpm, depois centrifugado a 13.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi separado para extração do RNA total e o restante foi armazenado. O RNA total foi purificado usando o kit RNeasy Mini Qiacube (QIAGEN, Venlo, Holanda) de forma automatizada no

Qiacube (QIAGEN, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA). A integridade do RNA total foi avaliada utilizando o chip Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) no equipamento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). O Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA denominado RIN (do inglês: *RNA Integrity Number*) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro (Schroeder et al. 2006).

3.6 CONFECÇÃO DOS POOLS

Para cada *pool* foi aliquoteado 1 μ g do RNA total de 4 diferentes réplicas biológicas, conforme representado no **Quadro 2**. Ao todo foram confeccionados 42 *pools* para hibridação nas lâminas de *microarray*. Cada *pool* representa um volume de 40 μ l na concentração de 100ng/ μ l. Foram utilizados 100 ng de cada *pool* de RNA para marcação e hibridação.

Quadro 2 - Representação dos 42 *pools* confeccionados (destacado em azul).

	órgão		PULMÃO			FIGADO			RIM		
	réplica biológica		a	b	c	a	b	c	a	b	c
Referência (minutos)	pool réplica zero	i	1 pPa00	16 pPb00		6 pFa00	21 pFb00		11 pRa00	26 pRb00	
		ii	PA100	PA200		FA100	FA200		RA100	RA200	
		iii	PB200	PB100		FB200	FB100		RB200	RB100	
		iv	PC200	PC100		FC200	FC100		RC200	RC100	
			PD100	PD200		FD100	FD200		RD100	RD200	
Tempos (minutos)	pool réplica 15	i	2 pPa15	17 pPb15	31 pPc15	7 pFa15	22 pFb15	35 pFc15	12 pRa15	27 pRb15	39 pRc15
		ii	PA115	PC115	PI115	FA115	FC115	FI115	RA115	RC115	RI115
		iii	PJ215	PL215	PB215	FJ215	FL215	FB215	RJ215	RL215	RB215
		iv	PE215	PG215	PK215	FE215	FG215	FK215	RE215	RG215	RK215
	pool réplica 30	i	3 pPa30	18 pPb30	32 pPc30	8 pFa30	23 pFb30	36 pFc30	13 pRa30	28 pRb30	40 pRc30
		ii	PA130	PC130	PI130	FA130	FC130	FI130	RA130	RC130	RI130
		iii	PJ230	PL230	PB230	FJ230	FL230	FB230	RJ230	RL230	RB230
		iv	PE230	PG230	PK230	FE230	FG230	FK230	RE230	RG230	RK230
	pool réplica 45	i	4 pPa45	19 pPb45	33 pPc45	9 pFa45	24 pFb45	37 pFc45	14 pRa45	29 pRb45	41 pRc45
		ii	PA145	PC145	PI145	FA145	FC145	FI145	RA145	RC145	RI145
		iii	PJ245	PM245	PB245	FJ245	FM245	FB245	RJ245	RM245	RB245
		iv	PE245	PG245	PK245	FE245	FG245	FK245	RE245	RG245	RK245
	pool réplica 60	i	5 pPa60	20 pPb60	34 pPc60	10 pFa60	25 pFb60	38 pFc60	15 pRa60	30 pRb60	42 pRc60
		ii	PA160	PC160	PI160	FA160	FC160	FI160	RA160	RC160	RI160
		iii	PM260	PL260	PB260	FM260	FL260	FB260	RM260	RL260	RB260
		iv	PE260	PG260	PK260	FE260	FG260	FK260	RE260	RG260	RK260
			PH160	PD160	PF160	FH160	FD160	FF160	RH160	RD160	RF160

A nomenclatura do *pool* está descrita com uma letra “p” minúscula, seguido da letra correspondente ao órgão estudado (P-pulmão, F-figado e R-rim), da letra da réplica (a, b ou c) e do tempo de isquemia em minutos (15, 30, 45 ou 60). Abaixo da identificação de cada *pool* estão representadas os RNAs que o compuseram. Em laranja destaca-se o número do pool de amostra e sua respectiva ordem de hibridação da lâmina de array.

3.7 MARCAÇÃO E HIBRIDAÇÃO NO MICROARRAY

Foi utilizada neste estudo a hibridação competitiva, comparando-se todas as amostras contra uma referência comum, marcada com um corante fluorescente distinto da amostra teste, que se refere às amostras de interesse do estudo. As amostras teste e referência são misturadas e hibridadas em uma mesma lâmina. Como a hibridação é competitiva, a expressão de cada gene de cada amostra deve ser calculada através da razão entre a intensidade do sinal na amostra sobre a intensidade do sinal na referência; e as amostras serão comparadas entre si através da razão das razões. Dessa forma, o uso da amostra referência possibilita comparações de experimentos independentes

(NOVORADOVSKAYA et al. 2004). Foi empregada a Referência Universal de RNA (catálogo número 740100) composta de 11 linhagens celulares de camundongo contra a qual todas as amostras (inclusive as do tempo 0 min) foram comparadas. As 11 linhagens são de embrião, fibroblasto de embrião, rim normal, hepatócito - fígado, macrófago alveolar - pulmão, mioblastos, epiderme normal, células de Leydig - testículo normal, tumor de glândula mamária, linfócito β - mieloma e linfoma de célula-T.

Os cRNAs fluorescentes foram obtidos pela amplificação linear dos RNAs mensageiros a partir de 100 ng de RNA total isolado. A amplificação foi feita utilizando um conjunto de reagentes para amplificação e marcação do RNA mensageiro amplificado *Low Input Quick Amp Labeling Kit* (Agilent - USA) seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante. A plataforma utilizada para hibridação das amostras foi a *SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray* (028005, 8 chips/slide, duas cores, Agilent, USA), catálogo número 64852 - 60510, representando todos os genes conhecidos do genoma do camundongo e suas resultantes transcrições. A plataforma é composta por 41.534 sondas de oligonucleotídeos (de 60-mer) representando mais 41.000 genes e transcritos.

Para hibridação na plataforma *SurePrint G3 Mouse GE 8x60K* foram selecionadas 42 amostras representadas pelos *pools* das réplicas biológicas. As amostras do estudo foram submetidas a 2 ciclos de amplificação do mRNA e marcação com CY5, e utilizamos o “Spike B” como controle positivo da reação. Ao mesmo tempo a amostra de Referência Universal de camundongo foi amplificada e marcada com CY3 e o “Spike A” foi adicionado na reação como controle interno. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro para medir a eficiência da marcação. O

equipamento gera os valores de concentração do cRNA marcado e a concentração (pmoles/ul) do CY3 e do CY5 para cada amostra. A partir desses valores, a atividade específica da cianina (pmoles) é calculada multiplicando a concentração (pmoles/ul) do CY3 ou CY5 pela concentração do cRNA marcado.

Para a fragmentação e posterior hibridação foi misturado o volume referente a 300ng de cada *pool* de cRNA (marcado com Cy5 - vermelho) com 300ng da referência universal (marcado com Cy3 - verde).

Os *microarrays* foram hibridados com os alvos fluorescentes durante 17 horas à 65°C em forno de hibridação dedicado, utilizando o tampão de hibridação *Hi-RPM* fornecido pela Agilent. Após a hibridação as lâminas foram processadas utilizando tampões fornecidos pelo fabricante (Agilent, USA) para eliminação de alvos não específicos e eliminação de *background*. Neste processo, as lâminas foram retiradas do suporte e lavadas por 1 min em tampão de lavagem #1 à temperatura ambiente, seguido pelo tampão #2 por 1 min a 42°C. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de secagem que consiste nas lavagens em acetonitrila por 1 min e na solução de lavagem e estabilização para *microarrays* por 1 min. Os *arrays* foram digitalizados com o emprego do *Agilent Bundle Scanner* (Agilent, USA) com capacidade para 48 lâminas em resolução de 3µm. Selecionou-se no software *Agilent Scan Control* o perfil *AgilentG3_GX_2Color*, a região escaneada foi 61x21,6mm HD e resolução de 3µm.

3.8 PRÉ-PROCESSAMENTO: QUALIDADE DOS DADOS E FILTRAGEM

A análise de qualidade dos dados gerados no *microarray* foi realizado com ferramentas do R e o uso da biblioteca Agi4x44c (GONZÁLEZ et al. 2012) pelo bioinformata Dr. Cristobal Fresno (UCC-CONICET, Argentina), nosso colaborador inicial neste estudo e no estudo de base que o precedeu (DENNINGHOFF et al. 2017).

Com o uso do programa *Agilent Feature Extraction* (v10.0) foi possível subtrair o *background* local (valor de intensidade ao redor de cada spot) e extrair os valores de intensidade de cada *spot*, obtendo os valores de fluorescência correspondente à expressão de cada transcrito na amostra-teste e na amostra-referência. Também são feitas correções necessárias nos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo *Lowess*) a fim de eliminar as diferenças de eficiência da emissão de Cy3 e Cy5.

Cada *microarray* contém vários tipos de características, incluindo as que correspondem ao nosso modelo experimental, genes *housekeeping* / *spike-in* e controles. Assim, após a obtenção dos valores de expressão do gene em \log_2 , foi feita uma filtragem para reter na análise apenas as características que contribuíram para o experimento com o modelo animal. Medidas complementares de qualidade do fabricante ajudaram a excluir os recursos que poderiam atrapalhar a análise.

Outro aspecto importante é considerar as anotações de genes. Para esta plataforma de *microarray* utilizamos as informações do fabricante fornecidas pelo site da *Agilent E-Array*, que corresponde ao design 028005_D_AA_20150604. Além disso, utilizamos uma coluna complementar para indicar qual destes genes possui um

Entrez Gene ID na *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* - DAVID (HUANG et al. 2009 a, b).

Os passos de filtragem completos dos dados gerados no *microarray* estão incluídos no **Quadro 3**. Os genes com medidas repetidas estão identificados por símbolos de genes idênticos e estão resumidos num valor único por média. Todas as amostras do estudo passaram pelo controle de qualidade e seguiram para as análises.

Quadro 3 - Critérios de filtragem e anotação dos genes.

Descrição do filtro	Incluído	Excluído	Total
Arquivo txt inicial			62.976
Remoção dos controles	59.305	3.671	62.976
Anotação			59.305
Entrez Gene ID Válido	36.094	23.211	59.305
Símbolo do gene (média)	24.391	11.703	36.094
Em DAVID	23.683	708	24.391
Genes Ortólogos	14.185	9.498	23.683

3.9 ANÁLISE DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para todas as análises seguintes de expressão gênica consideramos significativos somente os genes com $p < 0.05$ e *fold-change* (FC) ≥ 2 . Foi feita a correção do p valor (Bonferroni) porém, devido ao baixo número amostral, não foi possível seguir as análises com o p corrigido.

Os *Heatmap* e a clusterização foram feitos com a ferramenta *ComplexHeatmap* no pacote disponível para o programa R. Para avaliar a variância entre tempos e entre órgãos foi feita uma análise ANOVA. Também realizamos uma análise estatística de *Bootstrap*, uma técnica ou método de simulação, que objetiva a obtenção de intervalos

de confiança para as estimativas dos parâmetros de interesse, por reamostragem do conjunto de dados original.

Para todas as análises incluímos somente os genes ortólogos entre camundongos e humanos para direcionar a relevância dos achados, e com $p < 0.05$ e *fold-change* (FC) [2]. Os genes ortólogos foram buscados no banco de dados <http://www.informatics.jax.org/homology.shtml>. Foi feito o download do banco de dados e comparado com cada uma das listas geradas, removendo genes que não apareciam na planilha.

Foi realizada uma análise *time-series* utilizando a ferramenta maSigPro (<https://bit.ly/2TR1ZrR>) disponível para o programa R, considerando somente genes ortólogos.

Para a identificação de genes diferencialmente expressos entre os grupos foi utilizado pacote limma (RITCHIE et al. 2015), disponível para o programa R. Foi feita uma análise entre tempos 0 (*baseline*) contra os demais tempos (0 x 15, 0 x 30, 0 x 45, 0 x 60) em cada um dos 3 órgãos.

O diagrama de Venn foi feito com o auxílio do pacote ggplot2 disponível para o R (<https://www.r-project.org/>). Para essa análise também foram considerados os genes diferencialmente expressos entre os tempos 0 (*baseline*) contra os demais tempos 15, 30, 45 e 60 minutos e entre órgãos.

Para a análise de enriquecimento de vias e processos biológicos consideramos os bancos de dados REACTOME, *Gene Ontology* (processo biológico) e “*Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA)”. Fizemos também a anotação funcional para baseada no *Gene Ontology*.

Após investigação no banco de dados GSEA buscamos por módulos que fossem relacionados com isquemia e hipoxia. Assim, foram selecionados os módulos de isquemia GO:0002931 (29 genes), hipoxia GO:1900037 (13 genes) e GO:0061418 (32 genes) e processos biológicos relacionados à oncogênese

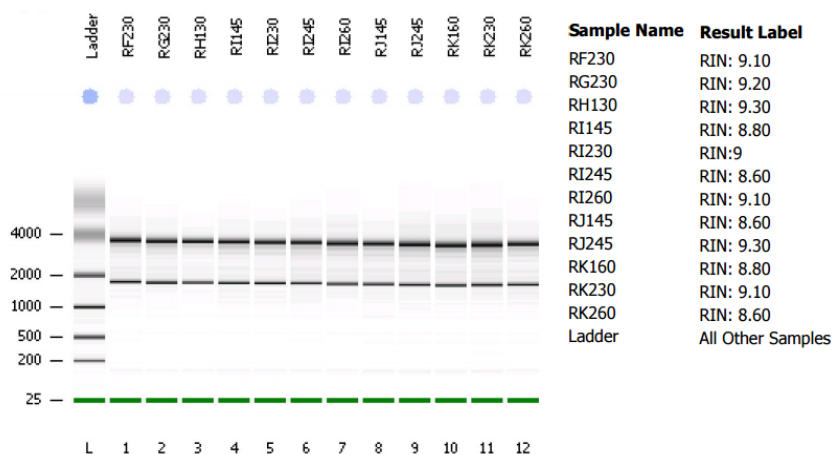
4 RESULTADOS

Os 26 camundongos machos e 26 fêmeas não tiveram diferença significativa em relação ao peso ($24,89 \pm 5,21$ gr) e em relação ao tempo de vida para cada sexo (104 ± 36 dias). As análises estatísticas para estas características estão descritas no nosso trabalho prévio (DENNINGHOFF et al. 2017).

4.1 QUALIDADE DOS RNAs EXTRAÍDOS

As extrações de RNA foram realizadas no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. No total foram extraídos 312 RNAs 288 nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos e 24 nas referências. Os RNAs extraídos tiveram alta qualidade, representada pela pureza, rendimento e integridade. A pureza está representada pelos valores de razão R260/280 e R260/230, o rendimento em microgramas pelo valor da concentração multiplicado pelo volume e a integridade pelo valor de RIN gerado pelo Bioanalyzer.

A **Figura 6** mostra um exemplo do resultado da análise por eletroforese capilar no equipamento Bioanalyzer do RNA total isolado e processado no Banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center.



Legenda: “L” é o *ladder* ou marcador de peso molecular. A numeração de 1 a 12 representam as amostras de RNA total de rim (“R”) em diferentes tempos de isquemia (30, 45 e 60). As bandas em 1800 e 4000 pb (pares de base) correspondem aos rRNA 18S e 28S respectivamente.

Figura 6 - Integridade do RNA total no gel de Eletroforese no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

A análise estatística da pureza e da integridade do RNA total apresentado pelo algoritmo do RIN das amostras coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos em todos os 312 RNAs foi apresentado no nosso estudo prévio. Nessa análise concluiu-se que não há diferença significativa entre os valores de pureza representados pela razão 260/280 e razão 260/230. Também não se observa alteração significativa na integridade da molécula de RNA ao longo do tempo de isquemia nos 3 tecidos do estudo (DENNINGHOFF et al. 2017).

Para o presente estudo selecionamos 168 amostras de RNA do total dos 312 RNAs extraídos, sendo 144 amostras de tecidos nos quatro tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) para os três órgãos estudados, mais 24 referências no tempo zero (**Quadro 4**) para confecção do pool de RNA total que foi hibridado no *microarray*. As amostras selecionadas para o *pool* tiveram valor de RIN de 9,2 na média, desvio padrão 0,5 e mediana 9,4. Os RNAs utilizados tiveram alta qualidade, de forma que o RIN não resultasse em fator de viés neste estudo.

Quadro 4 - Dados de qualidade (pureza, concentração e integridade) dos 168 RNAs totais purificados nos três órgãos.

	PULMÃO					FÍGADO					RIM				
	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN
TEMPO ZERO	PA100	2,1	1,9	0,135	10,0	FA100	2,1	2,1	1,367	9,5	RA100	2,2	2,2	0,750	9,5
	PA200	2,1	2,1	0,312	7,9	FA200	2,1	1,7	0,175	8,7	RA200	2,2	2,0	0,667	10,0
	PB100	2,1	1,8	0,468	8,3	FB100	2,1	2,2	1,997	9,1	RB100	2,2	2,2	0,863	10,0
	PB200	2,1	2,2	0,271	9,7	FB200	2,1	2,0	2,026	9,9	RB200	2,1	2,2	1,578	9,9
	PC100	2,2	2,2	0,623	10,0	FC100	2,1	1,9	0,299	9,0	RC100	2,1	2,1	1,882	10,0
	PC200	2,1	2,2	0,403	8,5	FC200	2,1	2,2	0,940	9,9	RC200	2,1	2,2	1,664	10,0
	PD100	2,1	2,2	0,512	8,9	FD100	2,1	1,0	0,576	9,7	RD100	2,2	2,1	0,916	10,0
	PD200	2,1	1,6	0,236	8,5	FD200	2,1	1,7	0,883	9,0	RD200	2,2	2,0	0,568	9,9
TEMPO 15 minutos	PA115	2,1	2,1	0,405	9,8	FA115	2,0	0,8	0,180	9,7	RA115	2,1	2,3	1,581	8,2
	PB215	2,1	2,2	1,571	8,9	FB215	2,1	2,1	0,163	9,0	RB215	2,1	2,3	1,102	9,5
	PC115	2,1	2,2	0,402	9,5	FC115	2,1	2,2	2,191	9,2	RC115	2,1	2,1	0,853	9,3
	PD115	2,1	2,1	0,396	9,6	FD115	2,1	2,2	1,411	9,3	RD115	2,2	2,2	0,750	9,6
	PE215	2,1	1,8	0,164	8,5	FE215	2,0	2,1	2,737	9,4	RE215	2,1	2,2	1,180	9,5
	PF115	2,1	2,2	0,265	9,7	FF115	2,1	2,0	1,415	9,8	RF115	2,1	2,2	1,166	8,9
	PG215	2,1	2,0	0,204	10,0	FG215	2,1	1,8	1,674	10,0	RG215	2,2	2,2	1,058	9,5
	PH115	2,1	2,1	0,201	8,9	FH115	2,1	2,2	1,642	9,2	RH115	2,1	2,3	1,276	9,4
	PI115	2,1	2,2	0,294	7,8	FI115	2,1	1,7	2,377	10,0	RI115	2,1	2,3	1,258	9,5
	PJ215	2,1	2,1	0,381	10,0	FJ215	2,1	2,1	1,618	9,8	RJ215	2,1	2,2	1,417	9,9
	PK215	2,1	1,9	0,174	8,3	FK215	2,1	1,9	0,321	9,9	RK215	2,2	2,2	1,229	9,5
	PL215	2,1	2,1	0,334	9,1	FL215	2,1	1,1	0,261	9,7	RL215	2,1	2,2	1,615	10,0
TEMPO 30 minutos	PA130	2,1	2,2	0,969	10,0	FA130	2,0	2,2	0,450	9,0	RA130	2,1	2,2	1,113	8,5
	PB230	2,1	2,1	0,178	8,9	FB230	2,1	2,2	0,977	9,3	RB230	2,1	2,2	1,479	9,6
	PC130	2,1	2,1	0,255	9,7	FC130	2,1	2,1	1,826	9,8	RC130	2,1	2,2	1,651	9,2
	PD130	2,1	2,2	0,318	9,8	FD130	2,0	1,8	1,018	10,0	RD130	2,2	2,2	0,801	8,4
	PE230	2,2	1,4	0,099	9,4	FE230	2,1	1,9	2,125	9,5	RE230	2,1	2,2	1,160	9,6
	PF130	2,1	2,2	0,345	9,1	FF130	2,1	2,0	1,538	9,1	RF130	2,1	2,1	0,391	9,1
	PG230	2,1	2,2	0,314	8,8	FG230	2,0	1,3	0,198	9,3	RG230	2,2	2,2	0,647	9,2
	PH130	2,1	2,2	0,200	9,6	FH130	2,1	2,2	1,300	9,7	RH130	2,1	1,7	0,365	9,7
	PI130	2,1	2,0	0,266	9,6	FI130	2,0	1,8	0,447	9,7	RI130	2,1	2,3	1,242	9,5
	PJ230	2,1	1,7	0,349	8,8	FJ230	2,1	1,9	1,032	9,5	RJ230	2,2	2,2	1,070	9,5
	PK230	2,1	2,0	0,236	9,6	FK230	2,1	1,8	1,896	9,5	RK230	2,2	2,2	0,924	9,1
	PL230	2,1	1,8	0,140	9,3	FL230	2,1	2,1	2,051	8,6	RL230	2,2	2,1	0,490	9,8

Cont/ Quadro 4

	PULMÃO					FÍGADO					RIM				
	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN	ID RNA	R260 / 280	R260 / 230	Conc. (ug/ul)	RIN
TEMPO 45 minutos	PA145	2,1	2,0	0,127	9,6	FA145	2,0	2,2	2,798	9,1	RA145	2,1	2,2	1,678	9,4
	PB245	2,1	2,1	0,126	9,6	FB245	2,0	1,9	0,425	9,5	RB245	2,1	2,1	0,326	8,6
	PC145	1,9	1,8	0,157	9,3	FC145	2,1	2,1	2,610	10,0	RC145	2,2	2,2	0,600	8,6
	PD145	2,1	1,8	0,251	9,3	FD145	2,1	2,1	0,379	9,4	RD145	2,1	1,7	0,662	8,5
	PE245	2,1	2,2	0,326	9,6	FE245	2,1	2,3	1,263	8,8	RE245	2,2	2,2	0,800	8,5
	PF145	2,2	2,1	0,618	10,0	FF145	2,1	2,2	1,918	9,4	RF145	2,2	2,1	0,843	8,3
	PG245	2,1	2,0	0,256	10,0	FG245	2,1	2,1	0,937	9,1	RG245	2,1	2,2	1,099	8,7
	PH145	2,2	2,1	0,587	9,8	FH145	2,1	2,1	1,063	8,8	RH145	2,2	2,1	0,722	8,9
	PI145	2,1	2,2	0,337	9,2	FI145	2,1	2,2	0,695	8,4	RI145	2,2	2,1	0,607	8,8
	PJ245	2,1	2,2	0,350	9,2	FJ245	2,1	1,9	0,117	8,4	RJ245	2,2	2,0	0,699	9,3
	PK245	2,1	2,2	0,228	5,9	FK245	2,1	2,2	2,216	8,7	RK245	2,2	2,2	0,816	9,6
	PM245	1,9	1,5	0,055	7,4	FM245	2,1	1,5	0,146	8,0	RM245	2,2	2,2	0,764	9,6
TEMPO 60 minutos	PA160	2,1	2,0	0,157	9,3	FA160	2,1	1,8	2,359	9,5	RA160	2,1	2,2	1,594	9,3
	PB260	2,1	2,1	0,232	10,0	FB260	2,1	2,0	1,685	9,6	RB260	2,2	2,2	0,766	8,4
	PC160	2,1	2,1	0,402	10,0	FC160	2,1	2,1	1,455	9,3	RC160	2,2	2,0	0,224	8,0
	PD160	2,1	2,2	0,845	9,7	FD160	2,1	2,0	2,092	10,0	RD160	2,2	2,2	0,748	8,2
	PE260	2,0	1,9	0,244	9,6	FE260	2,0	0,5	0,142	7,6	RE260	2,2	2,2	0,747	8,6
	PF160	2,1	2,1	0,196	8,5	FF160	2,1	2,2	1,703	9,3	RF160	2,2	1,5	0,545	9,9
	PG260	2,1	1,9	0,197	9,9	FG260	2,1	2,2	1,864	9,7	RG260	2,2	2,2	1,041	8,9
	PH160	2,1	2,0	0,215	9,9	FH160	2,1	2,0	1,561	9,2	RH160	2,1	2,2	1,099	8,9
	PI160	2,1	2,0	0,272	8,2	FI160	2,1	2,2	1,565	9,3	RI160	2,1	2,1	0,235	9,1
	PK260	2,1	1,2	0,124	9,8	FK260	2,1	2,2	1,890	8,9	RK260	2,1	2,3	0,368	8,6
	PL260	2,0	1,7	0,148	9,9	FL260	2,1	1,9	0,901	8,8	RL260	2,1	2,3	0,857	9,6
	PM260	2,1	1,8	0,172	7,6	FM260	2,1	2,1	1,567	9,0	RM260	2,2	2,0	0,624	9,5

ID RNA: identificação do tubo de RNA extraído; R 260/280: razão 260/280; RIN: *RNA integrity number*.

4.2 CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Para todas as análises, consideramos somente os 14.185 genes ortólogos entre camundongos e humanos, resultando em um total de 754 genes diferencialmente expressos em pulmão, 887 em fígado e 769 em rim. Todos os 42 *pools* de amostras do estudo, compondo as duplicatas no tempo zero e as triplicatas nos demais tempos de

isquemia em cada órgão, foram submetidos à clusterização hierárquica, com o objetivo de analisar a variância na expressão gênica e o perfil de similaridade dos genes entre as amostras. Nesta análise (**Figura 7**) os *heatmaps* foram gerados pelo resultado obtido com o teste ANOVA. Realizamos conjuntamente uma análise de *bootstrap* com 1.000 "reamostragens" para dar suporte e confiabilidade na separação dos grupos. As cores entre azul e vermelho representam o nível de expressão de um determinado gene para uma determinada amostra, sendo os genes superexpressos representados em vermelho e os pouco expressos, em azul. Todas as amostras do estudo (marcadas com Cy5 - cianina vermelha) foram hibridadas contra uma Referência Universal de RNA de camundongo (marcado com Cy3).

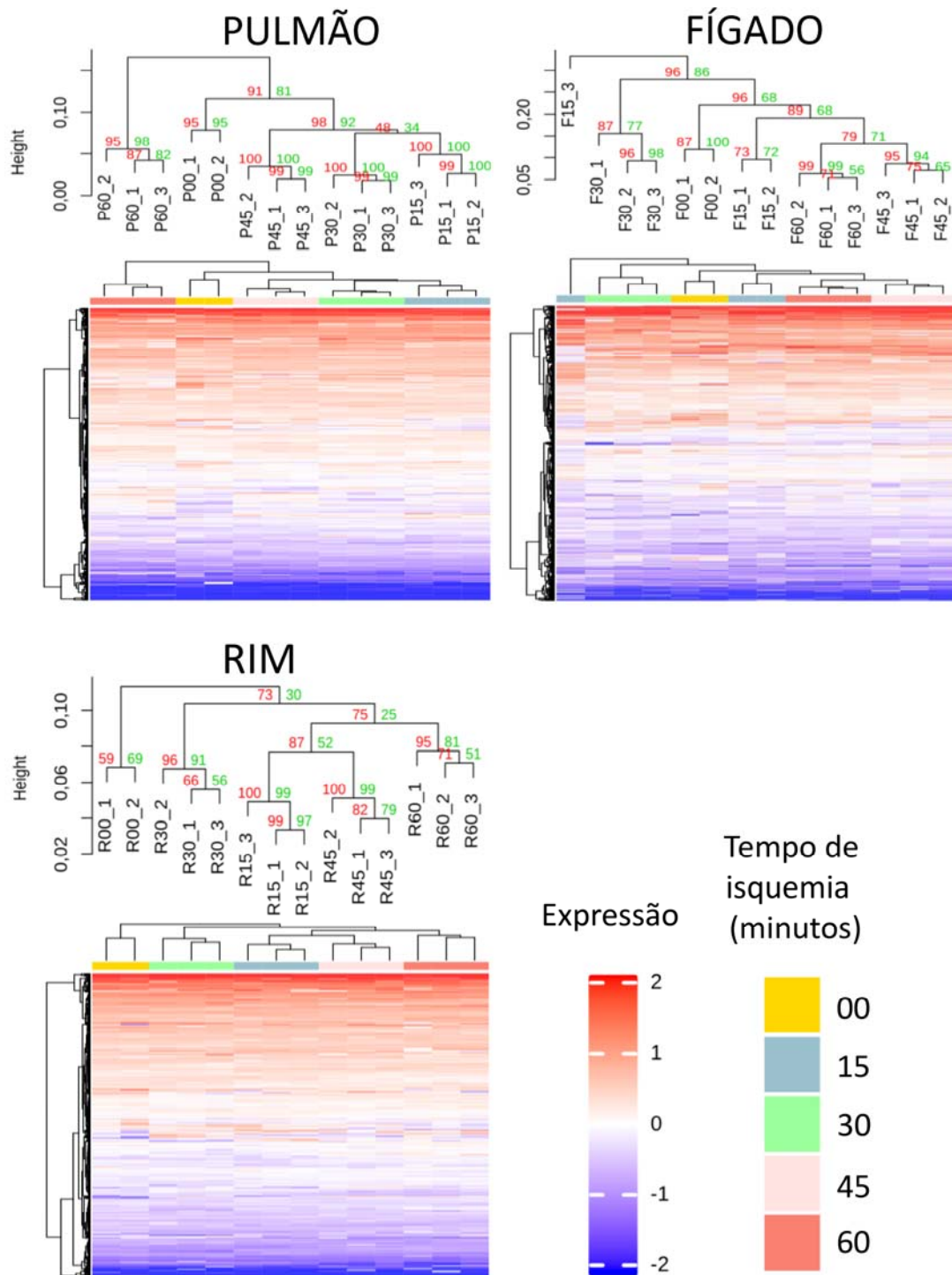


Figura 7 - Clusterização hierárquica não supervisionada baseada nos tempos de isquemia 0 15, 30, 45 e 60 nas amostras de pulmão, fígado e rim. Nos dendrogramas acima dos *heatmaps* estão os valores de porcentagem gerados no *bootstrap* e que dão suporte à separação dos grupos. Os genes superexpressos estão representados em vermelho e os pouco expressos, em azul. Análise de variância por ANOVA com $p < 0.05$.

Como resultado desta clusterização podemos observar um agrupamento das réplicas do estudo, com exceção de uma das réplicas no tempo 15 em fígado (F15_3). Também podemos verificar pequena variação global de expressão gênica entre os tempos em cada órgão.

4.3 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE OS GRUPOS

Na análise entre os grupos isolados, compondo o tempo 0 (*baseline*) contra os demais tempos (T0 x T15, T0 x T30, T0 x T45, T0 x T60) em cada um dos 3 órgãos, também consideramos somente os 14.185 genes ortólogos entre camundongos e humanos, com $p < 0.05$ e *fold-change* (FC) $|2|$ e foi utilizado o pacote limma, disponível para o programa R. No **Quadro 5** estão descritos os 10 genes mais (*upregulated*) e menos (*downregulated*) expressos em cada grupo representado pelo tempo de isquemia em cada um dos 3 órgãos (pulmão, fígado e rim).

Quadro 5 - Os 10 genes mais e menos expressos nos 3 órgãos nos 4 tempos de isquemia. Baseada nos genes ortólogos entre camundongos e humanos, $p < 0.05$ e *fold-change* (FC) |2|

	Pulmão				Fígado				Rim			
	Menos expressos		Mais expressos		Menos expressos		Mais expressos		Menos expressos		Mais expressos	
	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC	Gene	FC
Tempo 15 x 00	<i>Dkk4</i>	-9,68	<i>Mfsd4b</i>	7,42	<i>Gjb4</i>	-7,61	<i>Myoz2</i>	12,32	<i>Tekt1*</i>	-4,77	<i>Myl1*</i>	7,71
	<i>Scamp1*</i>	-4,59	<i>Mcmdc2</i>	3,54	<i>Chd1*</i>	-7,46	<i>Chpt1</i>	5,16	<i>Tlr7</i>	-4,18	<i>Gpr35*</i>	5,51
	<i>C12orf60</i>	-4,46	<i>Zp1*</i>	3,46	<i>Gpr35</i>	-6,24	<i>Nol4*</i>	4,64	<i>Calhm1</i>	-3,38	<i>Didol</i>	4,86
	<i>Dll1*</i>	-4,26	<i>Olfm2</i>	3,37	<i>Cdh17</i>	-5,14	<i>Kcne3</i>	4,42	<i>Gcnt7*</i>	-3,13	<i>Myh8</i>	4,75
	<i>Pnpo</i>	-4,23	<i>Ccdc60</i>	3,28	<i>Dzank1</i>	-5,09	<i>Scnn1b</i>	4,28	<i>Tbata</i>	-2,99	<i>Krt77</i>	3,75
	<i>Znhit6</i>	-4,17	<i>Clec5a*</i>	3,03	<i>Ubox5*</i>	-4,75	<i>Dnajb9</i>	3,62	<i>Snap91</i>	-2,95	<i>Crhbp</i>	3,57
	<i>Slc5a9</i>	-4,16	<i>Anxa4</i>	2,56	<i>Itgav</i>	-4,69	<i>Vgll2</i>	3,54	<i>Fam24a*#</i>	-2,88	<i>C11orf71</i>	3,15
	<i>Phc3</i>	-3,97	<i>Lingo4</i>	2,45	<i>Dact1*</i>	-4,66	<i>Ccn6*</i>	3,36	<i>Palmd</i>	-2,67	<i>Fos</i>	3,13
	<i>Spsb4#</i>	-3,51	<i>Kremen2</i>	2,27	<i>Ppargc1b</i>	-4,20	<i>Klk5</i>	3,17	<i>Cd84</i>	-2,59	<i>Mob1a</i>	3,01
	<i>Slc16a6</i>	-3,45	<i>Pou2f3</i>	2,21	<i>Dnmbp</i>	-4,13	<i>Gpr33*</i>	3,08	<i>Ptpn5</i>	-2,55	<i>Kcnmb2*</i>	3,00
Tempo 30 x 00	<i>Btg1*</i>	-5,33	<i>Kif17</i>	3,95	<i>Chmp4c</i>	-6,88	<i>Rgs16</i>	7,32	<i>Col17a1</i>	-4,07	<i>Plekhg1</i>	5,44
	<i>Itgad</i>	-4,45	<i>Syn2</i>	3,53	<i>Acer2</i>	-4,97	<i>Psm8</i>	4,43	<i>Tekt1*</i>	-3,49	<i>Myl1*</i>	5,11
	<i>Rgn</i>	-4,02	<i>Casq1</i>	3,48	<i>Hnrnp1</i>	-4,30	<i>Gpr33*</i>	4,01	<i>Suco</i>	-3,00	<i>Efcab5</i>	4,60
	<i>Draxin</i>	-3,38	<i>Hsfy1</i>	3,37	<i>Ubox5*</i>	-4,04	<i>Hpca</i>	3,44	<i>Kif20b</i>	-2,87	<i>Wnt16*</i>	4,36
	<i>P2ry4*</i>	-3,29	<i>Zswim5</i>	3,28	<i>Slc26a6</i>	-3,63	<i>Adamts18</i>	3,29	<i>Cdkal1*</i>	-2,85	<i>Col12a1*</i>	3,88
	<i>Lrguk</i>	-3,16	<i>Mos</i>	3,17	<i>Ikzf4</i>	-3,50	<i>Il1rn#</i>	3,27	<i>Rai1*</i>	-2,83	<i>Sycp2l*</i>	3,74
	<i>Dll1*</i>	-3,10	<i>Slc26a3*</i>	3,09	<i>Trim2</i>	-3,44	<i>Gxyl2</i>	2,94	<i>Kif27</i>	-2,83	<i>Cxcl3</i>	3,58
	<i>Fam24a*#</i>	-2,98	<i>Clec5a*</i>	2,96	<i>Spsb4#</i>	-3,35	<i>Ccn6*</i>	2,93	<i>Ccdc112</i>	-2,76	<i>Blk</i>	3,38
	<i>Ugt2a1</i>	-2,87	<i>Ankk1</i>	2,86	<i>Ppcdc</i>	-3,22	<i>Ccdc110</i>	2,90	<i>Iws1*</i>	-2,72	<i>Kcnmb2*</i>	3,33
	<i>Tacstd2</i>	-2,85	<i>Trim14*</i>	2,62	<i>Pacrgl</i>	-3,20	<i>Zp1</i>	2,80	<i>Akap6</i>	-2,71	<i>Cmya5</i>	3,33
Tempo 45 x 00	<i>Btg1*</i>	-5,33	<i>Bend7</i>	3,28	<i>Cabyr*</i>	-13,50	<i>Gngt1</i>	7,11	<i>Abcc6</i>	-3,54	<i>Wnt16*</i>	4,36
	<i>Kazn</i>	-4,33	<i>Slc26a3*</i>	3,09	<i>Serpina9</i>	-8,45	<i>Calml3</i>	5,77	<i>Arhgef38</i>	-3,31	<i>Il1rn#</i>	3,96
	<i>Scamp1*</i>	-4,23	<i>Pvalb</i>	3,04	<i>Dact1*</i>	-6,34	<i>Sgo2*</i>	5,19	<i>Kiaa0754</i>	-3,27	<i>Col12a1*</i>	3,88
	<i>Nsun6</i>	-3,33	<i>Fhdc1</i>	2,99	<i>Pde4dip</i>	-6,33	<i>Agxt2</i>	4,34	<i>Rai1*</i>	-2,83	<i>Sycp2l*</i>	3,74
	<i>P2ry4*</i>	-3,29	<i>Zp1*</i>	2,88	<i>Il22ra1*</i>	-5,98	<i>Gpr33*</i>	4,21	<i>B3gnt6</i>	-2,78	<i>Kcnmb2*</i>	3,33
	<i>Mmp12</i>	-3,10	<i>Cxcl6</i>	2,65	<i>Lancl2</i>	-5,41	<i>Nhlrc1</i>	4,14	<i>Iws1*</i>	-2,72	<i>Kbtbd12</i>	3,26
	<i>Sphkap</i>	-3,03	<i>Trim14*</i>	2,62	<i>Klhl33</i>	-5,07	<i>Necab1</i>	3,79	<i>Spata21</i>	-2,56	<i>Iqcn</i>	3,25
	<i>Fam24a*#</i>	-2,98	<i>Gckr</i>	2,60	<i>Noxred1</i>	-5,06	<i>Pabpc4l</i>	3,75	<i>Fam24a*#</i>	-2,43	<i>Ankef1</i>	2,84
	<i>Galr3</i>	-2,91	<i>Slitrk3</i>	2,58	<i>Mycn</i>	-4,91	<i>Arrdc3</i>	3,72	<i>Gcnt7*</i>	-2,28	<i>Sh2d1a</i>	2,84
	<i>C16orf95</i>	-2,84	<i>Fabp9</i>	2,53	<i>Agap2</i>	-4,70	<i>Pde4b</i>	3,19	<i>Sdk2</i>	-2,22	<i>Insm1*</i>	2,69
Tempo 60 x 00	<i>Btg1*</i>	-7,01	<i>Pm20d1</i>	7,94	<i>Cabyr*</i>	-22,77	<i>S100b</i>	8,16	<i>Atf7ip2</i>	-4,18	<i>Insm1*</i>	5,66
	<i>Ginn1</i>	-5,27	<i>Fgb</i>	6,80	<i>Ppargc1a</i>	-7,74	<i>Cass4</i>	6,91	<i>Nwd2</i>	-3,57	<i>Gpr35*</i>	5,57
	<i>Rhobtb3</i>	-5,18	<i>Cfap206</i>	6,58	<i>Lrrc29</i>	-7,01	<i>Nanos1</i>	6,72	<i>Fbxl21p</i>	-3,51	<i>Slc17a4</i>	4,91
	<i>Ppp1r12b#</i>	-5,04	<i>Adamts17</i>	5,72	<i>Rgs4</i>	-6,14	<i>Sgo2*</i>	6,07	<i>Per2</i>	-3,34	<i>Asic2</i>	4,47
	<i>Fos</i>	-4,42	<i>Ambp</i>	5,46	<i>Il22ra1*</i>	-6,04	<i>Nol4*</i>	5,36	<i>Loc102723903</i>	-3,31	<i>Wnt16*</i>	4,21
	<i>Erfe</i>	-3,85	<i>Serpinc1</i>	5,05	<i>Chd1*</i>	-5,86	<i>Cysltr1</i>	5,05	<i>Ppp1r12b#</i>	-3,29	<i>Hmox1</i>	4,06
	<i>Krt71</i>	-3,79	<i>Rmdn2</i>	4,97	<i>Cobl</i>	-5,65	<i>Tnnt1</i>	4,42	<i>Svop</i>	-3,08	<i>Myocd</i>	3,80
	<i>Tlx2</i>	-3,67	<i>Arntl</i>	4,64	<i>Adamdec1</i>	-5,55	<i>Gpr33*</i>	4,00	<i>Cdh3</i>	-2,84	<i>Mro</i>	3,79
	<i>Fosb</i>	-3,61	<i>Kel</i>	4,55	<i>Slc13a4</i>	-5,51	<i>Mgat4d</i>	3,82	<i>Cdkal1*</i>	-2,84	<i>A1cf</i>	3,74
	<i>Egr1</i>	-3,42	<i>Prg4</i>	4,28	<i>Lrit2</i>	-5,40	<i>N6amt1</i>	3,77	<i>Prm3</i>	-2,65	<i>Derl3</i>	3,53

* gene expresso em tempos de isquemia diferentes dentro do mesmo órgão; #gene expresso em outros órgãos. FC: Fold change, representa o valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle.

Aos 15 minutos de isquemia fria os genes *Mfsd4b* (*major facilitator superfamily domain containing 4B*), *Myoz2* (*myozenin 2*) e o *My11* (*myosin, light polypeptide 1*) foram os que apresentaram maior expressão relativa nos órgãos pulmão, fígado e rim, respectivamente. Enquanto os genes *Dkk4* (*dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 4*) em pulmão, o *Gjb4* (*gap junction protein, beta 4*) em fígado e o *Tekt* (*tektin 1*) em rim apresentaram diminuição significativa de expressão em relação ao tempo zero no mesmo tempo de isquemia.

Com o intuito de identificar marcadores de isquemia independente do tecido de origem, fizemos uma abordagem com o auxílio dos diagramas de Venn, para buscar os genes comuns nos tempos de isquemia entre os diferentes órgãos (**Figura 8**). Porém não encontramos genes comuns entre os 3 órgãos (fígado, pulmão e rim) nos 4 grupos representados pelo tempo de isquemia (T00xT15, T00xT30, T00xT45 e T00xT60), não sendo possível identificar um marcador comum de isquemia independente do tecido de origem.

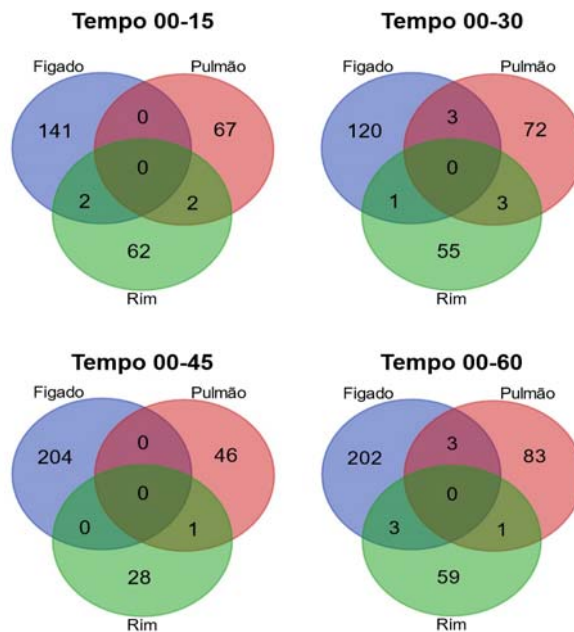


Figura 8 - Diagrama de Venn para identificação de genes ortólogos comuns entre os 3 órgãos. Os genes nos tempos de isquemia 15, 30, 45 e 60 foram comparados aos tempos zero (*baseline*). Para essa análise foram considerados os genes ortólogos diferencialmente expressos, $p < 0.05$ e $FC > |2|$.

Em outra análise, considerando cada órgão de forma isolada, buscamos genes que apresentaram diferença de expressão significativa em todos os tempos de isquemia quando comparado ao tempo zero (*baseline*) (**Figura 9**).

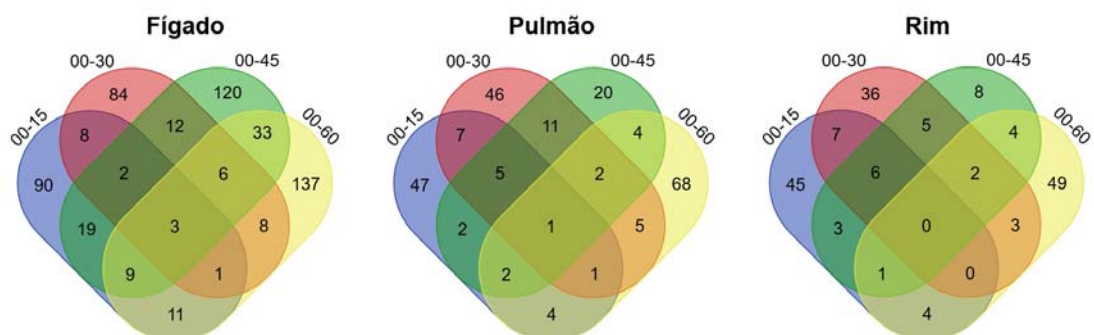


Figura 9 - Diagrama de Venn para identificação de genes ortólogos comuns nos tempos de isquemia em cada órgão isolado. Os genes nos tempos de isquemia 15, 30, 45 e 60 foram comparados aos tempos zero (*baseline*). Para essa análise foram considerados os genes ortólogos diferencialmente expressos, $p < 0.05$ e $FC > |2|$.

No fígado, 3 genes: *Ubox5* (*U box domain containing 5*), *Serac1* (*serine active site containing 1*) e *Gpr33* (*G protein-coupled receptor 33*) apresentaram diferença de expressão significativa em todos os tempos de isquemia (15, 30, 45 e 60 minutos) comparado ao tempo zero; no pulmão somente o gene *Btg1* (*B cell translocation gene 1, anti-proliferative*) e em rim não tivemos um gene comum com diferença de expressão significativa em todos os tempos de isquemia.

4.4 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS - *TIME-SERIES*

Para avaliar os genes diferencialmente expressos ao longo dos tempos de isquemias (*time-series*) foi realizada uma análise ANOVA utilizando a ferramenta *maSigPro* disponível para o programa R.

Nas **Figuras 10** (pulmão) **11** (fígado) e **12** (rim) a seguir estão apresentados os gráficos referentes às 10 sondas (genes) com expressão mais significativa em cada órgão gerado pelo algoritmo *maSigPro* e que teriam maior influência com relação ao tempo de isquemia.

Em pulmão destaca-se alguns genes com perfil de expressão temporal crescente significativa como apresentado pelo gene *Prelp* (*proline and arginine rich end leucine rich repeat protein*) e *Mmp3* (*matrix metalloproteinase 3*). E com perfil de expressão decrescente significativa do tempo zero aos 60 minutos para os genes *Fos* (*FBJ osteosarcoma oncogene*), *Rbm3* (*RNA binding motif protein 3*), *Ier2* (*immediate early response 2*), *Fosb* (*FBJ osteosarcoma oncogene B*), *Egr1* (*early growth response 1*), *Gzfl* (*GDNF-inducible zinc finger protein 1*) e *Gna13* (*guanine nucleotide binding protein, alpha 13*) (**Figura 10**).

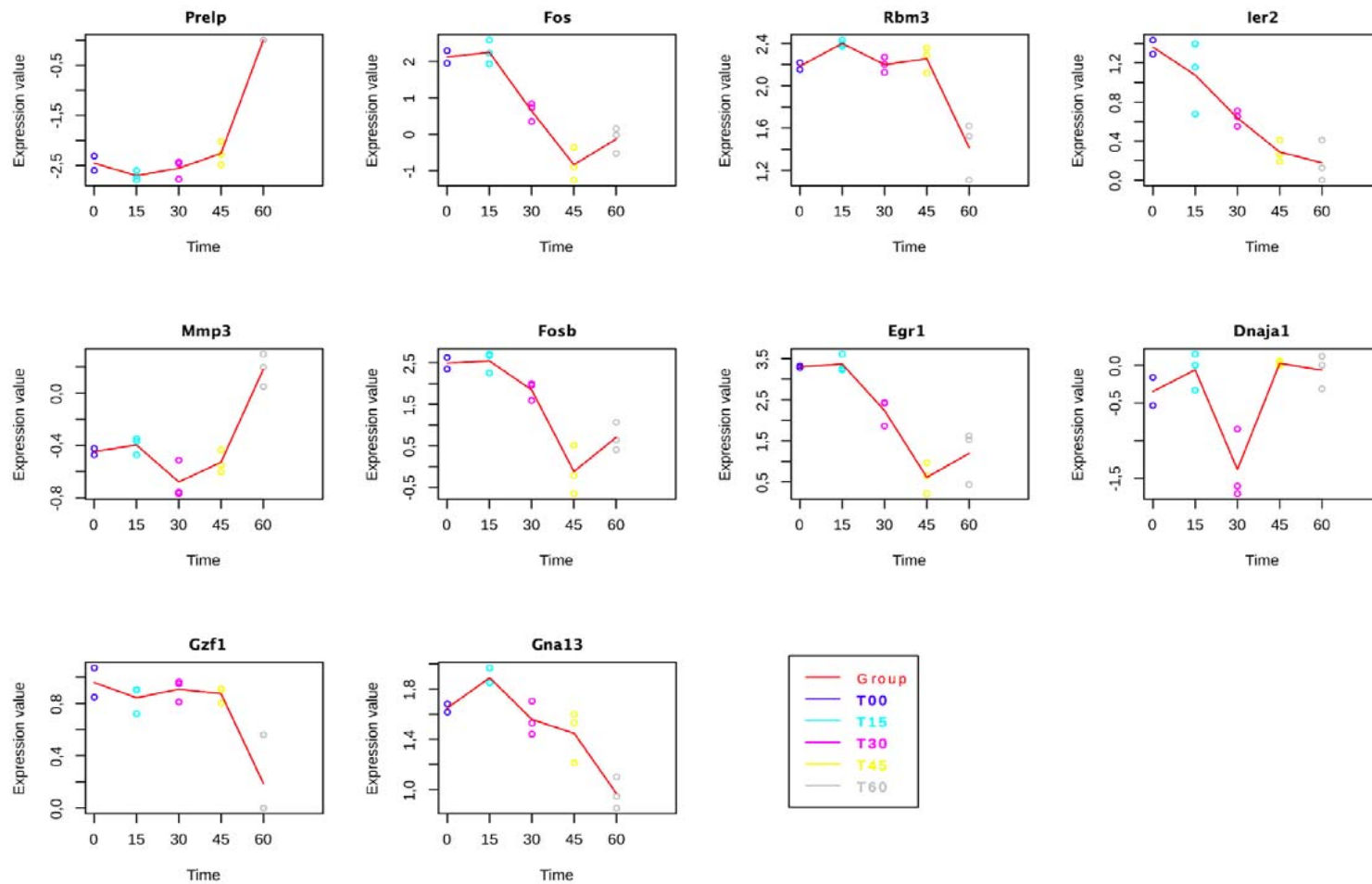


Figura 10 - Gráficos de perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em **pulmão** nos 5 tempos de isquemia avaliados. O eixo x representa a variável tempo e o eixo y os valores de expressão gênica. Os nomes dos genes representados nos gráficos estão destacados na parte superior.

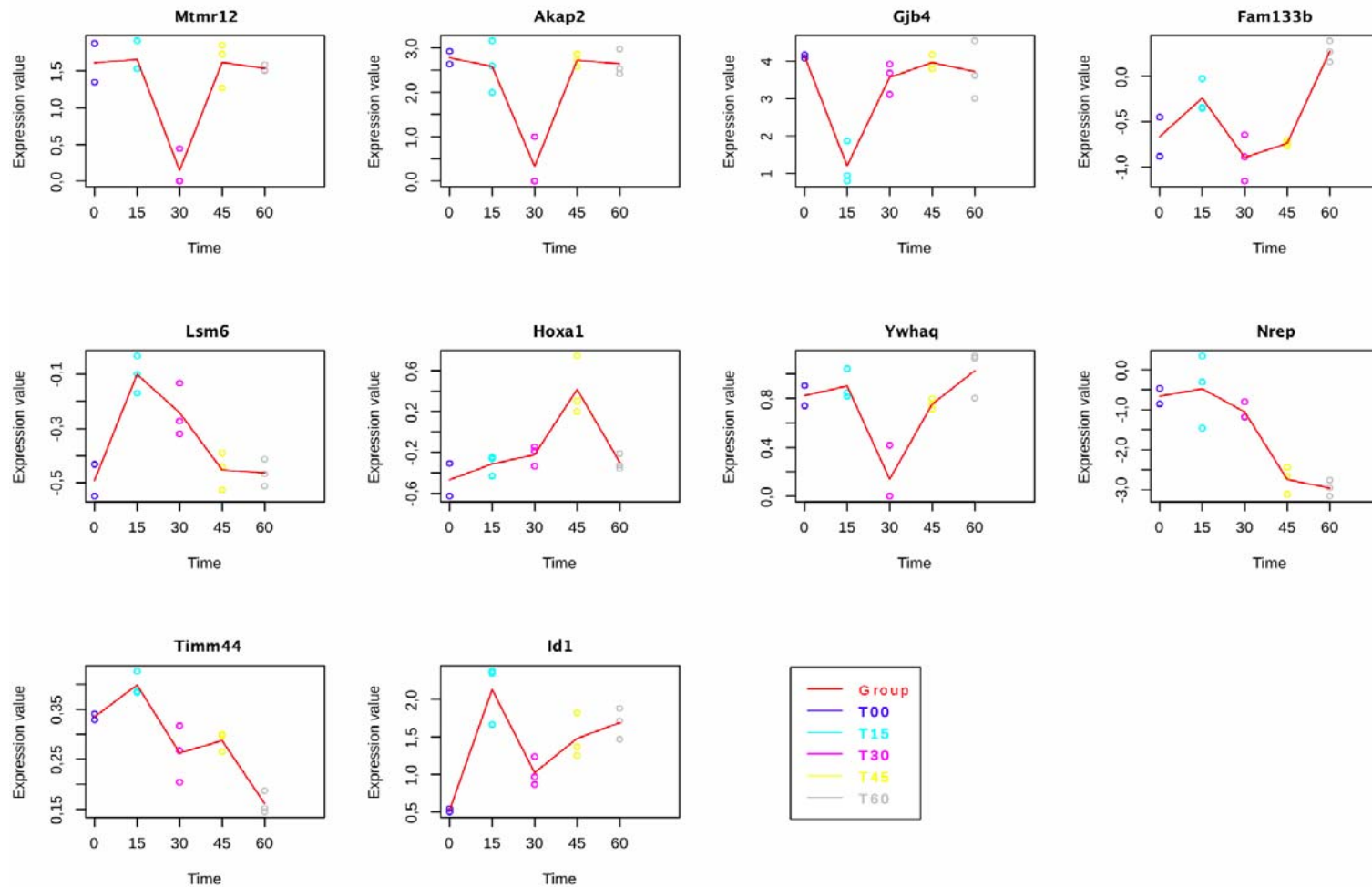


Figura 11 - Gráficos do perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em **fígado** nos 5 tempos de isquemia avaliados. O eixo x representa a variável tempo e o eixo y os valores de expressão gênica. Os nomes dos genes representados nos gráficos estão destacados na parte superior.

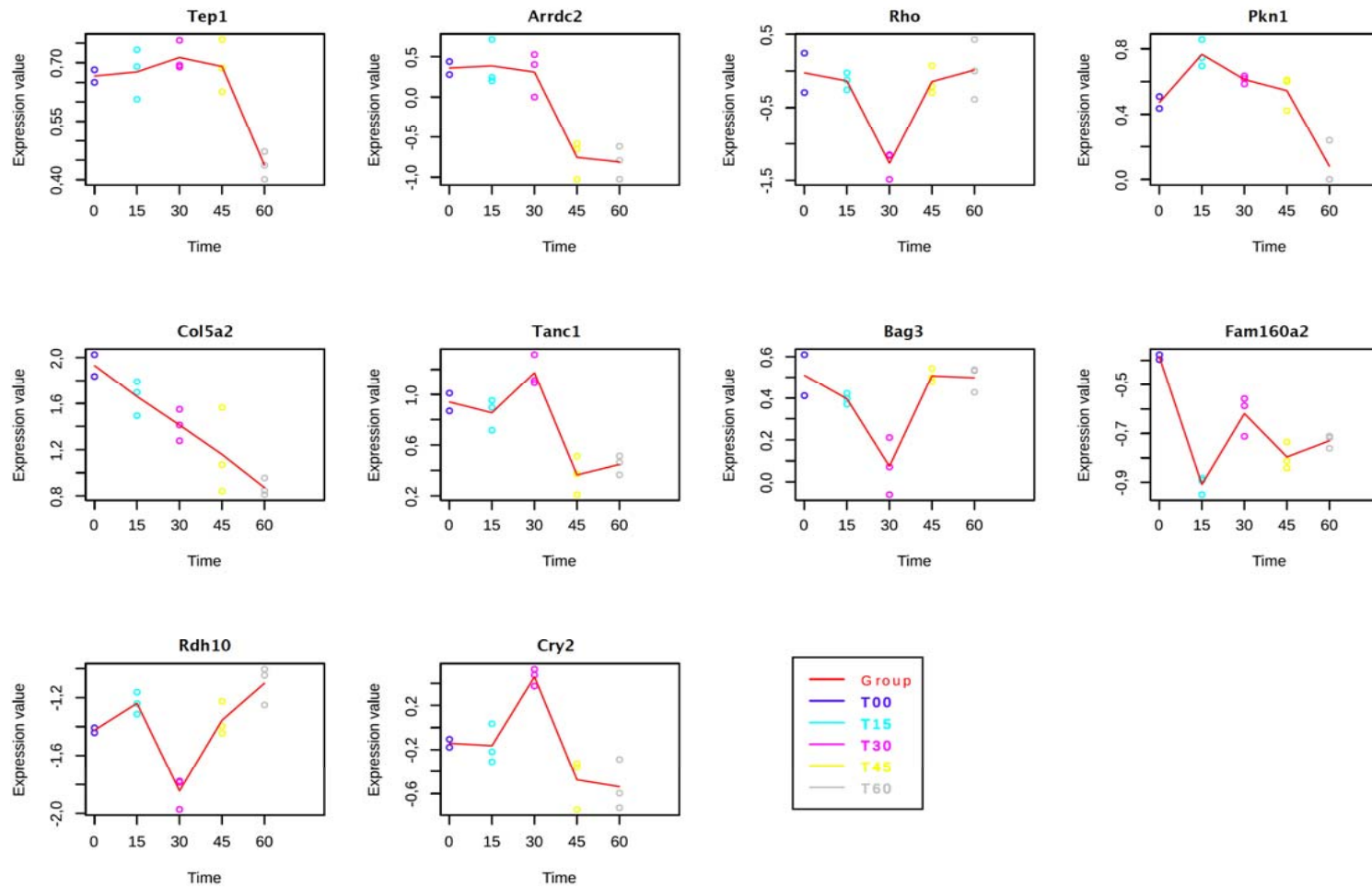


Figura 12 - Gráfico do perfil de expressão dos 10 genes ortólogos com maior significância em **rim** nos 5 tempos de isquemia avaliados. O eixo x representa a variável tempo e o eixo y os valores de expressão gênica. Os nomes dos genes representados nos gráficos estão destacados na parte superior.

No fígado, nos “top 10” genes com maior significância na avaliação temporal, destaca-se o gene *Nrep* (*neuronal regeneration related protein*) com a expressão decrescente ao longo do tempo de isquemia (**Figura 11**).

Em rim destacam-se os genes com perfil de expressão temporal decrescente significativa *Tep1* (*proteína 1 associada à telomerase*), *Aradc2* (*arrestin domain containing 2*) e *Col5a2* (*collagen, type V, alpha 2*) (**Figura 12**).

4.5 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO GÊNICO (GSEA)

A análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA) ou enriquecimento funcional é um método para identificar classes de genes que estão sobre representados em um grande conjunto de genes sob diferentes condições e pode ter uma associação com fenótipos de doenças. O método utiliza abordagens estatísticas para identificar grupos de genes significativamente enriquecidos ou depletados.

Uma vez que foram observadas diferenças no perfil de expressão ao longo do tempo de isquemia fria nos 3 órgãos, partimos para a identificação dos genes, processos biológicos e vias relevantes para este estudo.

Nas análises foram considerados os genes diferencialmente expressos com $p < 0.05$ e fold-change ≥ 2 , entre os tempos 15, 30, 45 e 60 minutos, tendo o tempo zero como referência e entre os diferentes órgãos (fígado, rim e pulmão). Os dados foram analisados utilizando o pacote limma, disponível para a plataforma R.

Nos módulos de isquemia GO:0002931 (29 genes), encontramos poucos genes diferencialmente expressos entre os tempos de isquemia quando comparado ao tempo zero (referência). O gene *Ppargc1a* (*peroxisome proliferative activated receptor*) foi

encontrado menos expresso no tempo 60 minutos no fígado (FC -7,74 e Pvalor 0,005), enquanto no rim os genes *Uchl1* (*ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*) e *Per2* (*period homolog 2*) foram encontrados mais expresso (FC 2,21 e Pvalor 0,025) e menos expresso (FC -3,34 e Pvalor 0,006) respectivamente.

Nos módulos de hipóxia GO:1900037 (13 genes) e GO:0061418 (32 genes), o gene *Hif3a* (*hypoxia inducible factor 3, alpha subunit*) foi encontrado menos expresso (FC -3,53 e Pvalor 0,039) no fígado no tempo 45 quando comparado ao tempo zero e o gene *Egr1* (*early growth response 1*) foi encontrado menos expresso (FC -3,41 e Pvalor 0,023) no pulmão no tempo 60.

Com o objetivo de avaliar uma possível assinatura de genes envolvidos com o processo de isquemia, também comparamos os genes significativos ($p < 0.05$; FC ≥ 2) entre tempos e entre órgãos de acordo com a categoria do gene no GSEA. Buscamos nesta assinatura genes com concordância de expressão, ou seja, grupos de genes com expressão aumentada ou expressão diminuída em todos os órgãos investigados. Porém não encontramos grupos de genes com concordância de expressão nos 3 órgãos simultaneamente.

Outra análise exploratória foi analisar vias e processos enriquecidos para o câncer e de acordo com a função categorizada no GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). No **Apêndice 1** estão os 166 genes (*Gene Ontology*) encontrados com diferença de expressão significativa com $p < 0,05$, de acordo com o tempo de isquemia, no pulmão (42 genes), fígado (101 genes) e rim (31 genes). Esses genes são fatores de transcrição (*Fos*, *Hif3a*) oncogenes (*Ret*, *Srsf3*), supressores tumorais (*Btg1*, *Hnf1a*), genes envolvidos no reparo do DNA, diferenciação e atividades de quinase.

Dos genes encontrados 43% são fatores de transcrição 14% proteínas com atividades de quinase 10% fatores de crescimento, 9% oncogenes, 7% marcadores de diferenciação celular 2% genes envolvidos no reparo do DNA e 1% supressores tumorais (**Figura 13**).

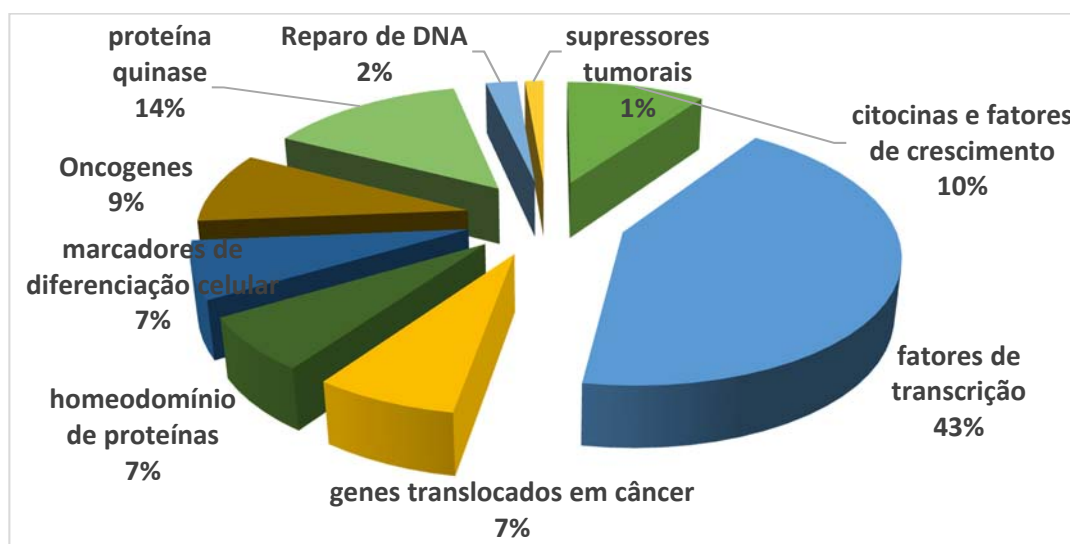


Figura 13 - Principais funções dos genes ortólogos encontrados com diferença de expressão significativa entre os tempos de isquemia (T00 x 15, T00 x 30, T00 x 45, T00 x 60) nos 3 órgãos de acordo com a classificação no GSEA enriquecido para genes de câncer.

Fizemos a análise de enriquecimento para processos biológicos (*Gene Ontology*) e vias (*Reactome*) para todos os órgãos e tempos, para observar se algum processo biológico ou via apareciam em comum entre os grupos. Nenhuma via foi identificada em comum, mas com relação a processos biológicos temos resultados de relevância para nosso estudo. No **Apêndice 2** apresentamos os resultados dos processos biológicos significantes e comuns entre os órgãos em cada tempo do estudo, tendo o fígado como órgão de comparação.

No tempo de 60 minutos tivemos 11 processos biológicos em comum entre os 3 órgãos. Não foram observados processos comuns entre os 3 órgãos (pulmao, fígado e rim) nos demais tempos de isquemia 15, 30 e 45.

5 DISCUSSÃO

O perfil de expressão gênica tem passado do cenário da pesquisa básica para a pesquisada aplicada, sendo cada vez utilizada na prática clínica (LI et al. 2015; PELLEGRINI et al. 2015; LIU et al. 2017; HE et al. 2019).

Assinaturas gênicas capazes de identificar corretamente pacientes com perfil de alto risco, bem como prever a resposta ao tratamento, estão atualmente sob intensa investigação (MARRONE et al. 2015; IZUMI et al. 2019; PAN et al. 2019).

Enquanto questões técnicas como a preparação do RNA, a escolha da plataforma de análise de expressão gênica e ferramentas de análise de estatística são levadas em conta, o processo de coleta de tecido raramente é considerado (ATHERTON et al. 2016; PEDERSEN et al. 2018).

Apesar da existência de procedimentos operacionais padrões bem estabelecidos para coletas de tecidos em Biobancos, o tempo decorrido entre a remoção do tecido no centro cirúrgico e o congelamento das amostras para caracterização biológica é raramente definido e/ou registrado adequadamente.

Nesse contexto, alguns estudos anteriores encontraram alterações na expressão de acordo com o tempo de isquemia, porém, os tempos utilizados eram muito variados, na maioria deles, fora do padrão estabelecido nos Biobancos (até 60 minutos) e/ou fizeram avaliação em tecidos humanos com doença. Tais fatores tornam estes estudos pouco controlados diante das inúmeras influências que a doença, ou às variáveis relacionadas ao processo cirúrgico, possam influenciar nos resultados. Alguns trabalhos publicados com avaliação do tempo de isquemia em modelo animal se

restringiram à avaliação da degradação do RNA, um dado que não é novidade. Complementarmente, um destes estudos utilizou tempos de até 6 horas, e não avaliou o impacto do tempo de isquemia sobre a expressão gênica.

No presente estudo, optamos pela escolha do modelo murino, pois seria difícil conseguir realizá-lo em tecido normal humano sem indicação cirúrgica prévia, com quantidade em massa suficiente para as análises, além da dificuldade em controlar todas as variáveis envolvidas no tempo pré-cirúrgico até a remoção do tecido de interesse para o *snap frozen*. A idade e gênero dos camundongos utilizados neste estudo não constituíram fatores de viés, conforme análise mostrada no trabalho prévio (DENNINGHOFF et al. 2017).

Os camundongos são um dos vertebrados mais utilizados nas pesquisas científicas. Estudos genômicos comparativos mostraram altos níveis de similaridade na sequência de nucleotídeos em regiões codificantes entre camundongos e humanos (MAKALOWSKI et al. 1996) o que permite a realização de estudos comparativos (CHORILLI et al. 2007). Outra vantagem de trabalhar com modelo animal livre de doença neoplásica é evitar a introdução de variável de doença, parâmetro de difícil controle com o uso de tecido de pacientes oncológicos. Além disso, para as análises de expressão gênica, só consideramos genes ortólogos entre camundongos e humanos para direcionar a relevância dos achados.

A abordagem em modelo animal traz muito mais confiança nos dados de medição dos tempos de isquemia temporais e sua influência na expressão gênica. Além disso nos permitiu exercer um controle estrito do tempo de isquemia fria, que não seria possível se fossem utilizadas amostras de tumores humanos coletadas em ambiente hospitalar.

Alguns estudos demonstraram que tecidos humanos com RIN maior que 7 poderiam ser usados para os ensaios de *arrays* gerando resultados robustos de expressão gênica (ASTERAND 2006; THOMPSON et al. 2007); aqueles com RIN entre 6,9 e 4,1 poderiam ser utilizados para qRT-PCR (FERREIRA et al. 2010), e os com RIN entre 4 e 1 poderiam ser aplicados para a ensaios de PCR com regiões mais curtas como alvo de amplificação (ASTERAND 2006; FLEIGE e PFAFFL 2006).

Em um estudo com modelo animal, HOSTETTER et al. (2014) utilizaram o RNA de rim para comparar o valor do RIN em 3 intervalos de tempos 0, 3 e 6 horas. Eles observaram uma progressiva degradação do RNA (8,2; 7,3 e 6.2 respectivamente), mas não houve diferenças na razão de pureza avaliada pela razão 260/280 medida pelo Nanodrop. A degradação do RNA foi validada por imunohistoquímica para um marcador de estresse celular *Xbp-1*. A mudança de expressão da proteína foi avaliada quantitativamente por imagem digital e pareceu igualar ou até mesmo anteceder a degradação do RNA pontuada pelo RIN.

Numa das maiores análises de qualidade de RNA e DNA em tecidos humanos, pela *Cooperative Human Tissue Network*, JEWELL et al. (2002) avaliaram a qualidade de vários tumores epiteliais e não encontraram declínio acentuado na qualidade de RNA nas primeiras 5 horas após excisão. Porém, poucos desses trabalhos avaliam o RNA quanto à expressão gênica.

Outro estudo de BAO et al (2013) com 51 tumores de cólon e 51 tecidos normais avaliou o tempo de isquemia *ex vivo* e observou que a integridade do RNA não teve um declínio acentuado no prazo de 4 h após a cirurgia.

Embora largamente usado para avaliar a qualidade geral do RNA de amostras biológicas, a medida do RIN é falha em refletir a influência de fatores externos que

podem interferir na modulação da expressão gênica, ainda que sem interferir na degradação do RNA. Múltiplos estudos relataram que não há diferença estatística no RIN e/ou há alterações mínimas nas taxas de RIN ($\leq 10\%$) ou 28S/18S durante os tempos de isquemia fria de 1 a 6 horas (OPITZ et al. 2010; LIU et al. 2013; MUSELLA et al. 2013; BAO et al. 2013).

Além disso, as técnicas utilizadas hoje para avaliar a integridade do RNA baseiam-se na avaliação da integridade do RNA total, que é composto por rRNA (RNA ribossomal que representa quase 80% do RNA total e é relativamente estável), mRNA (RNA mensageiro que representa 2-5% da amostra e é instável), tRNA (RNA transportador - aproximadamente 15% do total) e snRNA (RNA nuclear pequeno - menos de 1% do total). Com base nestes resultados e com o avanço da tecnologia, evidencia-se que o conceito de que o RIN do RNA total extraído do tecido deve ser maior que 7 para o mRNA ser útil pode ser equivocado, o que exige uma mudança de paradigma.

É importante ressaltar que a maioria dos estudos das relações do RIN ou 28S/18S sobre os efeitos da isquemia fria é realizada com amostras mantidas à temperatura ambiente (geralmente entre 22°C e 25°C) ou a 4°C, e iniciam a contagem do tempo de isquemia fria após os tecidos saírem da sala de cirurgia e/ou chegar na sala de congelação da patologia e não consideram o período de isquemia fria na sala de cirurgia ou durante o transporte. Mais importante, a maioria dos estudos não avalia os efeitos da isquemia quente, que provavelmente interage com os efeitos da isquemia fria (DE CECCO et al. 2009; BRAY et al. 2010; OPITZ et al. 2010; MUSELLA et al. 2013). Além disso, esses estudos são baseados no uso de somente uma ou duas amostras e, em alguns casos, um único diagnóstico (por exemplo, uma amostra de

câncer de cólon e uma amostra de cólon não neoplásico). Assim, a significância estatística discutida baseia-se no método de análise, em vez de comparar as mudanças entre várias amostras com o mesmo diagnóstico.

De qualquer forma, todos os RNAs utilizados para a análise desse estudo na plataforma de *microarray* apresentaram alta qualidade (**Quadro 4**), com RIN médio de 9,2 (mediana 9,4 e desvio padrão de 0,5). Portanto, não tivemos o viés da degradação do RNA como interferente na análise.

Um estudo usando prostatectomia laparoscópica assistida por robô relatou que as classificações do tipo de célula, por exemplo, estromal / epitelial, benigno / maligno e volume da próstata, são preditores significativos do RIN (DEV et al. 2011). Isso sugere que existem variações no RIN entre os tipos de células e, portanto, entre os órgãos devido à isquemia fria.

Nesse contexto, uma medida direta melhor a ser considerada na estabilidade do mRNA é a avaliação de mudanças nos transcritos de RNA medidas por "chips de genes", *microarray*, sequenciamento de RNA ou por RT-qPCR. Seguindo este pressuposto, buscamos identificar genes através da análise de expressão gênica por *microarray*, isolados ou em conjunto, cuja modulação de expressão foi influenciada pelo processo de isquemia fria ao qual as amostras biológicas em estudo foram submetidas.

Há na literatura relatos de tecidos cirúrgicos humanos expostos prospectivamente à isquemia fria, causando alterações em genes/transcritos, miRNA e proteínas (ATHERTON et al. 2016).

Com base em nossos achados é possível afirmar que o tempo de isquemia fria interfere na expressão gênica nos órgãos avaliados - pulmão, fígado e rim (**Quadro 5**),

apesar dessa diferença de expressão ser bem sutil entre os tempos de isquemia (**Figura 7**). Esta influência da isquemia fria na variação de expressão gênica foi observada por outros pesquisadores (DE CECCO et al. 2009; BRAY et al. 2010; BORGAN et al. 2011; LIU et al. 2013; MUSELLA et al. 2013; AKTAS et al. 2014; PEDERSEN et al. 2018).

Em um estudo PEKMEZCI et al. (2012) mostraram que o tempo de isquemia fria e/ou a fixação de formalina afetam predominantemente os tumores com baixa expressão do receptor de ER e PR e apoiam as recomendações das diretrizes ASCO / CAP, incluindo o tempo de isquemia fria menor que 1 hora.

Um trabalho realizado com amostras de câncer de mama demonstrou que 461 genes foram modulados pela mudança do tempo de congelamento, e que este atraso no congelamento afetou a detecção de fosfoproteínas, cujo padrão é crucial para a decisão clínica sobre o uso de drogas utilizadas em terapias-alvo (DE CECCO et al. 2009). Os epítomos fosforilados *p-Tyr*, *ERBB2-Tyr1248*, e *pTK2* (alias *FAK*) foram totalmente desnaturados após 24 horas de isquemia fria e eram indetectáveis no Western blot.

Um outro trabalho utilizando amostras de tumor de ovário demonstrou que, com a adequada manipulação das amostras e rigorosos procedimentos de controle de qualidade para a extração de RNA e da análise de *microarrays*, a classificação tumoral baseada em dados de expressão genética global não se viu prejudicada com um tempo de isquemia dentro de uma janela de 120 minutos (DUMUR et al. 2008).

LIN et al. (2006) identificaram 61 genes diferencialmente expressos como resultado da ressecção cirúrgica da próstata. O gene *DUSP1*, avaliado por *microarray* e RT-qPCR, mostrou aumento de expressão (14 vezes) após a cirurgia. Eles

identificaram também que a excisão cirúrgica induziu artificialmente a expressão de genes pertencentes à via c-jun-NH2-quinase (*JNK*), que pode ser mal interpretada como doença agressiva e resistência à quimioterapia.

Além de implicações da isquemia fria em nível transcricional, alguns dados têm demonstrado alterações em nível traducional. Usando eletroforese em gel bidimensional, JACKSON et al. (2006) compararam os perfis de proteômica entre tecido prostático de diferentes tempos de isquemia fria. A proteína SMMHC (*Myosin heavy chain smooth muscle isoform*) aumentou de seis a sete vezes após 5 horas de isquemia fria.

No nosso estudo tivemos poucos genes (*Pparg1a*, *Uchl1* e *Per2*) representados nos módulos de isquemia do *Gene Ontology* GO:0002931 (29 genes).

O gene *Pparg1a* (*peroxisome proliferative activated receptor*) encontrado no nosso estudo menos expresso no fígado após 60 minutos de isquemia (FC -7,74 e Pvalor 0,005) codifica uma proteína relacionada com a regulação da biogênese mitocondrial. Esse gene é um coativador transcricional envolvido no metabolismo energético e já foi proposto em humanos como um alvo potencial para terapias anti-glioblastoma, uma vez que seu silenciamento conferiu proteção contra a morte celular induzida por hipóxia (BRUNS et al.2019). Verifica-se através dos dados de nosso estudo que a expressão deste gene - muito reduzida no tempo de 60 minutos - é sensível ao tempo de isquemia, ou mesmo, da própria degradação do gene, o que reforça a importância de se reduzir o tempo de isquemia em estudos envolvendo este gene para que se possa estudar adequadamente sua expressão.

O gene *Uchl1* (*ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*) encontrado mais expresso no rim (FC 2,21 e Pvalor 0,025), em humano ele codificada uma proteína

pertencente à família da peptidase, e sua alta expressão foi associada a um mau prognóstico em pacientes com câncer endometrial (NAKAO et al. 2018).

O outro gene relacionado à isquemia é o *Per2* (*period homolog 2*) que foi encontrado menos expresso (FC -3,34 e Pvalor 0,006) no rim. A baixa expressão desse gene em humano foi associada com a progressão e metástase no câncer de pulmão não pequenas células (XIANG et al. 2018).

Os dois genes anteriormente citados evidenciam alterações de expressão relevantes (aumento, no caso do gene *Uchl1* e redução, no caso do gene *Per2*) influenciadas por tempo de isquemia fria em genes associados à avaliação prognóstica de tumores específicos. A ideia de que o tempo de isquemia pode trazer alterações à expressão gênica pode ser aplicada às demais alterações observadas no presente estudo.

Neste contexto, um dado bem relevante no nosso estudo foi que, no conjunto de genes cuja expressão foi modulada pelo tempo de isquemia, encontram-se genes participantes de numerosos processos biológicos associados ao câncer. Neste cenário encontramos 101 genes em fígado, 42 em pulmão e 31 genes em rim (**Apêndice 1**). Esses genes são fatores de transcrição (*Fos*, *Hif3a*) oncogenes (*Ret*, *Srsf3*), supressores tumorais (*Btg1*, *Hnf1a*), genes envolvidos no reparo do DNA, diferenciação e atividades de quinase. Tais genes, que possuem no presente estudo diferenças significativas de expressão em tecidos de camundongos normais devido ao tempo de isquemia do tecido, devem ser olhados com cautela nas assinaturas genômicas para um desempenho analítico mais confiável.

Em nossa análise, dentre os genes de hipóxia listados nos módulos do *Gene Ontology*, o gene *Hif3a* (*hypoxia inducible factor 3, alpha subunit*) estava menos

expresso no fígado com 45 minutos de tempos de isquemia, quando comparado ao tempo zero (FC -3,53 e Pvalor 0,039). A proteína codificada por este gene é a subunidade alfa-3 de um dos vários fatores de transcrição heterodiméricos da subunidade alfa / beta que regulam muitas respostas adaptativas à baixa tensão de oxigênio (hipóxia). A subunidade alfa-3 não possui o domínio de transativação encontrado em fatores contendo as subunidades alfa-1 ou alfa-2. Acredita-se que os fatores que contêm a subunidade alfa-3 sejam reguladores negativos da expressão gênica induzida por hipóxia. Múltiplas variantes transcritas de *splicing* alternativo foram encontradas para este gene. Sob normóxia, a superexpressão de *HIF-3* alfa promove invasão e metástase de células cancerosas no pâncreas pela ativação transcricional da via de sinalização RhoC-ROCK1 (ZHOU et al. 2018).

Um estudo de AKTA et al. (2014) com 11 tumores de mama previamente não tratados comparou amostras congeladas com amostras embebidas em RNAlater imediatamente ou após 20, 40, 60 120 ou 180 minutos em temperatura ambiente. No total, 481 transcritos (3%) foram significativamente afetados pelo método de preservação, a maioria deles envolvidos em processos importantes no câncer. Foram encontrados 41 transcritos mais sensíveis para desenvolver um índice de estresse isquêmico. Entre os transcritos com aumento de expressão estavam genes de resposta ao estresse, genes de resposta apoptótica e entre os menos regulados estavam os genes envolvidos no metabolismo, processamento de proteínas e regulação do ciclo celular.

Não pudemos identificar uma via comum aos três órgãos de acordo com o tempo de isquemia. Também não foram observados genes comuns entre os 3 diferentes órgãos, não sendo possível identificar um marcador de isquemia independente do tecido de origem.

Não foi possível identificar genes com expressão aumentada ou diminuída em todos os órgãos estudados simultaneamente, portanto, não foi possível obter uma assinatura gênica comum a estes órgãos.

No nosso estudo em pulmão, o gene *Btg1* (*B cell translocation gene 1, anti-proliferative*) apresentou significativa queda de expressão ao longo de todos os tempos de isquemia fria, com *fold change* de -2,59 (T00 x T15), -5,33 (T00 x T30), -5,33 (T00 x T45) e -7,01 (T00 x T60). Este supressor de tumor regula o crescimento e diferenciação celular. Estudos associaram esse gene à leucemia linfoblástica aguda (RUSSEL et al. 2017), e a baixa expressão do *BTG1* à menor sobrevida em pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (HUANG et al. 2018) e câncer colorretal (JUNG et al. 2018). A proteína codificada por este gene interage com vários receptores nucleares e funciona como um coativador da diferenciação celular.

THOMPSON et al. (2007) avaliou o efeito da isquemia fria à temperatura ambiente e à 37°C, e o efeito do descongelamento no RIN utilizando perfis globais de expressão gênica em tecido de fígado de rato. Eles mostraram que a isquemia fria induziu significativamente um aumento da regulação dos genes *Dusp1*, *Hspa1a* e *Hspa1b*, *Egr1*, *Bhlhe40* (alias *bHLHb2*), *Ppp1r15a* (alias *GADD34*, *MyD116*), *Slc25a25*, *Btg2*, *Cxcl1*, *Zfp36*, e *Jun*. Porém, o limite em termos do número de horas de incubação a 37°C não foi claramente indicado, e os intervalos de referência não foram determinados. Nós encontramos o gene *Ppp1r12b* (*protein phosphatase 1, regulatory subunit 12B*) com menor expressão com 60 minutos de isquemia em pulmão (FC 5,04) e em rim (FC 3,29), porém não encontramos diferença significativa de expressão em fígado em nenhum dos tempos de isquemia comparados ao tempo zero.

A família do gene *FOS* consiste em 4 membros: *FOS*, *FOSB*, *FOSL1* e *FOSL2*. Estes genes codificam proteínas que podem dimerizar com proteínas da família *JUN*, formando assim o complexo de fatores de transcrição *AP-1*. Dessa forma, as proteínas *FOS* têm sido implicadas como reguladoras da proliferação, diferenciação e transformação celular, sendo também relatada sua associação à morte celular apoptótica. ALMEIDA et al. (2004) encontraram um significativo aumento da regulação da expressão do gene *Fos* relacionado à isquemia fria em fígado de rato. A expressão de *Fos*, avaliada por RT-qPCR, foi aumentada em até 12 vezes após 3 horas à temperatura ambiente. No nosso estudo não encontramos a expressão aumentada de *Fos* em fígado até 60 minutos, porém a expressão estava aumentada a partir de 15 minutos de isquemia em rim e, no caso de pulmão, observou-se expressão com redução progressiva nos tempos 15, 30, 45 minutos quando comparada à expressão no tempo zero, formando uma curva de expressão temporal descendente significativa, seguida por ascensão aos 60 minutos, tanto em *Fos* quanto em *Fosb*, conforme se observa no gráfico da **Figura 10**.

SPRUESSEL et al. (2004) avaliaram o perfil de expressão gênica e proteica em tecidos de cólon (tumor e normal) e descobriram alterações precoces no perfil de expressão gênica e de proteínas nos primeiros 5-8 minutos após a ressecção do cólon. Eles mostraram alterações de expressão diferencial em aproximadamente 2.000 genes dentro de 30 minutos após a ressecção cirúrgica de câncer de cólon. Quinze minutos após a cirurgia 10-15% de moléculas, e após 30 min 20% de todos os genes e proteínas detectadas diferiram significativamente dos valores basais, apesar do tempo de isquemia não ter afetado a qualidade do RNA. Os genes encontrados eram não só relacionados a hipóxia (*HIF-1 alpha*, *C-FOS*, *HO-1*) mas também genes do

citoesqueleto (*CK20*) e tumores associados a antígenos (*CEA*). Portanto, segundo os autores do estudo, o controle de variáveis, tais como isquemia *ex vivo*, é necessário para a obtenção de dados confiáveis nos programas de triagem para alvos moleculares e padrões moleculares de diagnóstico.

No presente estudo, os genes de maior expressão relativa nos órgãos aos 15 minutos de isquemia fria são: *Mfsd4b* (*major facilitator superfamily domain containing 4B*) em pulmão; *Myoz2* (*myozenin 2*) no fígado e *My11* (*myosin, light polypeptide 1*) em rim, conforme se observa no **Quadro 5**.

O gene *Mfsd4b*, com maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em pulmão, atua em vias relacionadas ao transporte de glicose e outros açúcares, sais biliares e ácidos orgânicos, ions metálicos e compostos de amina, e possui expressão em diversos órgãos.

O gene *Myoz2*, com maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em fígado, é um gene que tem sua expressão restrita ao coração. A proteína codificada por este gene pertence à família das proteínas sarcoméricas que ligam à calcineurina, uma fosfatase envolvida na transdução de sinal cálcio-dependente em diversos tipos de células.

O gene *My11*, com maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em rim, é um gene que tem sua expressão em músculos esqueléticos, sendo também observada sua expressão em menor grau em próstata e esôfago. A proteína codificada por este gene é uma miosina expressa em músculos esqueléticos. Duas variantes de transcriptos foram identificados para este gene.

Observa-se pela análise dos resultados que esses dois genes mais expressos aos 15 minutos em fígado e rim são específicos de outros órgãos, o que poderia indicar a

ativação precoce de genes não relacionado ao tecido em resposta à situação de isquemia. Contudo, trata-se de resultado que exige análise mais detalhada, envolvendo estudo de expressão de novas amostras dos respectivos órgãos visando excluir possibilidade de artefato.

Em relação ao pulmão, observa-se o aumento de expressão para um gene relacionado ao transporte de glicose dependente de sódio. A ativação precoce deste gene pode estar relacionada à resposta isquêmica secundária às alterações decorrentes da interrupção do fluxo sanguíneo ao órgão, acentuada neste órgão pelo fato de se tratar de estrutura altamente vascularizada.

Tendo em vista os achados atípicos previamente citados relacionados aos genes de maior expressão aos 15 minutos de isquemia fria, torna-se necessário observar também os segundos genes de maior expressão relativa nos órgãos aos 15 minutos de isquemia fria: *Mcmcd2* (*minichromosome maintenance domain containing 2*) em pulmão, *Chpt1* (*choline phosphotransferase 1*) em fígado e *Gpr35* (*G protein-coupled receptor 35*) em rim, conforme se observa no **Quadro 5**.

O gene *Mcmcd2*, com a segunda maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em pulmão, é um gene que codifica proteína cuja expressão ocorre em testículo e, em menor grau, em ovário e em 24 outros tecidos. Trata-se de gene com importante papel em recombinação meiótica e reparo de quebra de DNA de fita dupla.

O gene *Chpt1*, com a segunda maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em fígado, é um gene que codifica proteína que tem sua expressão em testículo, duodeno e em outros 25 tecidos. Trata-se gene que catalisa a biossíntese da fosfatidilcolina a partir da CDP-colina. Assim, desempenha um papel central na formação e manutenção de membranas vesiculares. GHOSH et al (2002) observou o

aumento da expressão deste gene em células epiteliais de mama cancerosas se comparado à linhagem de células epiteliais de mama não tumorigênicas.

O gene *Gpr35*, com a segunda maior expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em rim, é um gene que codifica proteína que tem sua expressão em duodeno, intestino delgado e em outros tecidos. Age como um receptor para um intermediário da via metabólica do triptofano. Segundo ALI (2019), a expressão deste gene foi investigada como indicador prognóstico para pacientes com câncer de cólon após cirurgia curativa, sendo que sua expressão mais elevada, em particular, associada a expressão de antígeno carcinoembriogênico em linfonodos, tinham reduzido tempo de sobrevivência livre de doença, indicando mau prognóstico.

Quanto aos genes menos expressos em cada órgão, conforme **Quadro 5**, temos o seguinte: *Dkk4* (*dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 4*) em pulmão, *Gjb4* (*gap junction protein beta 4*) em fígado e *Tekt1* (*tektin 1*) em rim (este, observado também em tempo 30 minutos).

O gene *Dkk4*, com menor expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em pulmão, está envolvido no desenvolvimento embriônico através de suas interações com a via de sinalização Wnt. Em adultos, os *Dkks* estão implicados em formação óssea e doença óssea, câncer e doença de Alzheimer.

O gene *Gjb4*, com menor expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria em fígado, é um gene expresso principalmente em pele que codifica uma proteína conexina transmembrana que é um componente das “*gap junctions*”, que são canais dodecaméricos que conectam o citoplasma de células vizinhas, formados por dois hemicanais hexaméricos, uma de cada membrana celular.

O gene *Tekt1*, com menor expressão relativa aos 15 minutos de isquemia fria

em rim, está associado à expressão de proteína que pertence à família tektin, que compreende família de proteínas que são co-montadas com tubulinas para formar microtúbulos ciliares e flagelares. Este gene é predominantemente expresso no testículo e, no rato, o mRNA *Tektin 1* está localizado nos espermatócitos indicando que tem um papel na espermatogênese. É observado principalmente em testículo, pulmão e endométrio. Este gene também teve menor expressão no tempo 30 minutos.

O comportamento observado em expressão dos genes anteriormente listados, que apresentaram redução em sua expressão mediante tempo de isquemia, pode indicar não somente a inibição de sua expressão, porém, mais provavelmente, a degradação do mRNA relativo a estes genes, indicando a pouca confiabilidade do RIN para estimativa de integridade específica do mRNA.

Os dados obtidos também podem ser analisados mediante a análise gráfica do comportamento temporal da expressão de cada um dos genes identificados, através de gráfico de “*time-series*”.

Neste contexto, em pulmão, destacam-se alguns genes com perfil de expressão temporal ascendente significativa (gráficos de expressão *time-series* na **Figura 10**), como apresentado pelo gene *Prelp* (*proline and arginine rich end leucine rich repeat protein*) e *Mmp3* (*matrix metalloproteinase 3*). E com perfil de expressão decrescente significativa do tempo zero aos 60 minutos para os genes *Fos* (*FBJ osteosarcoma oncogene*), *Rbm3* (*RNA binding motif protein 3*), *Ier2* (*immediate early response 2*), *Fosb* (*FBJ osteosarcoma oncogene B*), *Egr1* (*early growth response 1*) e *Gna13* (*guanine nucleotide binding protein, alpha 13*).

O gene *Prelp* (*proline and arginine rich end leucine rich repeat protein*), com perfil de expressão temporal ascendente significativa, expressa uma proteína presente

na matrix extracelular de tecido conectivo, que funciona como uma molécula ancorando membranas basais ao tecido conjuntivo adjacente. Está expresso em vários tecidos, incluindo pulmão.

O gene *Mmp3* (*matrix metalloproteinase 3*), com perfil de expressão temporal ascendente significativa, expressa proteínas da matriz metaloproteinase, envolvidas na destruição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tal como em desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelamento tecidual, assim como em processos patológicos, tais como artrite e metástases. A enzima é conhecida por estar envolvida em reparo tecidual, progressão de aterosclerose e iniciação tumoral.

O gene *Rbm3* (*RNA binding motif protein 3*) apresentou perfil de expressão temporal com pequena elevação aos 15 minutos, com leve declínio aos 30 minutos, relativa estabilidade aos 45 minutos, e importante queda aos 60 minutos. Este gene codifica uma proteína com um domínio de reconhecimento de RNA (“*RNA recognition motif (RRM) domain*”). A expressão deste gene é induzida por choque frio e baixa tensão de oxigênio.

O gene *Ier2* (*immediate early response 2*) apresentou perfil de expressão temporal descendente significativo. Este gene expressa proteína de ligação ao DNA, que aparentemente age como um fator de transcrição. É envolvida em regulação de diferenciação neuronal, promove motilidade celular e parece estimular metástases tumorais (NEEB et al. 2012).

O gene *Egr1* (*early growth response 1*) apresentou perfil de expressão temporal descendente significativo. A proteína codificada por este gene pertence à família EGR, constituindo uma proteína nuclear que funciona como uma reguladora transcripcional.

Os produtos dos genes alvo ativados por ela são necessários para diferenciação e mitogênese. Estudos sugerem ser um gene supressor de câncer.

O gene *Gna13* (*guanine nucleotide binding protein, alpha 13*) apresentou perfil de expressão temporal com pequena elevação aos 15 minutos, seguido de padrão descendente significativo nos tempos subsequentes. Está envolvido como um modulador ou transdutor em vários sistemas de sinalização transmembrana (KREUTZ et al. 2006). A sinalização Rho dependente de *GNA13* regula subsequentemente o fator de transcrição AP-1 (activating protein-1) (LEE et al. 2009). Promove a invasão de células tumorais e metástases pela ativação da via de sinalização Rho/ROCK. Inibe a adesão celular CDH1 mediada em processo independente da ativação de Rho.

No fígado, nos genes com maior significância na avaliação temporal, o único perfil de expressão interessante é o do gene *Nrep* (*neuronal regeneration related protein*), que segue uma expressão decrescente ao longo do tempo de isquemia. Este gene pode ter papel na função neural, promovendo a regeneração axonal e pode também ter funções na diferenciação celular.

Em rim destacam-se os genes com perfil de expressão temporal decrescente significativa *Tep1* (*proteína 1 associada à telomerase*) e *Col5a2* (*collagen, type V, alpha 2*).

O gene *Tep1* (*telomerase associated protein 1*) apresentou perfil de expressão temporal decrescente significativo. O produto deste gene é um componente do complexo ribonucleoproteína responsável pela atividade de telomerase, o qual cataliza a adição de novos telômeros nos terminais do cromossomo. As variantes deste gene estão associadas com risco de câncer de próstata e recorrência (GU et al. 2015).

O gene *Col5a2* (*collagen, type V, alpha 2*) apresentou perfil de expressão

temporal descendente significativo. Este gene codifica uma cadeia alfa para um dos colágenos fibrilar de baixa abundância. ZENG et al. (2018) observaram que a baixa expressão deste gene está associado a menor invasividade e melhor prognóstico em pacientes com câncer de bexiga.

A seleção inicial de genes se baseou na análise de gráficos de “time-series” com padrão puramente ascendente ou descendente. Contudo, os gráficos com outros padrões de curva não são menos importantes, pois podem refletir a interação de diversas vias como resultado da resposta celular à isquemia.

Na análise de processos biológicos enriquecidos para o câncer categorizada no GSEA encontramos 166 genes (Gene Ontology) com diferença de expressão significativa com $p < 0,05$ (**Apêndice 1**), de acordo com o tempo de isquemia, no pulmão (42 genes), fígado (101 genes) e rim (31 genes). Dos genes encontrados 43% são fatores de transcrição 14% proteínas com atividades de quinase 10% fatores de crescimento, 9% oncogenes, 7% marcadores de diferenciação celular 2% genes envolvidos no reparo do DNA e 1% supressores tumorais (Figura 13). Esses genes são fatores de transcrição (*Fos*, *Hif3a*) oncogenes (*Ret*, *Srsf3*), supressores tumorais (*Btg1*, *Hnf1a*), genes envolvidos no reparo do DNA, diferenciação e atividades de quinase (**Apêndice 1**).

O oncogene *Srsf3* (*serine and arginine rich splicing factor 3*), encontrado no nosso estudo com superexpressão no tempo de isquemia de 15 minutos em fígado (FC 2,21 e $p < 0,05$), foi sugerido como um biomarcador e um alvo terapêutico associado ao início e desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cavidade oral (PEIQI et al. 2016).

O oncogene *Ret* (*Ret proto-oncogene*), encontrado no nosso estudo com

superexpressão no tempo de isquemia de 60 minutos em rim (FC 3,07 e $p < 0,05$), é um receptor transmembrana membro da família de proteínas tirosina quinase. Ele está superexpresso em cerca de 40% dos tumores humanos e isso se correlaciona com o mau prognóstico do paciente. Quando mutado, apresenta ganho de função nos carcinomas da tireóide. Em camundongo a superexpressão de *Ret* do tipo selvagem no epitélio mamário produziu tumores mamários, exibindo uma morfologia que recapitula as características dos tumores da mama luminal humana (GATTELLI et al. 2018).

O supressor de tumor *Hnf1a* (*Hnf1 homeobox A*), encontrado no nosso estudo com superexpressão no tempo de isquemia de 60 minutos em fígado (FC 3,68 e $p < 0,05$), é um fator de transcrição necessário para a expressão de vários genes específicos do fígado. Esse gene foi associado ao aparecimento de adenomas hepáticos (HECHTMAN et al. 2019).

Na análise de enriquecimento para os processos biológicos (GO - Gene Ontology), no tempo de 60 minutos, encontramos 11 processos comuns entre os 3 órgãos, entre eles a regulação circadiana da expressão gênica, desenvolvimento dos tecidos, regulação do desenvolvimento do sistema nervoso, regulação da diferenciação celular, entre outros (**Apêndice 2**). Entretanto, não foi possível, com a abordagem utilizada até o momento, identificar um perfil de expressão gênica associado ao tempo de isquemia comum aos tecidos de fígado, pulmão e rim.

É interessante, entretanto, o achado de que aos 15 e 30 minutos de isquemia, processos biológicos relacionados ou influenciados pela regulação do pH encontram-se alterados. Aos 15 minutos, foram identificados os seguintes processos: transporte de cloro transepitelial, homeostase catiônica e regulação da concentração citosólica de

cálcio iônico. Aos 30 minutos, foram identificados os seguintes processos: transporte de cloro transepitelial, elevação do pH e elevação do pH intracelular (**Apêndice 2**). Estes dados suportam o achado anterior do nosso grupo, de que tecidos em sofrimento isquêmico podem ativar processos que induzem à elevação do pH (DENNINGHOFF et al. 2017).

A ativação desse processo possivelmente se dá em resposta à queda do pH induzida pela ativação de glicólise anaeróbica secundária à situação de isquemia. Trata-se de resposta imediata da célula à privação de oxigênio, sendo, portanto, resposta precoce à situação de isquemia. A glicólise anaeróbia resulta na acumulação de ácido láctico e fosfatos inorgânicos, com conseqüente redução do pH, o que exigiria ativação de processo compensatório através do aumento de expressão de processos para elevação do pH intracelular (situação observada no presente estudo).

Além disso, estudos em espécimes vegetais demonstram a importância de mecanismos de troca de iônicas (além do transporte de H⁺) para a manutenção da homeostase intracelular (PITTMAN 2012). O conjunto destas observações parece indicar que um dos sinais mais precoces de alteração induzida por isquemia envolve processos de controle do pH intracelular.

A isquemia é o mais comum tipo de lesão celular na prática clínica e é decorrente da redução de fluxo sanguíneo à célula e conseqüente hipóxia. A seqüência de eventos que ocorrem na célula em decorrência de hipóxia / isquemia pode ser resumida da seguinte forma. Assim que há a redução da tensão de oxigênio dentro da célula, ocorre a perda da fosforilação oxidativa e a queda de geração de ATP, e conseqüente falha na bomba de sódio, que resulta no influxo de sódio e água, com edema de organelas e da célula, de caráter reversível. Porém, na isquemia

severa/prolongada, há edema severo de mitocôndrias, influxo de cálcio na mitocôndria e dentro da célula com ruptura de lisossomos e da membrana plasmática, levando à morte por necrose e apoptose devido à liberação de citocromo c da mitocôndria (KUMAR et al. 2015).

Mamíferos desenvolveram respostas protetoras para lidar com o estresse hipóxico. O melhor exemplo disto é a indução de um fator de transcrição chamado “*hypoxia-inducible factor-1*”, o qual promove a formação de novos vasos sanguíneos, estimula vias de sobrevivência celular, e amplia a glicólise anaeróbica (KUMAR et al. 2015).

Em células normais, o pH intracelular (pHi) é rigidamente regulado para valores quase neutros por proteínas de transporte iônico residentes na membrana plasmática. A atividade desses transportadores é regulada não apenas pelas mudanças no pHi como mecanismo homeostático, mas também por sinais intra ou extracelulares, como os oncogenes, sinalização do fator de crescimento, carga metabólica, hipóxia e osmolaridade. Nas células cancerosas, o pHi é aumentado em comparação com as células normais (~7,3-7,6 versus ~7,2), enquanto o pH extracelular (pHe) é diminuído. Esse gradiente reverso de pH nas células cancerosas é um evento precoce no desenvolvimento do câncer e aumenta durante a progressão neoplásica. O pH desregulado das células cancerígenas permite desencadear processos celulares sensíveis a pequenas alterações no pHi, incluindo proliferação celular, migração e metabolismo (WHITE et al. 2017).

Não foi possível explorar em profundidade os transcritos mais sensíveis na busca de um índice de stress isquêmico e validar *in silico* os resultados de expressão gênica com bancos de dados públicos. Esta última análise apresenta dificuldade

particular, uma vez que são escassos estudos de expressão gênica que apresentem descrição detalhada do controle da obtenção das amostras biológicas e que incluam medida acurada do tempo de isquemia, e que tenham estes dados depositados em bancos de dados públicos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados de expressão gênica gerados nas análises dos RNAs de tecidos de camundongos normais em diferentes tempos de isquemia fria, podemos concluir que:

- a) O tempo de isquemia fria interfere na expressão gênica de amostras biológicas, apesar de não ter sido possível traçar um perfil de expressão gênica ao longo do tempo de isquemia;
- b) A medida de qualidade do RNA baseada no RIN (*RNA integrity number*) não reflete completamente a integridade do mRNA. Plataformas de análise de expressão gênica podem representar melhor a integridade do mRNA;
- c) A isquemia fria afeta processos biológicos importantes, inclusive relacionados à tumorigênese;
- d) Esses genes relacionados à tumorigênese encontrados com significativa diferença de expressão devem ser olhados com cautela nas assinaturas genômicas no âmbito da pesquisa e da prática clínica para um desempenho analítico mais confiável;
- e) No presente estudo, focado em órgãos livres de doença, foram evidenciadas alterações de expressão em genes que podem ser atribuídas ao processo isquêmico *per se*, o que pode sugerir a possibilidade de marcadores de neoplasia apresentados nos outros estudos estarem relacionados ao tempo de retirada da amostra até sua efetiva conservação;

- f) Observou-se processos biológicos inter-relacionados entre os órgãos estudados, porém, não foi possível identificar uma via biológica comum aos 3 órgãos;
- g) Não foi possível identificar um marcador de isquemia independente do tecido de origem, tampouco uma assinatura gênica comum entre os 3 tecidos do estudo relacionada ao processo de isquemia;
- h) Nos tempos de isquemia estudado, são observadas variações de expressão gênica relacionadas a processos de controle de íons intracelulares e controle do pH, corroborando observação anterior publicada por nosso grupo.
- i) Evidenciou-se a importância da criopreservação imediata do tecido, ou, pelo menos, o mais rápido possível após a coleta, visando minimizar os efeitos de variação da expressão gênica decorrentes da isquemia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahasic AM, Christiani DC. Personalized Critical Care Medicine: How Far Away Are We? **Semin Respir Crit Care Med** 2015; 36:809-22.

Aktas B, Sun H, Yao H, et al. Global gene expression changes induced by prolonged cold ischemic stress and preservation method of breast cancer tissue. **Mol Oncol** 2014; 8:717-27.

Ali H, AbdelMageed M, Olsson L, et al. Utility of G protein-coupled receptor 35 expression for predicting outcome in colon cancer. **Tumour Biol** 2019; 41:1010428319858885.

Almeida A, Paul Thierry J, Magdelénat H, Radvanyi F. Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling. **Anal Biochem** 2004; 328:101-8.

Asterand C. **RNA quality assurance using RIN**. Detroit, MI: Asterand 2006. Available from: <URL: <https://bit.ly/2HiDYoz>>. [2019 jan 12]

Atherton DS, Sexton KC, Otali D, et al. Factors Affecting the Use of Human Tissues in Biomedical Research: Implications in the Design and Operation of a Biorepository. **Methods Mol Biol** 2016; 1381:1-38.

Baker, M. Biorepositories: Building better biobanks. **Nature** 2012; 486:141-6.

Bao WG, Zhang X, Zhang JG, et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:1737-44.

Betsou F, Gunter E, Clements J, et al. Identification of evidence-based biospecimen quality-control tools: a report of the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Biospecimen Science Working Group. **J Mol Diagn** 2013; 15:3-16.

Bild AH, Yao G, Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. **Nature** 2006; 439:353-7.

Borgan E, Navon R, Vollan HK, et al. Ischemia caused by time to freezing induces systematic microRNA and mRNA responses in cancer tissue. **Mol Oncol** 2011; 5:564-76.

Bray SE, Paulin FE, Fong SC, et al. Gene expression in colorectal neoplasia: Modifications induced by tissue ischaemic time and tissue handling protocol. **Histopathology** 2010; 56:240-50.

Bruns I, Sauer B, Burger MC et al. Disruption of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α reverts key features of the neoplastic phenotype of glioma cells. **J Biol Chem** 2019; 294:3037-50.

Caboux E, Plymoth A, Hainaut P. **Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research.** WorkGroup Report 2. IARC; 2007. Available from: <URL:<https://bit.ly/2KJJpix>> [2019 fev 13]

Campbell LD. **Best practices for repositories: collection, storage, retrieval, and distribution of biological materials for research.** 3rd ed. Canadá: International Society for Biological and Environmental Repositories; 2012. Available from: <URL:<https://bit.ly/30YiHrd>> [2019 fev 13]

Campos AH, Silva AA, Mota LD, Olivieri ER, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the AC Camargo hospital. **Biopreserv Biobank** 2012; 10:168-73.

Campos AH, Schreeder M, Parry-Jones A, et al. Addressing the Challenge of Financial Sustainability in Biobanking. **Biopreserv Biobank** 2015a; 13:387-95.

Campos AH, Soares FA. Challenges in Developing a Cancer Oriented-Biobank: Experience from a 17 Year-Old Cancer Biobank in Sao Paulo, Brazil. **Adv Exp Med Biol** 2015b; 864:115-23.

Campos AHJFM, Carraro DM, Soares FA. Biobanking and cytopathology: Challenges and opportunities from a Brazilian perspective. **Cancer** 2017a; 125:373-7.

Campos AHJFM, Carraro DM, Soares FA. Tumor banking for health research in Brazil and Latin America: time to leave the cradle. **Appl Cancer Res** 2017b; 37:6.

Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl** 2007; 28:11-23.

De Cecco L, Musella V, Veneroni S, et al. Impact of biospecimens handling on biomarker research in breast cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:409-22.

Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M, et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. **Pharmacogenomics** 2004; 4:193-207.

Denninghoff V, Olivieri EHR, Fresno C, et al. Tissue alkalosis in cold-ischemia time. **Sci Rep** 2017; 7:10867.

Deudero JJ, Caramelo C, Castellanos MC, et al. Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem** 2008; 17: 11435-44.

Dev H, Rickman D, Sooriakumaran P, et al. Biobanking after robotic-assisted radical prostatectomy: A quality assessment of providing prostate tissue for RNA studies. **J Transl Med** 2011; 9:121.

Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. **Vasc Health Risk Manag** 2010; 6:1125-33.

Dumur CI, Sana S, Ladd AC, et al. Assessing the impact of tissue devitalization time on genome-wide gene expression analysis in ovarian tumor samples. **Diagn Mol Pathol** 2008; 7:200-6.

Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:537-43.

Ferreira EN, Maschietto M, Silva SD, Brentani H, Carraro DM. Evaluation of quantitative rt-PCR using nonamplified and amplified RNA. **Diagn Mol Pathol** 2010; 19:45-53.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the realtime qRT-PCR performance. **Mol Aspects Med** 2006; 27:126-39.

Gattelli A, García Solá ME, Roloff TC, et al. Chronic expression of wild-type Ret receptor in the mammary gland induces luminal tumors that are sensitive to Ret inhibition. **Oncogene** 2018; 37:4046-54.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med** 2012; 10:883-92.

Ghosh A, Akech J, Mukherjee S, Das SK. Differential expression of cholinephosphotransferase in normal and cancerous human mammary epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2002; 297:1043-8.

González GA, Fresno C, Fernández EA. Agi4x44.2c: an R library for two-colour Agilent 4x44 preprocessing. In: **3^{er} Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional**; 2012 sept 26-28; Oro Verde-Argentina.

Grizzle WE, Otali D, Sexton KC, Atherton DS. Effects of Cold Ischemia on Gene Expression: A Review and Commentary. **Biopreserv Biobank** 2016; 14:548-58.

Gu C, Li Q, Zhu Y, et al. Genetic variants in the TEP1 gene are associated with prostate cancer risk and recurrence. **Prostate Cancer Prostatic Dis** 2015; 18:310-6.

Gündisch S, Hauck S, Sarioglu H, et al. Variability of protein and phosphoprotein levels in clinical tissue specimens during the preanalytical phase. **J Proteome Res** 2012; 11:5748-62.

Hallmans G, Vaught JB. Best practices for establishing a biobank. **Methods Mol Biol** 2011; 675:241-60.

Hatzis C, Sun H, Yao H, et al. Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:1871-83.

He Z, Zhang J, Yuan X, et al. Stratification of Breast Cancer by Integrating Gene Expression Data and Clinical Variables. **Molecules** 2019; 24:631.

Hechtman JF, Abou-Alfa GK, Stadler ZK, et al. Somatic HNF1A mutations in the malignant transformation of hepatocellular adenomas: a retrospective analysis of data from MSK-IMPACT and TCGA. **Hum Pathol** 2019; 83:1-6.

Hostetter G, Collins E, Varlan P, et al. Veterinary and human biobanking practices: enhancing molecular sample integrity. **Vet Pathol** 2014; 51:270-80.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nat Protoc** 2009a; 4:44-57.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res** 2009b; 37:1-13.

Huang Y, Zheng J, Tan T, et al. BTG1 low expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a poorer prognosis. **Int J Biol Markers** 2018; 33:189-94.

Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. **J Clin Oncol** 2018; 20:2105-22.

Izumi D, Gao F, Toden S, et al. A genomewide transcriptomic approach identifies a novel gene expression signature for the detection of lymph node metastasis in patients with early stage gastric cancer. **EBioMedicine** 2019; 41:268-75.

Jackson D, Rowlinson RA, Eaton CK, et al. Prostatic tissue protein alterations due to delayed time to freezing. **Proteomics** 2006; 6:3901-8.

Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM, et al. Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:733-41.

Jung YY, Sung JY, Kim JY, Kim HS. Down-regulation of B-Cell Translocation Gene 1 by Promoter Methylation in Colorectal Carcinoma. **Anticancer Res** 2018; 38:691-7.

Kreutz B, Yau DM, Nance MR, Tanabe S, Tesmer JJ, Kozasa T. A new approach to producing functional G alpha subunits yields the activated and deactivated structures of G alpha(12/13) proteins. **Biochemistry** 2006; 45:167-74

Kumar R, Sharma A, Tiwari RK. Application of microarray in breast cancer: an overview. **J Pharm Bioallied Sci** 2012; 4:21-6.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. **Robbins and Cotran: pathologic basis of disease**. 9th. ed. Philadelphia PA: Elsevier Saunders; 2015. Chapter 2. Cellular Responses to stress and toxic insults: adaptation, injury and death; p50-1.

Lee SJ, Yang JW, Cho IJ, et al. The gep oncogenes, Galpha(12) and Galpha(13), upregulate the transforming growth factor-beta1 gene. **Oncogene** 2009; 28:1230-40.

Li MH, Fu SB, Xiao HS. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in cancer. **Acta Pharmacol Sin** 2015; 36:1200-11.

Lin DW, Coleman IM, Hawley S, et al. Influence of surgical manipulation on prostate gene expression: implications for molecular correlates of treatment effects and disease prognosis. **J Clin Oncol** 2006; 24:3763-70.

Liu NW, Sanford T, Srinivasan R, et al. Impact of ischemia and procurement conditions on gene expression in renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2013; 19:42-9.

Makalowski W, Zhang J, Boguski MS. Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequences. **Genome Res** 1996; 6:846-57.

Marrone M, Stewart A, Dotson WD. Clinical utility of gene-expression profiling in women with early breast cancer: an overview of systematic reviews. **Genet Med** 2015; 7:519-32.

Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, et al. Biobanking of fresh frozen tissue: Rna is stable in nonfixed surgical specimens. **Lab Invest** 2006; 86:202-11

Morente MM, Mager R, Alonso S et al. TuBaFrost 2: Standardising tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. **Eur J Cancer** 2006; 16:2684-91.

Morente MM, Cereceda L, Luna-Crespo F, Artiga MJ. Managing a biobank network. **Biopreserv Biobank** 2011; 9:187-90.

Musella V, Verderio P, Reid JF, et al. Effects of warm ischemic time on gene expression profiling in colorectal cancer tissues and normal mucosa. **PLoS One** 2013; 8:e53406.

Nakao K, Hirakawa T, Suwa H et al. High Expression of Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1 Is Associated with Poor Prognosis in Endometrial Cancer Patients. **Int J Gynecol Cancer** 2018; 28:675-83.

Neeb A, Wallbaum S, Novac N, et al. The immediate early gene Ier2 promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. **Oncogene** 2012; 31:3796-806.

Ohashi Y, Creek KE, Pirisi L, et al. RNA degradation in human breast tissue after surgical removal: a time-course study. **Exp Mol Pathol** 2004; 77:98-103.

Olivieri EH, Franco Lde A, Pereira RG, et al. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreserv Biobank** 2014; 12:46-52.

Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. **BMC Med Genomics** 2010; 3:36-49.

Pan F, Chen T, Sun X, et al. Prognosis Prediction of Colorectal Cancer Using Gene Expression Profiles. **Front Oncol** 2019; 9:252.

Pedersen IS, Thomassen M, Tan Q, et al. Differential effect of surgical manipulation on gene expression in normal breast tissue and breast tumor tissue. **Mol Med** 2018; 24:57.

Peiqi L, Zhaozhong G, Yaotian Y, Jun J, Jihua G, Rong J. Expression of SRSF3 is Correlated with Carcinogenesis and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int J Med Sci** 2016; 13:533-9.

Peixoto BR, Vêncio RZ, Egidio CM, Mota-Vieira L, Verjovski-Almeida S, Reis EM. Evaluation of reference-based two-color methods for measurement of gene expression ratios using spotted cDNA microarrays. **BMC Genomics** 2006; 7:35.

Pekmezci M, Szpaderska A, Osipo C, Erşahin C. The Effect of Cold Ischemia Time and/or Formalin Fixation on Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Results in Breast Carcinoma. **Patholog Res Int** 2012; 2012:947041.

Pellegrini KL, Sanda MG, Moreno CS. RNA biomarkers to facilitate the identification of aggressive prostate cancer. **Mol Aspects Med** 2015; 45:37-46.

Pittman JK. Multiple Transport Pathways for Mediating Intracellular pH Homeostasis: The Contribution of H(+)/ion Exchangers. **Front Plant Sci** 2012; 3:11.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. “limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.” **Nucleic Acids Research** 2015; 43:e47.

Roychowdhury S, Chinnaiyan AM. Translating Cancer Genomes and Transcriptomes for Precision Oncology. **CA: Cancer J Clin** 2016; 66:75-88.

Russell LJ, Jones L, Enshaei A, et al. Characterisation of the genomic landscape of CRLF2-rearranged acute lymphoblastic leukemia. **Genes Chromosomes Cancer** 2017; 56:363-72.

Sandusky GE, Teheny KH, Esterman M, et al. Quality control of human tissues--experience from the Indiana University Cancer Center-Lilly Research Labs human tissue bank. **Cell Tissue Bank** 2007; 8:287-95.

Savci-Heijink CD, Halfwerk H, Koster J, Horlings HM, van de Vijver MJ. A specific gene expression signature for visceral organ metastasis in breast cancer. **BMC Cancer** 2019; 19:333.

Schlomm T, Nakel E, Lubke A, et al. Marked gene transcript level alterations occur early during radical prostatectomy. **Eur Urol** 2008; 53:333-44

Schmidt KT, Chau CH, Price DK, Figg WD. Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. **J Clin Pharmacol** 2016; 56:1484-99.

Schmidt M, Thomssen C, Untch M. Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer--Gene Expression Analysis. **Oncol Res Treat** 2016; 39:102-10.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol** 2006; 7:3-16.

Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The Microarray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. **Nat Biotechnol** 2006; 24:1151-61.

Shi L, Tong W, Fang H, et al. Cross-platform comparability of microarray technology: intra-platform consistency and appropriate data analysis procedures are essential. **BMC Bioinformatics** 2005; 6:S12.

Spruessel A, Steimann G, Jung M, et al. Tissue ischemia time affects gene and protein expression patterns within minutes following surgical tumor excision. **Biotechniques** 2004; 36:1030-7.

Stan AD, Ghose S, Gao XM, et al. Human postmortem tissue: what quality markers matter? **Brain Res** 2006; 1123:1-11.

Thompson KL, Pine PS, Rosenzweig BA, Turpaz Y, Retief J. Characterization of the effect of sample quality on high density oligonucleotide microarray data using progressively degraded rat liver RNA. **BMC Biotechnol** 2007; 7:57-68.

Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. **Molecular Medicine** 2007; 13:527-41.

Vaught J. Developments in biospecimen research. **Br Med Bull** 2015; 114:29-38.

White KA, Grillo-Hill BK, Barber DL. Cancer cell behaviors mediated by dysregulated pH dynamics at a glance. **J Cell Sci** 2017; 130:663-69.

Xiang R, Cui Y, Wang Y, et al. Circadian clock gene *Per2* downregulation in non-small cell lung cancer is associated with tumour progression and metastasis. **Oncol Rep** 2018; 40:3040-8.

Xing R, Zhou Y, Yu J, et al. Whole-genome sequencing reveals novel tandem-duplication hotspots and a prognostic mutational signature in gastric cancer. **Nat Commun** 2019; 10:2037.

Yu KH, Snyder M. Omics Profiling in Precision Oncology. **Mol Cell Proteomics** 2016; 8:2525-36.

Zeng XT, Liu XP, Liu TZ, Wang XH. The clinical significance of COL5A2 in patients with bladder cancer: a retrospective analysis of bladder cancer gene expression data. **Medicine (Baltimore)** 2018; 97:e0091

Zhou X, Guo X, Chen M, Xie C, Jiang J. HIF-3 α Promotes Metastatic Phenotypes in Pancreatic Cancer by Transcriptional Regulation of the RhoC-ROCK1 Signaling Pathway. **Mol Cancer Res** 2018; 16:124-34.

Anexo 1 - Aprovação do CEUA/FAP



CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 21 de março de 2016.

Ao
Dr. Antonio Hugo José F. M. Campos.

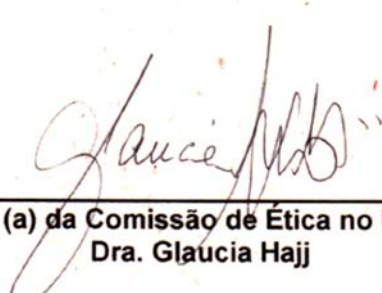
Ref. Projeto de Pesquisa nº 049/12.

Título: "Impacto do tempo de desvitalização em tecidos criopreservados para a análise de expressão gênica em massa"

Prezado (a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antônio Prudente - Hospital A.C. Camargo Câncer Center, em sua Reunião de 18 de março de 2016. Os membros desta comissão consideraram **Aprovada** a mudança de status da colaboradora Eloisa Helena Ribeiro Olivieri para aluna de pós-graduação (Doutorado) no projeto supracitado. Porém solicita-se encaminhamento carta com a data atualizada no ano 2016.

Atenciosamente,



Coordenador (a) da Comissão de Ética no Uso de Animais
Dra. Gláucia Hajj

São Paulo, 06 de Março de 2012.

Ao
Dr. Antonio Hugo José Fróes Marques Campos

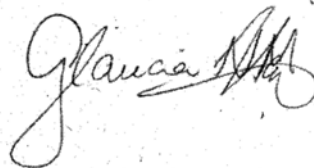
Ref. Projeto de Pesquisa nº 049/12

**Título: "Impacto do tempo de desvitalização em tecidos criopreservados para
a análise de expressão gênica em massa"**

Prezado(a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua reunião de 17 de fevereiro de 2012. Os membros desta comissão **aprovaram** a realização deste estudo nos moldes apresentados no formulário e projeto de pesquisa encaminhados para análise.

Atenciosamente,



Glaucia Hajj
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER CONSUBSTANCIADO

Ref. Projeto de Pesquisa nº 049/12

Título: Impacto do tempo de desvitalização em tecidos criopreservados para a análise de expressão gênica em massa

Pesquisador responsável: Dr. Antonio Hugo José F. M. Campos

Executor: Ana Margarita Uceda

Colaboradores: Valeria Cecilia, Vilma Martins, Dirce Maria Carraro, Alex Fiorini, Fernando Soares, Eloisa Olivieri, Pierre Hainaut.

APRECIÇÃO GERAL

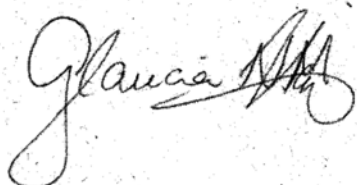
O projeto está bem embasado e foi apresentado de forma bastante clara. A proposta de estudar o impacto da desvitalização tissular em amostras biológica é pertinente e de grande interesse científico para os estudos de larga escala usando banco de amostras.

A metodologia está adequada e os objetivos estão bem descritos.

No entanto, algumas observações foram notadas:

1. O peso dos animais não está adequado. Considerando um animal adulto C57/BL6J o peso médio ficará em torno de 35g.
2. No formulário consta que o executor não tem experiência prévia com animais de experimentação. Considerando a complexidade da técnica e o cuidado no manuseio dos animais, sugere-se um tempo maior de treinamento e que os experimentos sejam acompanhados por uma pessoa com experiência maior a ser sugerido pelo pesquisador.

De acordo com o parecer supracitado, consideramos o projeto aprovado. Aguardamos carta de resposta.



Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Dra. Gláucia Hajj

Apêndice 1 - Genes com diferença de expressão significativa em **pulmão, fígado e rim** nos diferentes tempos de isquemia e de acordo com a classificação dos genes no GSEA com enriquecimento para os genes de câncer.

Gene	Órgão	Fold Change	Tempo (min)	Função no GSEA
<i>Acvr2b</i>	rim	-2,37	15	proteína quinase
<i>Aire</i>	rim	2,09	15	fatores de transcrição
<i>Alpk3</i>	rim	2,43	15	proteína quinase
<i>Ankk1</i>	pulmão	2,86	30	proteína quinase
<i>Anp32a</i>	fígado	2,52	45	fatores de transcrição
<i>Arid5b</i>	fígado	-3,01	15	fatores de transcrição
<i>Arntl</i>	fígado	-2,06	30	fatores de transcrição
<i>Arntl</i>	pulmão	4,64	60	fatores de transcrição
<i>Aurkc</i>	pulmão	-2,15	30	proteína quinase
<i>B3gat1</i>	rim	2,07	60	marcadores de diferenciação celular
<i>Bcl11a</i>	fígado	-2,6	45	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Bcl11a</i>	pulmão	-2,85	15	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Blk</i>	rim	3,38	30	proteína quinase
<i>Bmp8b</i>	fígado	-2,16	60	citocinas e fatores de crescimento
<i>Brd1</i>	fígado	-2,12	30	fatores de transcrição
<i>Brd3</i>	fígado	-2,17; -2,21	15; 30	Oncogenes, fatores de transcrição, proteína quinase, genes translocados em câncer
<i>Btg1</i>	pulmão	-2,59; -5,33; -5,33; -7,01	15; 30; 45; 60	Oncogenes, genes translocados em câncer
<i>Camk1d</i>	fígado	2,12; -2,03	45; 60	proteína quinase
<i>Cd207</i>	rim	2,52	15	marcadores de diferenciação celular
<i>Cd37</i>	fígado	-2,05; -2,22	30; 60	marcadores de diferenciação celular
<i>Cd69</i>	fígado	2,12	30	marcadores de diferenciação celular
<i>Cd84</i>	rim	-2,59	15	marcadores de diferenciação celular
<i>Cdc42bpa</i>	fígado	-2,90; -2,49; -3,25	15; 45; 60	proteína quinase
<i>Cdk14</i>	fígado	-2,1	45	proteína quinase
<i>Cdk15</i>	fígado	-2,32	60	proteína quinase
<i>Chd1</i>	fígado	-7,46; -5,86	15; 60	fatores de transcrição
<i>Chn1</i>	fígado	-2,05	30	Oncogenes, genes translocados em câncer
<i>Creb5</i>	fígado	-3,13	15	fatores de transcrição
<i>Crem</i>	pulmão	-2,02	30	fatores de transcrição
<i>Cxcl2</i>	pulmão	-2,23	45	citocinas e fatores de crescimento
<i>Cxcl3</i>	rim	3,58	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Cxcl6</i>	pulmão	2,65	45	citocinas e fatores de crescimento
<i>Dbp</i>	fígado	-2,13	60	fatores de transcrição
<i>Delk2</i>	pulmão	-2,73	60	proteína quinase
<i>Defa3</i>	fígado	-2,13	60	citocinas e fatores de crescimento

Cont/ Apêndice 1

Gene	Órgão	Fold Change	Tempo (min)	Função no GSEA
<i>Dido1</i>	rim	4,86	15	fatores de transcrição
<i>Dlx2</i>	fígado	2,02	45	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Dlx5</i>	fígado	-2,75	15	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Egfr</i>	fígado	-2,36	45	Oncogenes, proteína quinase
<i>Egr1</i>	pulmão	-3,42	60	fatores de transcrição
<i>Eme2</i>	fígado	2,04	15	Reparo de DNA
<i>Epha5</i>	pulmão	2,68	60	proteína quinase
<i>Epha8</i>	fígado	2,37	15	proteína quinase
<i>Esr1</i>	fígado	-4,18	45	fatores de transcrição
<i>Esrrg</i>	fígado	-3,96	60	fatores de transcrição
<i>Fancg</i>	fígado	-2,61; -3,84	30; 60	supressores tumorais, Reparo de DNA
<i>Fgf13</i>	pulmão	-2,44	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Flt3</i>	fígado	-2,36	15	Oncogenes, marcadores de diferenciação celular, proteína quinase
<i>Fos</i>	pulmão	-2,61; -2,61; -4,42	30; 45; 60	fatores de transcrição
<i>Fos</i>	rim	3,13	15	fatores de transcrição
<i>Fosb</i>	pulmão	-3,61	60	fatores de transcrição
<i>Foxe1</i>	pulmão	-2,74	15	fatores de transcrição
<i>Foxgl</i>	fígado	2,54	30	fatores de transcrição
<i>Foxm1</i>	pulmão	-2,14	45	fatores de transcrição
<i>Fzd9</i>	pulmão	-2,21	15	marcadores de diferenciação celular
<i>Gabpb1</i>	fígado	-2,86	30	fatores de transcrição
<i>Gdf15</i>	fígado	2,32	15	citocinas e fatores de crescimento
<i>Gdf7</i>	fígado	-3,47	15	citocinas e fatores de crescimento
<i>Gkn1</i>	rim	-2,25	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Grem2</i>	fígado	-2,35	60	citocinas e fatores de crescimento
<i>Grhl1</i>	fígado	-2,2	30	fatores de transcrição
<i>Hif3a</i>	fígado	-3,53	45	fatores de transcrição
<i>Hmx3</i>	fígado	3	15	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Hnf1a</i>	fígado	3,68	60	supressores tumorais, fatores de transcrição, homeodomínio de proteínas
<i>Hnf1b</i>	fígado	-3,97; -3,63	45; 60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Hoxa13</i>	pulmão	-3,22	15	Oncogenes, fatores de transcrição, homeodomínio de proteínas, genes translocados em câncer
<i>Hoxc6</i>	fígado	2,4	45	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Hras</i>	rim	-2,24	30	Oncogenes
<i>Hsfy1</i>	pulmão	3,37	30	fatores de transcrição
<i>Iapp</i>	pulmão	2,05	30	citocinas e fatores de crescimento

Cont/ Apêndice 1

Gene	Órgão	Fold Change	Tempo (min)	Função no GSEA
<i>Id1</i>	fígado	3,05; 2,25	15; 60	fatores de transcrição
<i>Id1</i>	pulmão	-2,17	60	fatores de transcrição
<i>Id2</i>	fígado	2,15	60	fatores de transcrição
<i>Ier2</i>	pulmão	-2,14	60	fatores de transcrição
<i>Ikzf1</i>	rim	-2,1	15	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Il1rn</i>	fígado	3,27	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Il1rn</i>	rim	2,71; 3,96	15; 45	citocinas e fatores de crescimento
<i>Il7</i>	fígado	-2,13	45	citocinas e fatores de crescimento
<i>Insm1</i>	rim	2,69; 5,66	45; 60	fatores de transcrição
<i>Itgad</i>	pulmão	-4,45	30	marcadores de diferenciação celular
<i>Itgav</i>	fígado	-4,69; -2,96	15; 45	marcadores de diferenciação celular
<i>Kalrn</i>	pulmão	-2,07; -2,15; -2,15	15; 30; 45	proteína quinase
<i>Kel</i>	pulmão	4,55	60	marcadores de diferenciação celular
<i>Klf10</i>	fígado	2,04	30	fatores de transcrição
<i>Lefty2</i>	fígado	-2,77	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Ly75</i>	fígado	-2,74	45	marcadores de diferenciação celular
<i>Ly75</i>	pulmão	-2,03; -2,00	15; 30	marcadores de diferenciação celular
<i>Mansc1</i>	rim	2,55	60	fatores de transcrição
<i>Mapk4</i>	fígado	-2,35	60	proteína quinase
<i>Mef2c</i>	fígado	-2,54	30	fatores de transcrição
<i>Mlxip</i>	fígado	-2,05	60	fatores de transcrição
<i>Mos</i>	pulmão	3,17	30	proteína quinase
<i>Mycn</i>	fígado	-4,91	45	Oncogenes, fatores de transcrição
<i>Mylk3</i>	fígado	-3,34	45	proteína quinase
<i>Myt1l</i>	rim	3,32	60	fatores de transcrição
<i>Ncor1</i>	fígado	-3,49; -2,92	15; 45	fatores de transcrição
<i>Nek10</i>	fígado	-2,25; -2,77	15; 30	proteína quinase
<i>Nf2</i>	fígado	-2,05; -2,58; -2,20	30; 45; 60	supressores tumorais
<i>Nfatc3</i>	fígado	-2,6	60	fatores de transcrição
<i>Nfib</i>	fígado	-3,06; -2,17; -2,68	15; 45; 60	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Nr4a1</i>	rim	2,68; 2,48; 2,48	15; 30; 45	fatores de transcrição
<i>Ntrk3</i>	pulmão	3,36	60	Oncogenes, proteína quinase, genes translocados em câncer
<i>Obscn</i>	pulmão	-2,94	15	proteína quinase
<i>Pbx4</i>	fígado	-2,12	45	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Pde4dip</i>	fígado	-3,10; -6,33; -5,08	15; 45; 60	Oncogenes, genes translocados em câncer
<i>Per2</i>	rim	-3,34	60	fatores de transcrição
<i>Pnoc</i>	rim	2,46	30	citocinas e fatores de crescimento

Cont/ Apêndice 1

Gene	Órgão	Fold Change	Tempo (min)	Função no GSEA
<i>Pou2f3</i>	pulmão	2,21; 2,15; 2,43	15; 45; 60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Pou4f1</i>	fígado	-2,44	60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Ppargc1a</i>	fígado	-7,74	60	fatores de transcrição
<i>Prdm15</i>	fígado	-3,97	45	fatores de transcrição
<i>Prdm15</i>	pulmão	-2,24	60	fatores de transcrição
<i>Prdm2</i>	rim	-2,26	15	fatores de transcrição
<i>Prkx</i>	fígado	-2,47	60	proteína quinase
<i>Pth2</i>	fígado	-2,34; -2,86	15; 45	citocinas e fatores de crescimento
<i>Ptprj</i>	fígado	-2,13	30	marcadores de diferenciação celular
<i>Rad23b</i>	pulmão	-2,05; -2,05	30; 45	Reparo de DNA
<i>Ranbp17</i>	fígado	-3,16; -2,39	15; 30	Oncogenes, genes translocados em câncer
<i>Rax</i>	rim	3,04	60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Rcor1</i>	fígado	-3,28	45	fatores de transcrição
<i>Recql5</i>	fígado	-2,08; -2,25	15; 45	Reparo de DNA
<i>Ret</i>	rim	3,07	60	Oncogenes, proteína quinase, genes translocados em câncer
<i>Rnf24</i>	rim	-2,07	60	fatores de transcrição
<i>Rnf41</i>	fígado	-2	45	fatores de transcrição
<i>Rorc</i>	fígado	-2,61	45	fatores de transcrição
<i>Rorc</i>	pulmão	-2,47	60	fatores de transcrição
<i>Rrm2b</i>	fígado	2,08	15	Reparo de DNA
<i>Runx1t1</i>	fígado	-2,49	30	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Runx2</i>	rim	2,77	15	fatores de transcrição
<i>Sema3d</i>	fígado	3	60	citocinas e fatores de crescimento
<i>Sema6a</i>	rim	2,94	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Sgk2</i>	pulmão	-2,97	15	proteína quinase
<i>Slamf7</i>	fígado	-2,53	30	marcadores de diferenciação celular
<i>Smad5</i>	fígado	-2	45	fatores de transcrição
<i>Smad9</i>	fígado	-2,21; -2,48	45; 60	fatores de transcrição
<i>Sox5</i>	fígado	-2,43	15	fatores de transcrição
<i>Src</i>	rim	-2,3	15	proteína quinase
<i>Srsf3</i>	fígado	2,21	15	Oncogenes, genes translocados em câncer
<i>Stat3</i>	fígado	-2,46	45	fatores de transcrição
<i>Styk1</i>	pulmão	-2,66	60	proteína quinase
<i>Sub1</i>	rim	-2,08	30	fatores de transcrição
<i>Tcf15</i>	pulmão	-2,81	15	fatores de transcrição
<i>Tead3</i>	fígado	-2,28	30	fatores de transcrição
<i>Tfap2b</i>	rim	2,73	60	fatores de transcrição

Cont/ Apêndice 1

Gene	Órgão	Fold Change	Tempo (min)	Função no GSEA
<i>Tfap2d</i>	fígado	-2,4	45	fatores de transcrição
<i>Tfeb</i>	pulmão	-2,28	30	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Tgif2</i>	pulmão	-2,6	60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Tlr6</i>	fígado	-2,25	15	marcadores de diferenciação celular
<i>Tlx2</i>	pulmão	-3,67	60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Tnc</i>	rim	-2,32	30	citocinas e fatores de crescimento
<i>Tnfsf13b</i>	fígado	-2,26	60	marcadores de diferenciação celular, citocinas e fatores de crescimento
<i>Tnik</i>	fígado	-2,71	60	proteína quinase
<i>Tox</i>	fígado	2,56	45	fatores de transcrição
<i>Trib3</i>	fígado	2,27	45	proteína quinase
<i>Trim13</i>	fígado	2,01	45	fatores de transcrição
<i>Trim62</i>	fígado	-2,15	45	fatores de transcrição
<i>Trip11</i>	fígado	-2,33; -2,69	30; 45	Oncogenes, fatores de transcrição, genes translocados em câncer
<i>Trrap</i>	pulmão	-2,37	15	proteína quinase
<i>Tsc22d2</i>	fígado	-2,04	30	fatores de transcrição
<i>Tulp1</i>	fígado	-2,77	15	fatores de transcrição
<i>Wee1</i>	fígado	-2,04	45	proteína quinase
<i>Xcl1</i>	rim	2,87	60	citocinas e fatores de crescimento
<i>Zbtb17</i>	fígado	2,06	30	fatores de transcrição
<i>Zbtb7b</i>	fígado	-2,39	60	fatores de transcrição
<i>Zfhx2</i>	fígado	-2,29; -2,57	15; 45	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Zfhx4</i>	fígado	-3,61	60	homeodomínio de proteínas, fatores de transcrição
<i>Zfpm1</i>	fígado	-2,07	15	fatores de transcrição
<i>Zmynd11</i>	fígado	-2,93; -2,29	15; 45	fatores de transcrição
<i>Znf319</i>	fígado	-2,75; -3,33; -2,28	30; 45; 60	fatores de transcrição
<i>Znf605</i>	fígado	-2,23	60	fatores de transcrição
<i>Znf646</i>	fígado	-2,09	15	fatores de transcrição
<i>Znf7</i>	fígado	-2,11	60	fatores de transcrição
<i>Znhit6</i>	pulmão	-4,17	15	fatores de transcrição
<i>Zscan10</i>	pulmão	-2,04	30	fatores de transcrição

Apêndice 2 - Principais processos biológicos (GO - Gene Ontology) encontrados nos 4 tempos de isquemia nos três órgãos do estudo com enriquecimento para os genes de câncer.

Tempo de 15 minutos				
ID GO	Descrição	Figado (Pval)	Pulmão (Pval)	Rim (Pval)
GO:0033625	positive regulation of integrin activation	0,036	---	0,016
GO:0051970	negative regulation of transmission of nerve impulse	0,036	---	0,016
GO:0098908	regulation of neuronal action potential	0,036	---	0,016
GO:0007178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0,027	---	0,018
GO:0050917	sensory perception of umami taste	0,043	---	0,019
GO:0045759	negative regulation of action potential	0,001	---	0,023
GO:0010243	response to organonitrogen compound	0,027	---	0,040
GO:0051591	response to cAMP	0,034	---	0,040
GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	0,034	---	0,047
GO:0030321	transepithelial chloride transport	0,036	0,017	---
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0,046	0,017	---
GO:0051480	regulation of cytosolic calcium ion concentration	0,019	0,018	---
GO:0055080	cation homeostasis	0,045	0,024	---
Tempo de 30 minutos				
GO:0060113	inner ear receptor cell differentiation	0,048	0,019	---
GO:0030321	transepithelial chloride transport	0,032	0,020	---
GO:0055059	asymmetric neuroblast division	0,032	0,020	---
GO:0070389	chaperone cofactor-dependent protein refolding	0,032	0,020	---
GO:0045852	pH elevation	0,039	0,024	---
GO:0051454	intracellular pH elevation	0,039	0,024	---
GO:0043435	response to corticotropin-releasing hormone	0,032	---	0,013
GO:0071376	cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	0,032	---	0,013
Tempo de 45 minutos				
GO:0032897	negative regulation of viral transcription	0,026	0,001	---
GO:0043901	negative regulation of multi-organism process	0,039	0,035	---
GO:0044236	multicellular organism metabolic process	0,047	0,038	---
GO:0017148	negative regulation of translation	0,004	0,048	---
GO:0031327	negative regulation of cellular biosynthetic process	0,002	0,050	---

Cont/ Apêndice 2

Tempo de 60 minutos				
GO:0009888	tissue development	0,016	0,009	0,005
GO:0035296	regulation of tube diameter	0,046	0,019	0,007
GO:0097746	regulation of blood vessel diameter	0,046	0,019	0,007
GO:0051241	negative regulation of multicellular organismal process	0,031	0,004	0,009
GO:0043010	camera-type eye development	0,032	0,038	0,011
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	0,019	0,007	0,011
GO:0032922	circadian regulation of gene expression	0,003	0,000	0,012
GO:0010038	response to metal ion	0,045	0,012	0,014
GO:0042310	vasoconstriction	0,043	0,043	0,021
GO:0051960	regulation of nervous system development	0,003	0,001	0,028
GO:0045595	regulation of cell differentiation	0,005	0,000	0,037
GO:0090066	regulation of anatomical structure size	0,000	---	0,015
GO:2000177	regulation of neural precursor cell proliferation	0,046	---	0,022
GO:0051938	L-glutamate import	0,003	---	0,024
GO:0051090	regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	0,040	---	0,025
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0,026	---	0,026
GO:0040012	regulation of locomotion	0,021	---	0,033
GO:0003012	muscle system process	0,003	---	0,033
GO:0051270	regulation of cellular component movement	0,022	---	0,033
GO:0044341	sodium-dependent phosphate transport	0,007	---	0,036
GO:0045475	locomotor rhythm	0,007	---	0,036
GO:0021700	developmental maturation	0,001	---	0,038
GO:0014733	regulation of skeletal muscle adaptation	0,008	---	0,039
GO:0048593	camera-type eye morphogenesis	0,024	---	0,040
GO:0043092	L-amino acid import	0,011	---	0,045
GO:0051962	positive regulation of nervous system development	0,020	---	0,047
GO:0022008	neurogenesis	0,008	0,000	---
GO:0048699	generation of neurons	0,007	0,000	---
GO:0030182	neuron differentiation	0,004	0,000	---
GO:0007417	central nervous system development	0,014	0,000	---
GO:0048468	cell development	0,002	0,000	---
GO:0060284	regulation of cell development	0,002	0,000	---
GO:0007420	brain development	0,005	0,000	---

Cont/ Apêndice 2

Tempo de 60 minutos				
GO:0050767	regulation of neurogenesis	0,001	0,000	---
GO:0007623	circadian rhythm	0,016	0,000	---
GO:0048666	neuron development	0,000	0,000	---
GO:0060322	head development	0,008	0,000	---
GO:0048667	cell morphogenesis involved in neuron differentiation	0,001	0,000	---
GO:0048511	rhythmic process	0,048	0,000	---
GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	0,003	0,001	---
GO:0000902	cell morphogenesis	0,001	0,001	---
GO:0050808	synapse organization	0,044	0,001	---
GO:0045664	regulation of neuron differentiation	0,001	0,001	---
GO:0048812	neuron projection morphogenesis	0,001	0,001	---
GO:0048858	cell projection morphogenesis	0,001	0,001	---
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	0,007	0,001	---
GO:0032990	cell part morphogenesis	0,001	0,001	---
GO:0032989	cellular component morphogenesis	0,002	0,001	---
GO:0007409	axonogenesis	0,005	0,003	---
GO:0022604	regulation of cell morphogenesis	0,002	0,003	---
GO:0048814	regulation of dendrite morphogenesis	0,039	0,004	---
GO:0021954	central nervous system neuron development	0,040	0,004	---
GO:0061564	axon development	0,009	0,004	---
GO:0010771	negative regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	0,015	0,007	---
GO:0001941	postsynaptic membrane organization	0,040	0,008	---
GO:0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	0,002	0,009	---
GO:0072348	sulfur compound transport	0,005	0,009	---
GO:0007626	locomotory behavior	0,015	0,010	---
GO:0031175	neuron projection development	0,001	0,010	---
GO:0006873	cellular ion homeostasis	0,048	0,016	---
GO:0050773	regulation of dendrite development	0,002	0,016	---
GO:0009719	response to endogenous stimulus	0,012	0,018	---
GO:0060537	muscle tissue development	0,033	0,020	---
GO:0044236	multicellular organism metabolic process	0,049	0,020	---
GO:0046683	response to organophosphorus	0,013	0,021	---
GO:0003008	system process	0,030	0,021	---

Cont/ Apêndice 2

Tempo de 60 minutos				
GO:0030534	adult behavior	0,015	0,023	---
GO:0055080	cation homeostasis	0,041	0,025	---
GO:0030030	cell projection organization	0,000	0,025	---
GO:0048167	regulation of synaptic plasticity	0,004	0,026	---
GO:0014074	response to purine-containing compound	0,004	0,026	---
GO:0098771	inorganic ion homeostasis	0,023	0,027	---
GO:0007010	cytoskeleton organization	0,005	0,031	---
GO:0007610	behavior	0,013	0,035	---
GO:0010975	regulation of neuron projection development	0,000	0,036	---
GO:0048663	neuron fate commitment	0,036	0,037	---
GO:0050801	ion homeostasis	0,021	0,042	---
GO:0031344	regulation of cell projection organization	0,000	0,042	---
GO:0048878	chemical homeostasis	0,030	0,044	---
GO:1990845	adaptive thermogenesis	0,006	0,048	---