

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA PRISCILA ROEPKE

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES NO  
PÊNFIGO FOLIÁCEO

CURITIBA

2016

DÉBORA PRISCILA ROEPKE

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORNAS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES NO  
PÊNFIGO FOLIÁCEO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina "Trabalho de Conclusão de Curso II – TCC II", do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Malheiros Ferreira

Co-Orientadora: Débora de Sousa Lemos

CURITIBA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que está no controle soberano da minha vida conduzindo meus caminhos de acordo com Seus planos.

Aos meus pais, por todo investimento e tempo dedicado na minha educação. Sem o amor e o apoio de vocês não teria chegado até aqui.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Malheiros Ferreira por todo seu suporte e orientação na realização deste trabalho. A co-orientadora Débora Lemos pela amizade e auxílio durante meu tempo no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH).

Ao LGMH e a todos os seus integrantes pela amizade e pela disposição em ajudar e ensinar sempre.

A Universidade Federal do Paraná e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

A todos meus amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado durante todos esses anos de faculdade, apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

O pênfigo é um grupo de dermatoses autoimunes bolhosas caracterizado pela presença de autoanticorpos contra moléculas de adesão. No Brasil, há uma forma endêmica do pênfigo foliáceo (PFE) conhecida como “fogo selvagem”. Exossomos são nanovesículas circulantes derivados de diversos tipos celulares, que possuem funções na comunicação intercelular, atuando inclusive no sistema imune. O conteúdo dos exossomos inclui lipídios, proteínas e material genético. Os exossomos são enriquecidos em microRNAs (miRNAs) - RNAs não codificadores capazes de regular a expressão gênica em um nível pós-transcricional. Para este trabalho foram selecionados seis miRNAs alvos (miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223), presentes em exossomos de diversas origens celulares e detectados em níveis desregulados em células de pacientes com doenças autoimunes, incluindo o PFE, mas nunca estudados em exossomos no PFE. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença dos miRNAs alvos em exossomos séricos e avaliar possíveis diferenças quantitativas entre pacientes com PFE e controles saudáveis. Os exossomos foram isolados a partir do soro de 16 pacientes com PFE e 11 controles através de precipitação por kit comercial e foram caracterizados por análise de varredura de nanopartículas (NTA) e citometria de fluxo para marcadores de superfície padrão de exossomos (CD9 e CD63). O RNA foi isolado através de kit comercial e os miRNAs alvos foram detectados por PCR quantitativa. Como controle técnico foi utilizado o miRNA exógeno cel-miR-39 inserido durante o isolamento do RNA. A significância estatística das diferenças de quantificação foi calculada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney ( $P \leq 0,05$ ) no programa GraphPad Prism 4.03 (San Diego, CA, EUA). A caracterização dos exossomos demonstrou que o produto do isolamento apresentava tamanho médio e marcadores de superfície referente às nanovesículas. Todos os miRNA alvos foram encontrados em exossomos séricos, o miR-223 ( $Cq = 29,89$ ) foi encontrado em maior quantidade e os miR-155 ( $Cq = 35,28$ ) e miR-214 ( $Cq = 35,67$ ) em menor quantidade, não sendo detectado em todos os indivíduos pela técnica adotada. Diferente dos achados celulares descritos na literatura, neste estudo inédito, não foi encontrada uma diferença na quantidade destes miRNAs entre pacientes com uma doença autoimune ativa (PFE ativo) em relação aos controles. É importante notar que diferenças de expressão de miRNAs na célula podem não ser encontradas nos exossomos, fator que pode ser explicado devido ao mecanismo de seleção preferencial dos miRNAs no empacotamento dos exossomos. O miR-145 e o miR-155 foram encontrados enriquecidos em pacientes com pênfigo inativo (*fold* de 3,68 e 4,02, respectivamente), sugerindo uma possível função na progressão da doença que merece ser melhor investigada. Este estudo inicial com miRNAs exossomais séricos no PFE revelou tendências que merecem ser melhor exploradas em amostras mais numerosas.

Palavras chaves: Exossomos, pênfigo, microRNA

## ABSTRACT

Pemphigus is a group of autoimmune bullous dermatoses characterized by the presence of autoantibodies against adhesion molecules. In Brazil, there is an endemic form of pemphigus foliaceus (EPF) known as "fogo selvagem". Exosomes are circulating nanovesicles derived from several cellular types that have functions in intercellular communication, acting in the immune system. The content of the exosomes includes lipids, proteins and genetic material. Exosomes are enriched in microRNAs (miRNAs) - non-coding RNAs capable of regulating gene expression at a post-transcriptional level. For this study, six miRNAs (miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 and miR-223) were selected, which are found in exosomes of diverse cellular origins and detected in deregulated levels in cells of patients with autoimmune diseases, including EPF, but never studied in EPF. The aim of this work was to verify the presence of the candidates miRNAs in serum exosomes and to evaluate possible quantitative differences between patients with EPF and healthy controls. Exosomes were isolated from the serum of 16 patients with EPF and 11 controls by commercial kit precipitation and were characterized by nanoparticle tracking analyzes (NTA) and flow cytometry for standard exosome surface markers (CD9 and CD63). RNA was isolated by commercial kit and target miRNAs were detected by quantitative PCR. Exogenous miRNA cel-miR-39 was inserted during RNA isolation as a technical control. The statistical significance of the quantification differences was calculated using the Mann Whitney non-parametric test ( $P \leq 0.05$ ) with GraphPad Prism 4.03 (San Diego, CA, USA). Exosomes characterization demonstrated that the isolation product had medium size and surface markers related to the nanovesicles. All miRNA candidates were found in serum exosomes, miR-223 ( $Cq = 29,89$ ) was found in greater quantity and miR-155 ( $Cq = 35,28$ ) and miR-214 ( $Cq = 35,67$ ) in less quantity, not being detected in all the individuals by the adopted technique. Different from the cellular findings described in the literature, in this inedited study, no difference was found in the amount of these miRNAs among patients with an active autoimmune disease (active EPF) in relation to the controls. It is important to note that differences in the expression of miRNAs at the cellular level may not be found in the exosomes, a factor that can be explained by the mechanism of preferential selection of miRNAs in exosomes packaging. MiR-145 and miR-155 were found to be enriched in patients with inactive pemphigus (*fold* of 3,68 and 4,02, respectively), suggesting a possible role in disease progression that deserves better investigation. This initial study with serum exosomal miRNAs in EPF revealed trends that deserve to be better explored in larger samples.

Keywords: Exosomes, pemphigus, microRNA

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
2.1 PÊNFIGO .....	12
2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	14
2.3 MicroRNAs .....	17
2.3.1 MicroRNAs alvos.....	18
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
3.1 GRUPO AMOSTRAL.....	22
3.2 ISOLAMENTO DOS EXOSSOMOS .....	22
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS .....	23
3.3.1 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	23
3.3.2 Citometria de Fluxo .....	23
3.4 EXTRAÇÃO DE RNAs EXOSSOMAIS.....	24
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO RNA .....	25
3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS .....	25
3.7 ANÁLISE DE DADOS.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS.....	27
4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS .....	30
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>35</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
<b>ANEXO 1 – DADOS DO GRUPO AMOSTRAL E VALORES OBTIDOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os pênfigos, vulgar e foliáceo, são doenças autoimunes clinicamente caracterizadas por bolhas na pele e nas mucosas, e pela presença de autoanticorpos contra proteínas de adesão dos queratinócitos, as desmogleínas (BEUTNER e JORDON, 1964; SCHILTZ e MICHEL, 1976). Na região central do Brasil existe uma forma endêmica da doença, o pênfigo foliáceo endêmico (PFE), que embora possua aspectos clínicos e histológicos semelhantes ao pênfigo foliáceo clássico, se diferencia pelas características epidemiológicas (AOKI et al., 2015). Entretanto, são poucos os grupos ao redor do mundo que se dedicam a investigar essa doença e ainda há muito a ser descoberto. Tudo isto torna o PFE um alvo interessante e promissor de estudo e novas pesquisas.

Os exossomos são nanovesículas extracelulares, de 30 a 150 nm, derivadas de uma grande variedade de tipos celulares e presentes em todos os fluídos do corpo humano (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). O conteúdo dos exossomos inclui proteínas, lipídios, RNAm e RNAs não codificantes (microRNAs e RNAs longos). A pesquisa com os exossomos ainda é recente, sendo estes descobertos na década de 80 e, inicialmente achou-se que eram apenas um lixo celular (HARDING et al., 1984). Hoje se sabe que estas vesículas têm uma função importante na comunicação intercelular e participam de mecanismos regulatórios do sistema imune, mas há ainda muito a ser elucidado (LUDWIG e GIEBEL, 2012). Por serem tão recentes, as técnicas de isolamento dos exossomos ainda estão em fase de consolidação e apenas em 2014 foram determinadas as exigências mínimas para caracterizar essas vesículas extracelulares que incluem testes bioquímicos e biofísicos (LÖTVALL et al., 2014). Ainda não existem estudos publicados sobre o envolvimento dos exossomos e seu conteúdo no pênfigo foliáceo.

Em 1993 foi descoberto o primeiro microRNA, o lin-4, em *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo (LEE et al., 1993). Os microRNAs (ou miRNA) são pequenos RNAs não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica em um nível pós-transcricional. Como mecanismo de ação podem se ligar aos RNAm alvos e os marcarem para degradação ou repressão traducional. Os miRNAs estão envolvidos em processos fisiológicos e patológicos e têm ganhado importância como biomarcadores para doenças (ZHANG et al., 2015). Participam da regulação do sistema imune e seu mau funcionamento pode estar

envolvido com a susceptibilidade a doenças autoimunes, câncer e doenças degenerativas. De fato, muitos miRNAs já foram descritos como diferencialmente expressos em várias doenças autoimunes (revisado por QU et al., 2014), inclusive no pênfigo foliáceo endêmico (CIPOLLA, 2012 e CIPOLLA, 2016).

Tendo em vista todo o envolvimento dos exossomos e dos miRNAs com o sistema imune e sua descoberta relativamente recente, estudar o conteúdo de microRNAs exossomais em pacientes com PFE pode contribuir para entender os mecanismos da doença e possivelmente encontrar microRNAs que possam servir como biomarcadores para o pênfigo. MicroRNAs exossomais séricos são excelentes candidatos a investigação de biomarcadores para diagnóstico e acompanhamento de doenças, já que são um método não invasivo e podem facilmente ser detectados por PCR quantitativa em tempo real.

Para este estudo foram selecionados miRNAs candidatos – miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223 – que estão envolvidos com a regulação do sistema imune e/ou já foram encontrados diferencialmente expressos em células no PFE e em outras doenças autoimunes. Mesmo tendo sido encontrada esta diferença de expressão em nível celular, ainda são poucos os estudos que investigaram a presença destes miRNAs em exossomos séricos de indivíduos com doenças autoimunes, bem como o significado de tal fato.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se os miRNAs miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223 estão presentes em exossomos séricos e, se estiverem, avaliar se existem diferenças quantitativas destes miRNAs entre pacientes com pênfigo foliáceo endêmico e controles saudáveis.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os exossomos do soro de pacientes com PFE e controles;
- Caracterizar os exossomos através de citometria de fluxo e análise de rastreamento de nanopartículas;
- Quantificar miRNAs alvos em pacientes com PFE e indivíduos saudáveis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



## 2.1 PÊNFIGO

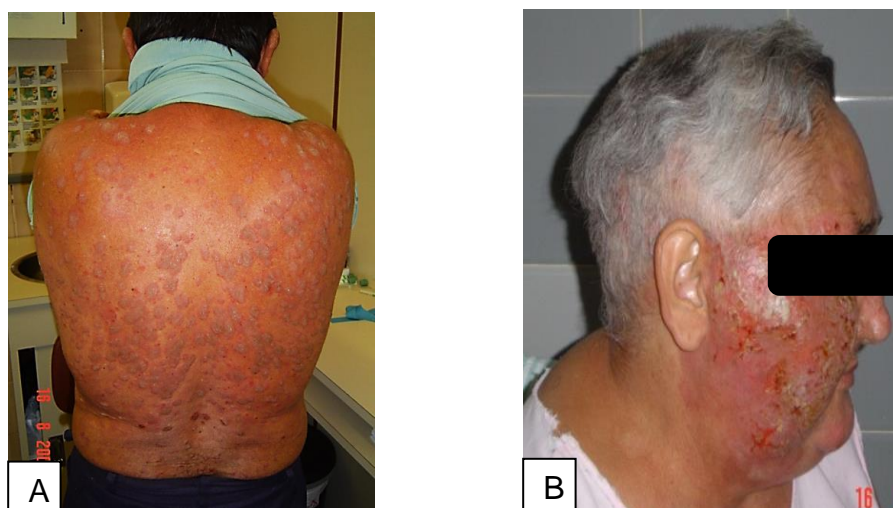
O pênfigo inclui um grupo de doenças autoimunes que afetam a pele e a mucosa devido à presença de autoanticorpos IgG contra os queratinócitos, causando assim o seu desprendimento (acantólise) e a formação das bolhas que caracterizam a doença (BEUTNER e JORDON, 1964; SCHILTZ e MICHEL, 1976). Um dos principais alvos desses autoanticorpos, e o mais amplamente estudado, são as desmogleínas (Dsg). As desmogleínas são moléculas de adesão pertencentes à família das caderinas e importantes para a adesão entre os queratinócitos (KOCH et al., 1990) Embora as desmogleínas tenham sido consideradas por muito tempo o único antígeno envolvido na fisiopatologia do pênfigo, hoje já foram encontrados mais de 50 proteínas humanas alvo dos IgGs do pênfigo, como outros tipos de moléculas de adesão, receptores de membrana celular e antígenos imunológicos, hematológicos, neuronais e oncológicos (GRANDO, 2011).

As duas variantes clássicas do pênfigo são o pênfigo vulgar (PV) e o pênfigo foliáceo (PF) (FIGURA 1). O PV é o subtipo mais comum e leva a formação de bolhas na mucosa e na pele, causando perda de adesão entre os queratinócitos das camadas profundas da epiderme, logo acima da camada basal. Esta forma clínica é caracterizada pela presença de autoanticorpos principalmente anti-desmogleína 3 (anti-Dsg3) (AMAGAI et al., 1996). No PF as bolhas são mais superficiais, abaixo da camada córnea e o autoanticorpo característico é contra a desmogleína 1 (Dsg1) (SHIRAKATA et al., 1998).

Para explicar a localização das lesões no PV e no PF, surgiu a hipótese da compensação das desmogleínas que sugere que a Dsg1 e Dsg3 compensam uma a outra quando co-expressas em uma mesma célula (MAHONEY et al., 1999). A Dsg1 é expressa mais intensamente nas camadas superficiais da epiderme, enquanto a Dsg3 é expressa na camada mais profunda. Na mucosa, tanto Dsg1 como Dsg3 são expressas, mas a Dsg1 é expressa em um nível menor. Por isso, segundo essa teoria, no pênfigo foliáceo são encontradas apenas lesões na parte superficial da epiderme, pois nesta região há somente expressão de Dsg1, enquanto que na parte mais profunda da epiderme e na mucosa a presença de Dsg3 compensaria a diminuição de Dsg1 (FIGURA 2) (SHIRAKATA et al., 1998). Entretanto, essa teoria não consegue explicar completamente a patogênese do PV, visto que os pacientes

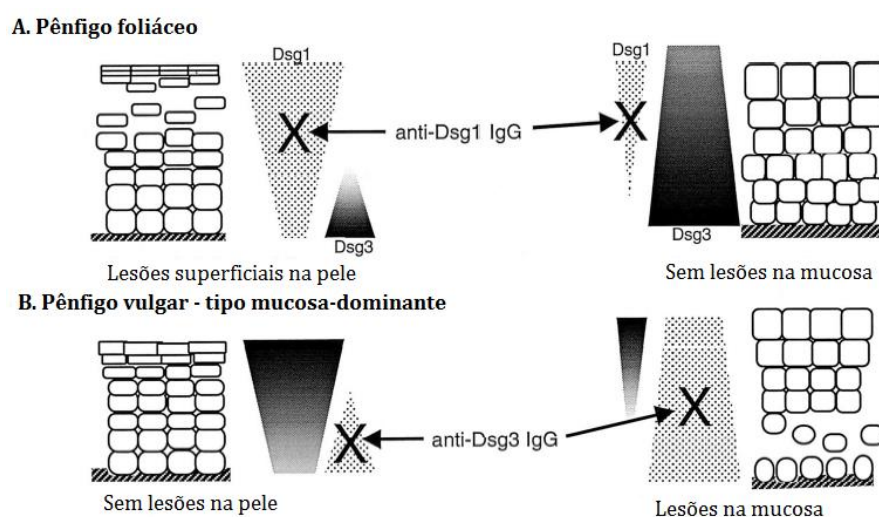
de PV podem possuir anticorpos contra Dsg1 e Dsg3, reforçando mais uma vez que a patogênese do pênfigo não é tão simples como se imagina.

FIGURA 1 – PACIENTES COM LESÕES BOLHOSAS CARACTERÍSTICAS DO PÊNFIGO FOLIÁCEO (A) E DO PÊNFIGO VULGAR (B).



FONTE: Acervo do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR.

FIGURA 2 – HIPÓTESE DA COMPENSAÇÃO DAS DESMOGLEÍNAS



FONTE: Adaptado de AMAGAI (2002)

NOTA: Explicação das localizações das lesões no PF e PV segundo a hipótese da compensação das desmogleínas. Os triângulos representam a distribuição da Dsg1 e Dsg3 na pele e na mucosa. (A) No PF, há a presença de anticorpos anti-Ds1 e por isso só são vistas lesões superficiais na pele, já que na parte profunda da pele e na mucosa a presença de Dsg3 compensa a perda de Dsg1. (B) No PV, anticorpos anti-Dsg3, são vistas lesões na mucosa, pois não há Dsg1 para compensar a perda de Dsg3.

Pesquisadores têm sugerido outros modelos para explicar a acantólise no pênfigo. Um desses modelos, proposto por Bystryn e Grandó (2006), afirma que a ligação dos anticorpos anti-queratinócitos causa uma mudança na estrutura do seu citoesqueleto que leva a um colapso e retração celular.

No Brasil, existe uma forma endêmica do pênfigo foliáceo (PFE), popularmente conhecido como “fogo selvagem”, que acomete principalmente indivíduos residentes nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Esta forma se assemelha muito a forma clássica do pênfigo foliáceo em termos clínicos e imunopatológicos, mas se diferencia pela epidemiologia. Em algumas regiões endêmicas do Brasil a incidência chega a 34 casos por milhão de habitantes por ano e com as maiores prevalências já relatadas (DIAZ et al, 1989). Na tribo indígena de Terena (MS) a prevalência da doença é de 3,2% e na tribo Xavante é de 1,4% (AOKI et al., 2015). A maioria das pessoas acometidas pelo PFE moram em áreas rurais perto de rios e riachos e por isso tem sido proposto que um fator ambiental estaria envolvido na doença. Uma das hipóteses é que a picada do mosquito simulídeo (borrachudo) seria responsável por desencadear uma resposta autoimune contra os queratinócitos (DIAZ et al.,1989).

O diagnóstico clínico do pênfigo é realizado através de exame visual das lesões e pelo sinal de Nikolsky, positivo quando há o descolamento da pele perilesional quando esta é pressionada, já que as células se desprendem com grande facilidade. Também podem ser realizados testes de imunofluorescência direta (na biópsia da pele lesionada) ou indireta (no sangue) para procurar os anticorpos anti-desmogleína que caracterizam a doença. O tratamento para o pênfigo não é específico e consiste principalmente na administração de corticoides sistêmicos, que causam vários efeitos adversos, como Síndrome de Cushing, hiperglicemia e osteoporose. Também podem ser utilizadas outras drogas imunossupressoras (DIAZ et al.,1989).

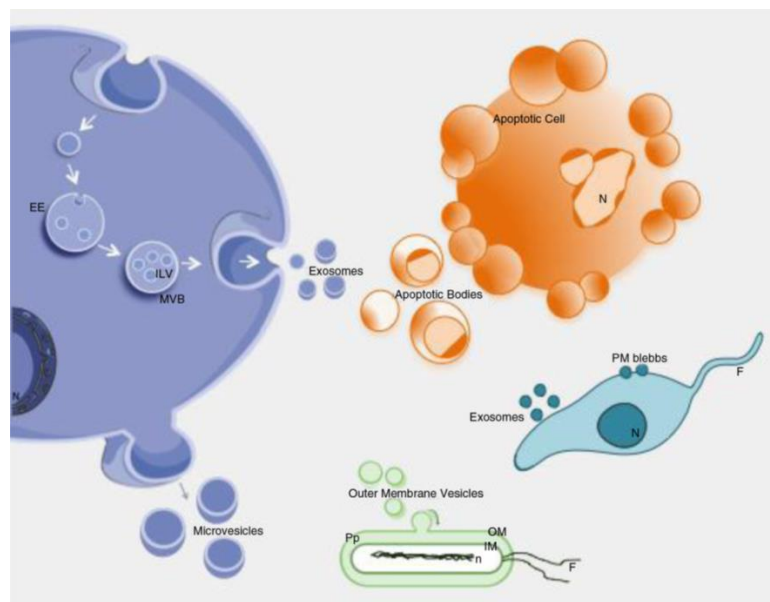
## 2.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares (EVs) são pequenas vesículas (30 nm a 2000 nm) liberadas pelas células, derivadas da membrana plasmática ou do último compartimento endossomal. Podem ser divididas em 3 grupos de acordo com a sua origem: microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos. Enquanto as

microvesículas (100 nm – 1µm) têm origem da membrana plasmática, os exossomos (30 – 150 nm) têm sua origem nos endossomos e os corpos apoptóticos (500 – 2000 nm) originam da membrana de células que estão em processo de apoptose. A principal função das vesículas extracelulares é a comunicação intercelular, atuando em processos fisiológicos, como manutenção das células tronco, reparo tecidual, e coagulação sanguínea; e também em processos patológicos, como disseminação de oncoproteínas e propagação de agentes patogênicos, como o vírus do HIV-1 (EL ANDALOUSSI et al., 2013).

Os exossomos, alvos deste projeto, são um tipo de vesícula extracelular de origem endocítica liberados por diversas células, como células T, mastócitos, células dendríticas, células tumorais e células endoteliais (revisado por LUDWIG e GIEBEL, 2012). Exossomos já foram isolados de vários fluidos corporais, como sangue, urina, saliva, leite materno, líquido amniótico e líquido cefalorraquidiano (revisado por LUDWIG e GIEBEL, 2012). Os exossomos são vesículas intraluminais (ILVs) contidas dentro dos corpos multivesiculares (MVBs). Quando os MVBs se fundem com a membrana plasmática, eles liberam os ILVs para o ambiente extracelular, que agora passam a ser chamados de exossomos (FIGURA 3) (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

FIGURA 3 – VIA DA FORMAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

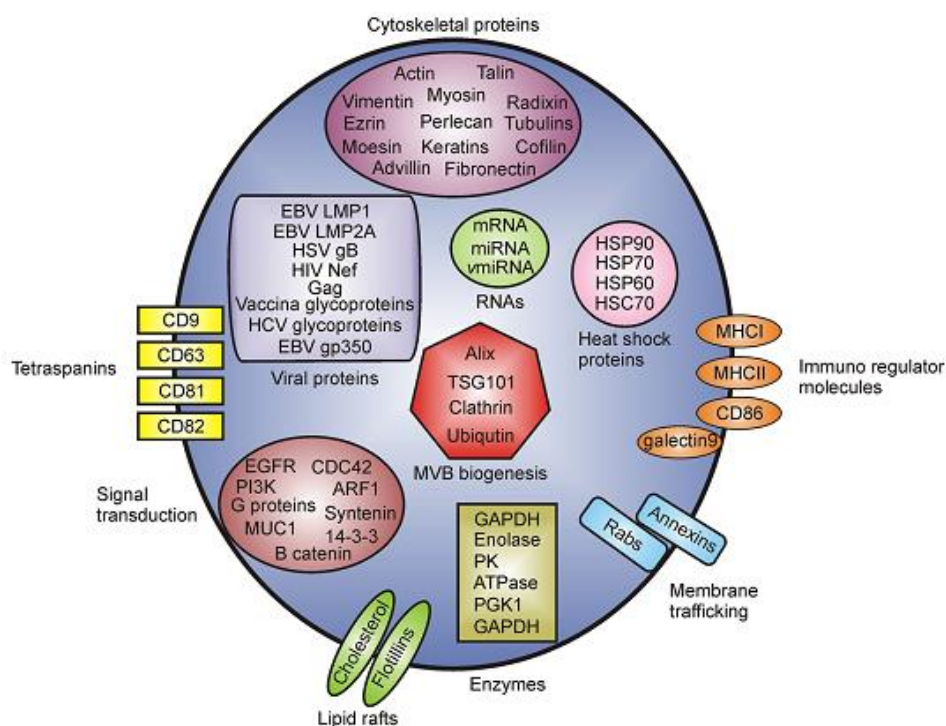


FONTE: YÁÑEZ-MÓ et al (2015)

NOTA: Exossomos têm sua origem no compartimento endossomal (EE) que se invagina e forma vesículas intraluminais (ILV) contidas dentro dos corpos multivesiculares (MVB), que se fundem com a membrana plasmática e liberam os exossomos. As microvesículas são liberadas por brotamento da membrana plasmática e os corpos apoptóticos são liberados por células que estão entrando em apoptose. Organismos mais simples também tem a capacidade de liberar vesículas extracelulares.

Os exossomos possuem um tamanho de 30 a 150 nm, densidade entre 1,10 e 1,14 g/ml e forma de taça sob microscopia de transmissão eletrônica (revisado por KALRA et al., 2016). Eles são caracterizados pela presença de proteínas envolvidas com o transporte de membrana e fusão de proteínas (Rab, GTPases, anexina, flotillina), proteínas envolvidas na biogênese dos corpos multivesiculares (Alix, TSG101), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82) e proteínas do choque térmico (HSC70, HSP90) (VAN DER POL et al., 2012) (FIGURA 4). Além de proteínas, os exossomos também são enriquecidos com alguns lipídeos, como colesterol, ceramida e esfingomiéline (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Os exossomos ainda carregam mRNAs e miRNAs funcionais, que podem ser traduzidos em proteínas ou regular a expressão gênica nas células alvo (VALADI et al., 2007)

FIGURA 4 – MOLÉCULAS ENCONTRADAS EM EXOSSOMOS



FONTE: MECKES e RAAB-TRAUB (2012)

As vesículas extracelulares (EVs) podem promover a ativação do sistema imune através das citocinas que carregam em sua membrana, como o TFN (fator de necrose tumoral) (ROBBINS e MORELLI, 2014). Um exemplo da atuação dos exossomos no sistema imune é demonstrado pela capacidade de atuarem como

apresentadores de antígenos para as células T em virtude da presença de moléculas de MHC classe I e classe II (RAPOSO et al., 1996). As células apresentadoras de antígenos (APCs) aumentam a resposta imune celular utilizando exossomos para a apresentação do antígeno. As EVs também participam do sistema imune de uma maneira indireta, através da sua internalização pelas APCs, nas quais podem transferir seus peptídeos antigênicos para as moléculas de MHC da APC hospedeira (ROBBINS e MORELLI, 2014).

Os exossomos podem ser isolados através de diversos processos. O mais amplamente utilizado é a ultracentrifugação, combinada ou não com gradiente de sucrose ou iodixanol (Optiprep™). O uso de gradientes é trabalhoso e demanda longos períodos de isolamento, mas pode resultar em exossomos com maior pureza. Outra técnica de isolamento dos exossomos é baseada em separação pelo tamanho com a utilização de microfiltros. Embora essa técnica seja mais rápida que o isolamento por ultracentrifugação, pode não ser tão precisa, já que outras nanovesículas também podem ser isoladas junto com os exossomos. Os exossomos podem também ser isolados por precipitação através de kits comerciais (ExoQuick™ e Total Exosome Isolation Reagent™). Esses reagentes unem as moléculas de água e fazem com que os componentes menos solúveis, como as vesículas exossomais, sejam expulsos da solução e precipitem ao passar por uma centrifugação curta e de baixa velocidade, podendo então ser coletados e utilizados para análise. Existe ainda um método mais específico e de custo mais elevado que consiste na captura dos exossomos por afinidade através de utilização de anticorpos como CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, anexina, EpCAM e Rab5 (ZERINGER et al., 2015).

### 2.3 MicroRNAs

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica em um nível pós-transcricional ao se ligarem na região 3' não-traduzida (3' UTR) de RNAm alvos e os marcarem para degradação ou repressão traducional (ZHANG et al., 2015). Estima-se que 30% de todos os mRNAs humanos são alvos de microRNAs (PERERA e RAY, 2007).

Os genes codificadores de miRNA são transcritos pela RNA polimerase II em um transcrito primário (pri-miRNA), que forma uma estrutura secundária em forma de grampo (*stem loop*) e é processado pela enzima *Drosha* (RNase III) em um

percursor de aproximadamente 70 nucleotídeos, gerando então o pre-miRNA. Ele então é transportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5. No citoplasma, o pre-miRNA é processado pela enzima *Dicer* em um RNA dupla fita de 20 pb. Uma dessas fitas de RNA é degradada, e a fita de RNA madura é incorporada pelo RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA), no qual o miRNA e o mRNA podem interagir (HE e HANNON, 2004).

Os microRNAs participam em vários processos fisiológicos, como a diferenciação celular, a proliferação celular e também a apoptose (AMBROS, 2004). Mas também exercem um papel importante na progressão de doenças, por exemplo, facilitando a metástase no câncer (MACFARLANER e MURPHY, 2010). Os microRNAs também participam da homeostasia do sistema imune, atuando no desenvolvimento e diferenciação das células imunes e também na tolerância central e periférica. Devido a sua função no sistema imune, os miRNAs podem levar ao mau funcionamento do sistema imune e até ao desenvolvimento de doenças autoimunes caso haja mudanças na sua quantidade e função (revisado por GARO e MURUGAIYAN, 2016). De fato, já foram reportados vários miRNAs que estão diferencialmente expressos em doenças autoimunes, como na artrite reumatoide e no lúpus sistêmico eritematoso (QU, et al., 2014).

Os microRNAs são um dos componentes dos exossomos (VALADI et al., 2007). Entretanto, o conteúdo de microRNA dos exossomos pode ser diferente da sua célula de origem, o que sugere um certo mecanismo de seleção dos microRNAs (ZHANG et al., 2015). Os microRNAs exossomais podem promover metástase, angiogênese e ativação do sistema imune (ZHANG et al., 2015). Uma das possíveis aplicações dos microRNAs exossomais é como biomarcadores para o estado de uma doença, já que a composição e a quantidade dos microRNAs difere entre pacientes e indivíduos saudáveis (ZHANG et al., 2015). Além de servirem como biomarcadores, outra possível utilização dos microRNAs é na terapia gênica, já que os exossomos são capazes de aceitar um miRNA exógeno (ZHANG et al., 2015).

### 2.3.1 MicroRNAs alvos

Para este projeto foram selecionados os miRNAs – miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223 – que estão envolvidos com a regulação do sistema imune e/ou já foram encontrados diferencialmente expressos em PFE e em

outras doenças autoimunes como será abordado mais adiante (CIPOLLA, 2012 e CIPOLLA, 2016). Todos estes miRNAs candidatos já foram encontrados em exossomos de diversas origens celulares em diferentes patologias (revisado por HU et al., 2012).

MiR-145 já foi descrito como sendo diferencialmente expresso em várias doenças autoimunes como esclerose sistêmica, esclerose múltipla, miastenia gravis autoimune e lúpus eritematoso sistêmico. O miR-145 está subexpresso em amostras de pele e fibroblastos de pacientes com esclerose sistêmica (revisado por DENG et al., 2015). Já na esclerose múltipla, ele foi encontrado significativamente superexpresso em células sanguíneas de pacientes (KELLER et al., 2009). O miR-145 foi encontrado subexpresso em células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês “peripheral blood mononuclear cell”) e células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (células efectoras) purificadas de ratos com miastenia gravis autoimune e de pacientes com miastenia gravis humana (WANG et al., 2013). Foi encontrada também uma expressão diminuída do miR-145 em células T de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LU et al., 2012). No PFE foi encontrada ausência de expressão do miR-145 nas células B IgG<sup>+</sup> e células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (CIPOLLA, 2012). Embora este miRNA já tenha sido descrito como diferencialmente expresso em várias doenças autoimunes, suas funções na regulação do sistema imune ainda não estão bem estabelecidas.

O miR-146a está envolvido com a resposta imune inata pois regula a resposta inflamatória aguda em macrófagos, sua expressão é induzida por NF-κB (TAGANOV et al., 2006). Este microRNA foi encontrado subexpresso em pacientes com lúpus levando a uma superativação da via do Interferon I (TANG et al., 2009). A expressão do miR-146a também foi encontrada desregulada em pacientes com psoríase, nos quais o miR-146 estava superexpresso em PBMC e lesões da pele (XIA et al., 2012).

O miR-155 também exerce um papel importante e conhecido no sistema imune por modular o desenvolvimento e as respostas imunológicas através da sua indução pelos receptores do tipo *toll* nos macrófagos e células dendríticas (O'CONNELL et al., 2007). Este miRNA também parece estar ligado a mudança de classe das imunoglobulinas em células B (revisado por GARO e MURUGAIYAN, 2016). MiR-155 está diferencialmente expresso em várias doenças autoimunes, como no lúpus e na doença de Behçet (revisado por DENG et al., 2015). Vários



estudos também indicam que tanto o miR-146a quanto o miR-155 estão superexpressos em células e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, uma doença autoimune (revisado por QU et al., 2014). Em um estudo realizado por nosso grupo, o miR-155 foi encontrado superexpresso em células Th2 CD4<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> e células B IgG<sup>+</sup> de pacientes com PFE inativo, o que pode indicar a sua participação na progressão da doença (CIPOLLA, 2012). Através de ferramentas de bioinformáticas (TargetScan 6.0), este mesmo estudo encontrou que os miRNA-146a e 150 são possíveis candidatos a regulação da resposta autoimune no pênfigo foliáceo.

MiR-223 e miR-150 também participam da regulação do desenvolvimento de células imunes. Enquanto o miR-223 regula a granulopoiese, o miR-150 parece ser crítico para a diferenciação de células B (revisado por PAULEY et al., 2009). Na dermatomiosite, uma doença autoimune que afeta a pele e os músculos, o miR-223 foi encontrado significativamente subexpresso em lesões de pele e no soro destes pacientes (revisado por DENG et al., 2015). O miR-150 foi encontrado subexpresso em fibroblastos e no soro de pacientes com esclerose sistêmica (revisado por DENG et al., 2015).

O miR-214 e o miR-223 foram encontrado superexpressos em lesões de pacientes com pênfigo foliáceo quando comparado com a pele não lesionada dos mesmos pacientes. Depois de investigar melhor o papel do miR-223, o autor sugere que este miRNA possa contribuir para a progressão do pênfigo ao ter como alvo a via da p38 MAPK, uma via de quinase ativada por estresse celular que leva a apoptose (CIPOLLA, 2016).

Embora muitos estudos mostrem que estes microRNAs estão diferencialmente expressos em várias doenças autoimunes, há poucos estudos que investiguem a presença destes microRNAs em exossomos e seu potencial como biomarcadores para doenças autoimunes. Como será mostrado a seguir, a maioria dos microRNAs alvos deste estudo foram encontrados em exossomos de estudos relacionados ao câncer.

O miR-145 foi detectado subexpresso em exossomos derivados de células humanas de carcinoma renal CD105<sup>+</sup> e o miR-146a foi encontrado superexpresso nesses mesmos exossomos (GRANGE et al, 2011). O miR-145 estava presente em níveis significativos em exossomos derivados de células A549 (carcinoma de pulmão humano) e em exossomos de urina de pacientes com diabetes tipo 1 com nefropatia

diabética incipiente (WANG et al., 2010) (BARUTTA et al., 2013). Além disso, o miR-145 também foi encontrado enriquecido em vesículas extracelulares, entre as quais se encontram os exossomos, em cultura de células endoteliais da veia umbilical humana transduzidas com KLF2 (HERGENREIDER et al., 2012). Este miRNA também já foi encontrado em exossomos séricos em um estudo sobre o crescimento do tumor de tireóide, no qual se sugere a utilização do miR-145 como biomarcador para o diagnóstico do câncer de tireóide (BOUFRAQECH et al, 2014).

Quatro alvos deste trabalho (miR-146a, miR-150, miR-155, e miR-214) foram encontrados em exossomos séricos durante um estudo sobre o uso de microRNAs exossomais derivados de tumores para biomarcadores de câncer de ovário (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2010). Neste estudo foi demonstrado o grande potencial do uso dos microRNAs exossomais circulantes como biomarcadores para o diagnósticos de doenças, como o câncer de ovário, já que podem refletir com precisão a condição celular e sua obtenção é menos invasiva que a realização de uma biópsia.

O miR-150 também já foi encontrado em exossomos da saliva, mostrando o potencial do uso de microRNAs exossomais salivares como biomarcadores para doenças das glândulas salivares (MICHAEL et al., 2010). O miR-223 foi encontrado em exossomos derivados de macrófagos em cultivo celular, regulando o potencial invasivo de células de câncer de mama (YANG, et al., 2011). O miR-223 e miR-146a foram identificados em exossomos isolados do soro de pacientes com câncer no esôfago (WARNECKE-EBERZ et al., 2015). O miR-223 e o miR-150 foram detectados superexpressos em exossomos do soro de pacientes com câncer colorretal (OGATA-KAWATA et al., 2014).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 GRUPO AMOSTRAL

O grupo amostral foi composto por 11 indivíduos saudáveis (controles), 16 pacientes com pênfigo foliáceo endêmico com lesões ativas e 3 pacientes com a doença inativa. Os pacientes foram diagnosticados com pênfigo foliáceo através de dados clínicos e imunohistoquímicos. Os controles são indivíduos da área endêmica, livres de qualquer patologia aparente e não aparentados. A caracterização da amostra com relação à idade, sexo, lesão no momento da coleta e tratamento estão descritas no ANEXO 1. Para as análises de dados, os indivíduos foram divididos nos seguintes grupos: controles (CON), pacientes com pênfigo ativo (PA) e pacientes com pênfigo inativo (PI). Os pacientes com pênfigo ativo foram subdivididos em dois grupos: pacientes com pênfigo ativo sem tratamento (PAST) e pacientes com pênfigo ativo com tratamento (PACT). As amostras biológicas dos controles e pacientes foram obtidas por venopunção no Hospital Adventista do Pênfigo, em Campo Grande-MS, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). A participação dos indivíduos ocorreu de forma voluntária, com livre consentimento e preenchimento de ficha de averiguação. Este Trabalho de Conclusão de Curso está inserido no projeto maior intitulado “Aspectos genéticos e imunológicos da doença autoimune pênfigo foliáceo”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEP-Biológicas), sob registro de número 020-05.

#### 3.2 ISOLAMENTO DOS EXOSSOMOS

Após a coleta, o sangue total dos indivíduos foi centrifugado a 1000 x g por 15 minutos para a separação do soro. Os exossomos foram isolados a partir de 300 µl do soro com a utilização do Total Exosome Isolation Reagent (from serum) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as informações do fabricante. O princípio do funcionamento do reagente é a união das moléculas de água, fazendo com que os componentes menos solúveis, como os exossomos, sejam expulsos da solução e precipitem ao passar por uma centrifugação curta e de baixa velocidade,

podendo então ser coletados e utilizados para análise posterior. Brevemente, as amostras de soro foram centrifugadas a 2000 x g por 30 minutos para remover células e detritos. Após centrifugação as amostras foram misturadas com 0,2 volumes (60µl) do reagente Total Exosome Isolation e foram incubadas na geladeira por 30 minutos. Por último, as amostras foram centrifugadas por 10000 x g por 10 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de PBS (*phosphate buffered saline*) 1X.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

Dois indivíduos controles (C639SAS e C682MER) e dois pacientes (P517SLS e P522AGS) foram selecionados da amostra de maneira aleatória para caracterização do exossomos por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e citometria de fluxo. Para isso, foi separada uma alíquota de 300 µl de soro destes indivíduos para isolamento dos exossomos de acordo com o protocolo descrito no item 3.2. As amostras foram ressuspensionadas em 200 µl de PBS 1X, dos quais 10 µl foram utilizados para o NTA e 190 µl para a citometria.

#### 3.3.1 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A determinação da concentração e distribuição de tamanho das vesículas foi baseada na taxa de movimentação Browniana de nanopartículas em um sistema de dispersão de luz. Para isso, foi utilizado o equipamento NanoSight LM10 (Malvern, Salisbury, Reino Unido) gentilmente cedido pelo Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná. Este equipamento é capaz de verificar a distribuição do tamanho e concentração das nanopartículas entre 10nm e 2000nm. A alíquota de 10 µl de cada amostra foi diluída em 1:1000 em PBS 1X antes de ser colocada no aparelho.

#### 3.3.2 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de analisar o tamanho e a granularidade de partículas microscópicas em suspensão através da dispersão de luz que estas geram ao serem incididas por um laser. Nesta técnica pode-se fazer o uso de anticorpos marcados com fluorocromos para estudar estruturas e moléculas

de interesse. Os exossomos foram caracterizados em relação aos seus marcadores de superfície padrão (CD9 e CD63) por citometria de fluxo. Para isso, foram utilizados os anticorpos anti-CD9 (PE) e anti-CD63 (FITC) da ImmunoTolls (Friesoythe, Alemanha). O conteúdo das alíquotas de 190 µl foi dividido em 4 alíquotas menores e diluído com PBS 1X para volume final de 100 µl. Em uma das alíquotas não foi adicionado nenhum anticorpo, na segunda foi adicionado 2 µl de anti-CD9, na terceira 2 µl anti-CD63 e na quarta foi adicionado 2 µl de anti-CD9 e 2 µl de anti-CD63. Após a adição dos anticorpos, as amostras foram mantidas refrigeradas (4-8 °C) no escuro por 30 minutos e depois centrifugadas por 10 minutos a 10000 x g. O *pellet* de vesículas foi ressuspensionado em 200 µl de PBS 1X e passado no citômetro em seguida.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE RNAs EXOSSOMAIS

Os RNAs exossomais foram extraídos pelo método que utiliza filtro de fibra de vidro com o mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, EUA). O protocolo foi adaptado para a utilização do trizol. Aos exossomos ressuspensionados em 200 µL de PBS 1X foram adicionados 300 µL de trizol. A seguir, foram adicionados 360 µL (volume de trizol mais clorofórmio) do tampão de lise do *kit* e a mistura de reação foi homogeneizada. Foi adicionado 2,5 fmol do cel-miR-39 (versão sintética do microRNA de *Caenorhabditis elegans*) como controle exógeno da extração e normalizador das reações de PCR quantitativa em tempo real. Depois foi adicionado 36 µL do reagente *homogenate additive* (1/10 do volume do tampão de lise) à amostra lisada. A mistura foi deixada no gelo por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 µL de clorofórmio (proporção de 1:5 de trizol) à solução. Esta foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos à velocidade de 10.000 x g em temperatura ambiente para separar a fase aquosa da orgânica. Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo e foram adicionados 1,25 volumes de etanol 100%. A mistura foi colocada no filtro e centrifugada por 15 segundos a 10.000 x g. O RNA ficou retido no filtro e foram realizadas três lavagens como descrito pelo fabricante. Por último, o RNA foi eluído com 50 µL da solução de eluição do *kit* e estocado à -80°C para posterior análise.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DO RNA

O RNA obtido de todas as amostras foi quantificado por fluorometria (Quantus®) para avaliar a concentração do RNA total exossomal. Foi utilizado o QuantiFluor® RNA System (Promega, Wisconsin, EUA) e misturado a 1 µL de amostra. Essa quantia já é suficiente para detectar pequenas quantidades de ácidos nucleicos, variando entre 0,1–500ng/µl.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS

A quantificação dos miRNAs alvos foi feita por PCR quantitativa em tempo real utilizando o método de sonda de hidrólise TaqMan. Primeiramente, foi realizada uma reação de transcrição reversa do RNA exossomal para cada alvo (miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223) e para o controle exógeno cel-miR-39 utilizando os reagentes da TaqMan® MicroRNA Assays e TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com o protocolo adaptado para metade do volume de reação (Tabela 1). Em seguida, foi realizada uma PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para cada microRNA alvo em duplicata utilizando os reagentes da TaqMan® MicroRNA Assays e da TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) com o protocolo também adaptado para metade do volume de reação (Tabela 2).

TABELA 1 - COMPONENTES E VOLUMES DA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

<b>Componentes</b>	<b>Volumes</b>
H <sub>2</sub> O	2,07 µl
10x tampão de transcrição reversa	0,75 µl
100mM dNTPs	0,08 µl
Inibidor de RNase	0,10 µl
Transcriptase reversa	0,50 µl
Primer de transcrição reversa	1,50 µl
Amostra de RNA	2,50 µl
<b>Total</b>	<b>7,50 µl</b>

FONTE: Protocolo da TaqMan® MicroRNA Assays adaptado para volume de reação de 7,50 µl. Não foi possível colocar as concentrações finais dos reagentes, pois estas não são informadas pelo fabricante.

TABELA 2 - COMPONENTES E VOLUMES DA REAÇÃO DE qPCR

<b>Componentes</b>	<b>Volumes</b>
H <sub>2</sub> O	3,80 µl
TaqMan® Micro RNA Assay (20X)	0,50 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2X), com UNG	5,00 µl
Produto da reação de transcrição reversa	0,70 µl
<b>Total</b>	<b>10,00 µl</b>

FONTE: Protocolo da TaqMan® MicroRNA Assays adaptado para volume de reação de 10,00 µl. Não foi possível colocar as concentrações finais dos reagentes, pois estas não são informadas pelo fabricante.

### 3.7 ANÁLISE DE DADOS

Para a quantificação dos miRNAs alvo foram utilizados o *Cq* médio das duplicatas e o método do  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  utilizando como normalizador o cel-miR-39. O  $\Delta Cq$  foi calculado como a diferença entre o *Cq* do miRNA alvo e do *Cq* do cel-miR-39. O  $\Delta\Delta Cq$  foi calculado como a diferença entre o  $\Delta Cq$  e a mediana do *Cq* do grupo controle de cada miRNA alvo. A significância estatística das diferenças de quantificação foi calculada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney. O limite de significância adotado foi de  $P \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4.03* (San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

A caracterização e quantificação dos exossomos foi realizada em uma amostra de 4 indivíduos – 2 pacientes e 2 controles – através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Esta análise destinou-se a mostrar se as vesículas isoladas eram correspondentes, em termos de tamanho, ao esperado para exossomos. Os resultados da média e da moda do tamanho das nanopartículas e as concentrações das nanopartículas obtidos são mostrados na Tabela 3. Os valores obtidos de média e moda sugerem que a maior parte das vesículas isoladas são do tamanho esperado para os exossomos (30 –150 nm). A concentração média dos exossomos após o isolamento foi  $6,60 \times 10^8$  partículas/ml. Um estudo que partiu de um volume inicial de 250  $\mu$ L de soro e utilizou o mesmo reagente para isolamento dos exossomos obteve uma concentração de  $2,07 \times 10^9$  partículas/ml (CROSSLAND et al., 2016). Entretanto não é possível realizar uma comparação direta entre os trabalhos, pois a diluição dos exossomos pode ter sido diferente, e isso afetaria a concentração final de partículas.

TABELA 3 – TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Indivíduo	Média (nm)	Moda (nm)	Concentração (partículas/ml)
C639SAS	184	66,2	$1,55 \times 10^9$
C682MER	130,3	96,3	$4,20 \times 10^8$
P517SLS	115,9	91,8	$4,37 \times 10^8$
P522AGS	147,2	85,9	$2,35 \times 10^8$
Média	144,35	85,05	$6,60 \times 10^8$

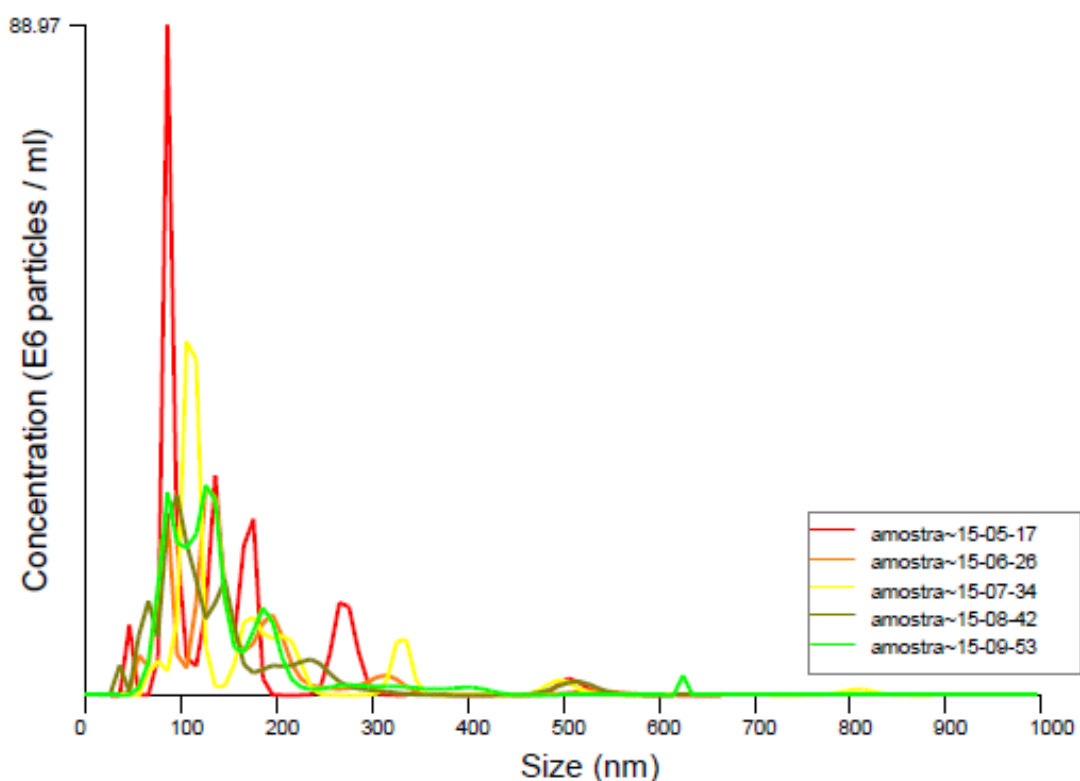
FONTE: O AUTOR (2016)

A FIGURA 5 mostra a distribuição das nanopartículas isoladas do indivíduo P522AGS por tamanho e concentração. Pode-se observar que grande parte das nanopartículas isoladas está na faixa de tamanho esperado para os exossomos, com um grande pico um pouco abaixo de 100 nm. Os resultados evidenciam que estão sendo obtidas frações de vesículas séricas enriquecidas em vesículas do



tamanho de exossomos. Uma pequena fração correspondente a outras vesículas extracelulares maiores que estão sendo isoladas concomitantemente com os exossomos, como microvesículas, o que é esperado, uma vez que todos os métodos de isolamento de vesículas extracelulares obtêm frações enriquecidas e não de frações exclusivas de um subtipo de vesículas.

FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ISOLADAS DO INDIVÍDUO P522AGS POR TAMANHO E CONCENTRAÇÃO



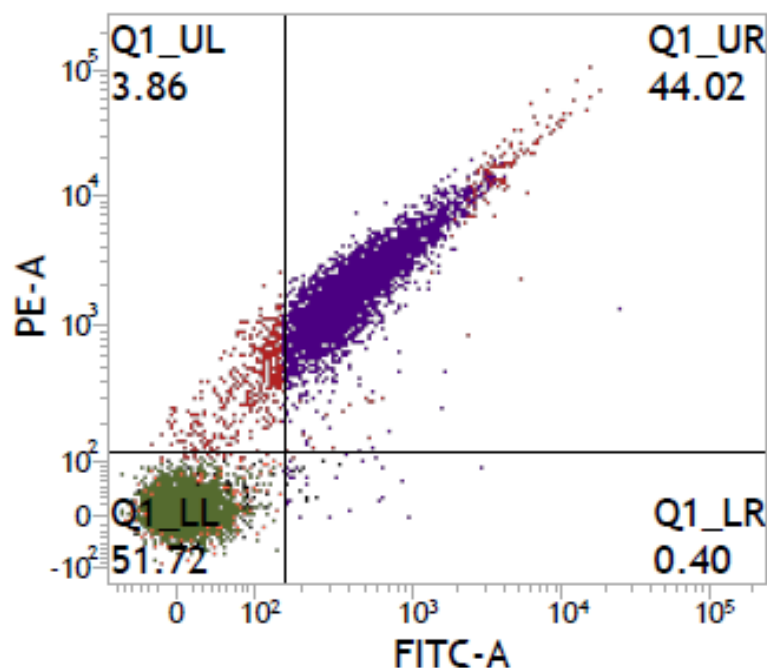
FONTE: O AUTOR (2016)

Os exossomos isolados a partir do soro também foram caracterizados em relação aos marcadores de superfície padrão CD9 e CD63 (FIGURA 6). É possível verificar que existe uma população (44,02%) duplamente marcada para esses dois anticorpos, sugerindo que esta população se trata dos exossomos. O gráfico também mostra uma população (51,72%) duplamente negativa para os dois anticorpos, sugerindo mais uma vez que estão sendo isoladas outras partículas junto com os exossomos. Não foram encontrados dados na literatura do tamanho das

populações duplamente marcadas ou duplamente negativas para estes anticorpos, limitando assim possíveis comparações.

A utilização destas duas técnicas de caracterização dos exossomos foi importante para mostrar que de fato está sendo obtida uma fração enriquecida em exossomos através de precipitação a partir do soro. Esta fração enriquecida com exossomos também contém outras partículas, de tamanho superior a 150 nm e não marcadas para CD9 e CD63. Isso corrobora com outros relatos de que reagentes usados para isolar exossomos por precipitação causam co-precipitação de vesículas maiores e outras partículas não relacionadas aos exossomos, como complexos proteicos, lipoproteínas e restos celulares (CROSSLAND et al., 2016). Além de caracterizar proteínas frequentemente presentes em exossomos (CD9 e CD63), também é recomendado caracterizar proteínas que não deveriam estar presentes nestas vesículas, como argonauta e o citocromo C (LÖTVALL et al., 2014). Não foi possível tal caracterização neste estudo, mas o grupo de pesquisa pretende fazê-la em um futuro breve.

FIGURA 6 – CITOMETRIA DE FLUXO PARA CD9 E CD63 DA AMOSTRA P522AGS



FONTE: O AUTOR (2016)

## 4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS

Os microRNAs alvos (miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223) e o controle exógeno (cel-miR-39) foram quantificados por PCR quantitativa em tempo real. Todos os microRNAs foram normalizados com base no cel-miR-39. A utilização do cel-miR-39 como normalizador permite que sejam detectadas perdas de amostra e outros problemas resultantes da extração do RNA (HASTINGS et al., 2012). Embora fosse de grande valia utilizar também um controle endógeno, não foi possível a utilização deste, já que ainda não existem controles endógenos definidos para exossomos (CROSSLAND et al., 2016). Apesar disso, um estudo recente sugeriu que os miRNAs HY3 e U6 possam ser bons controles endógenos para a análise de expressão dos miRNAs de vesículas extracelulares séricas devido a sua expressão estável dentro destas (CROSSLAND et al., 2016). Os resultados dos *Cqs* (*cycle quantification*) obtidos foram analisados por quantificação relativa através do método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (ANEXO 1). O *fold* indica a diferença de expressão dos microRNAs entre as amostras testadas (FIGURA 7).

De acordo com a literatura, todos os microRNAs alvos deste estudo já tinham sido encontrados em exossomos séricos em diversas condições patológicas, principalmente em diversos tipos de câncer (GRANGE et al, 2011; TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2010; WARNECKE-EBERZ et al., 2015; OGATA-KAWATA et al., 2014). Visto que estes microRNAs já foram encontrados diferencialmente expressos em várias doenças autoimunes incluindo o PFE, era esperado que os microRNAs alvos fossem encontrados nos exossomos séricos, e de fato isso aconteceu. Dos microRNAs analisados, o que estava presente em maior quantidade nos exossomos foi o miR-223, com *Cq* médio (grupo controle) de 30,31. Já o miR-214, foi o microRNA presente em menor quantidade, com *Cq* médio (grupo controle) de 36,82. Os outros microRNAs tiveram um *Cq* médio (grupo controle) entre 34,02 e 35,67. Três pacientes com pênfigo tiveram que ser excluídos da análise para o miR-155 pois não amplificaram para este alvo, provavelmente por possuírem uma quantidade muito pequena deste miRNA.

Não foram encontradas diferenças significativas quando comparado o grupo controle (CON) com pacientes com pênfigo ativo (PA), pacientes com pênfigo inativo (PI), pacientes com pênfigo ativo sem tratamento (PAST) ou pacientes com pênfigo ativo com tratamento (PACT) para o miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-

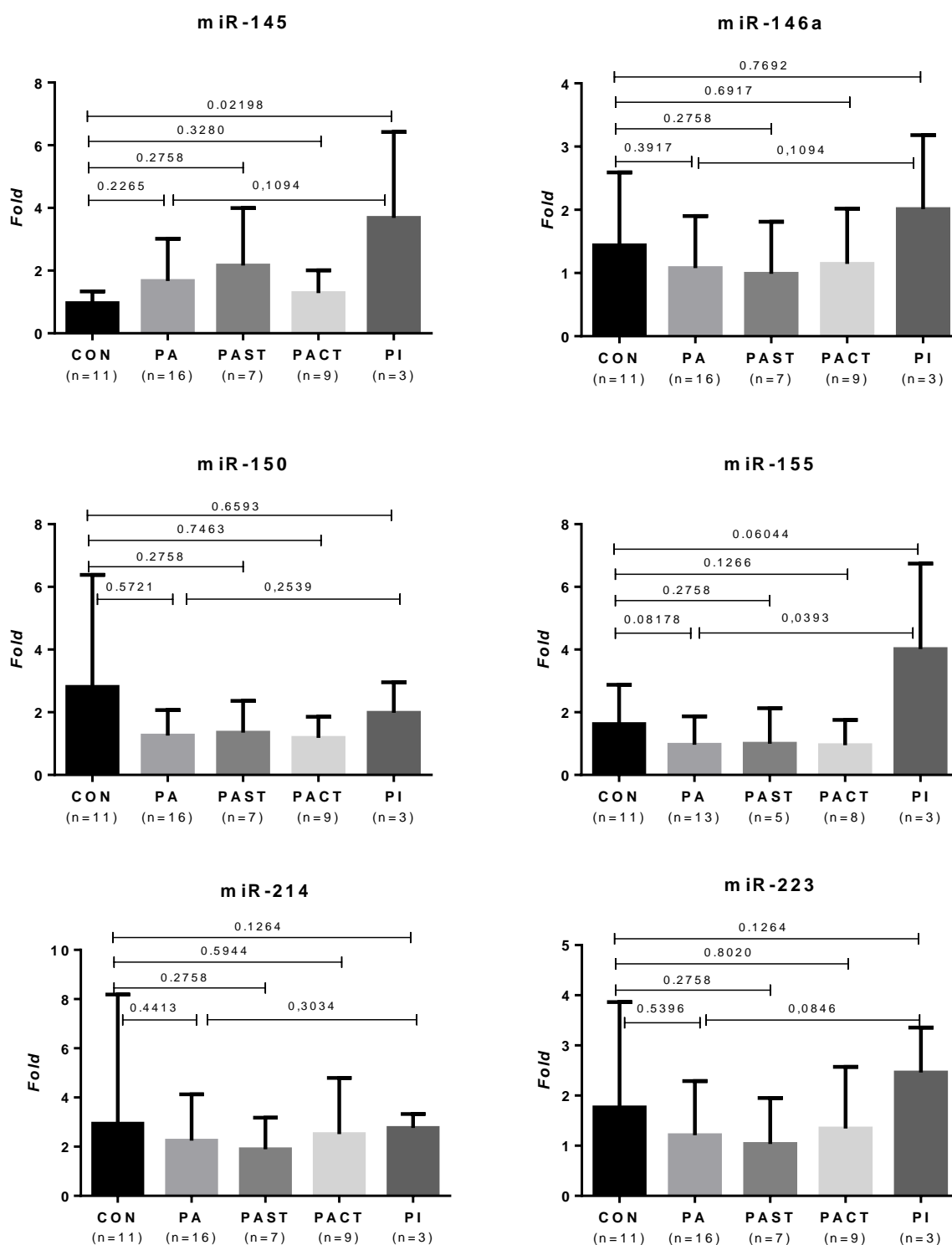
223 (valores de p disponíveis na FIGURA 7). Houve uma diferença significativa na quantidade de miR-145 entre controles e pacientes com pênfigo inativo ( $p = 0,02198$ ,  $fold = 3,68$ ), mas não entre o controle e os outros grupos amostrais (PA, PAST e PACT) para este microRNA (FIGURA 7). Quando comparados os grupos PI e PA para todos os microRNAs alvos, o único microRNA com diferença significativa na quantidade foi o miR-155 ( $p = 0,0393$ ).

Em estudo de microRNAs no nível celular no PFE realizado por nosso grupo, não foi encontrado a presença do miR-145 em níveis detectáveis nas células B IgG<sup>+</sup> e células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em nenhuma das amostras, que incluíam controles, pacientes com a doença ativa e pacientes com a doença inativa (CIPOLLA, 2012). Diferente dos achados celulares, foi detectada a presença do miR-145 em exossomos de todos os grupos amostrais neste estudo. Este resultado sugere que em algum outro tipo celular ocorre uma expressão maior deste microRNA e revela a importância de novos estudos para investigar a origem destes exossomos que carregam miR-145. Outra possível explicação é que os exossomos tem a capacidade de fazer uma seleção dos microRNAs que serão empacotados, e por isso, podem estar mais enriquecidos nos exossomos do que na sua célula de origem. Ainda não se sabe como este mecanismo de seleção ocorre, mas um trabalho realizado por Koppers-Lalic et al. (2014) analisou um painel humano de células B e seus exossomos e mostrou que miRNAs adenilados na terminação 3' estão enriquecidos nas células, enquanto as isoformas uridiladas estão enriquecidas em exossomos relevando assim um possível papel das modificações pós traducionais no empacotamento dos miRNAs exossomais.

Neste estudo, o miR-145 foi encontrado em uma quantidade estatisticamente significativa maior em pacientes com pênfigo inativo que em controles ( $p = 0,02198$ ,  $fold = 3,68$ ). Esta descoberta pode sugerir que este microRNA esteja envolvido com a patogênese do PFE e contribua de alguma maneira para a inativação da doença. Entretanto, devido ao pequeno número amostral qualquer interpretação a respeito deve ser cautelosa e sugerem-se mais estudos para corroborar este resultado.

Embora não tenham tido significância estatística, é possível ver uma tendência de maior quantidade do miR-155 em controles do que em pacientes com pênfigo ativo ( $p = 0,08178$ ,  $fold = 1,62$ ) e uma quantidade maior deste miRNA em

FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS NOS DIFERENTES GRUPOS AMOSTRAIS



FONTE: O AUTOR (2016)

NOTA: Dados representados por média  $\pm$  desvio padrão. Acima das linhas horizontais são mostrados os valores de p. CON: controle; PA: pênfigo ativo; PAST: pênfigo ativo sem tratamento; PACT: pênfigo ativo com tratamento; PI: pênfigo inativo.

pacientes com pênfigo inativo quando comparado com os níveis em controles ( $p = 0,06044$ ,  $fold = 4,02$ ). Esta última tendência vai de encontro aos achados da pesquisa de Cipolla (2012), no qual o miR-155 foi encontrado 2 vezes mais expresso em células B IgG<sup>+</sup> e 3 vezes mais expressos em células Th2 CD4<sup>+</sup>CD294<sup>+</sup> de pacientes com pênfigo inativo do que em controles. Também é importante ressaltar que neste presente trabalho o miR-155 foi encontrado em uma quantidade significativa maior em pacientes com pênfigo inativo do que em pacientes com pênfigo ativo ( $p = 0,0393$ ). Todos estes dados juntos sugerem que este microRNA pode ter uma função na progressão da doença e da passagem do estado ativo, com a presença de novas bolhas, para o estado inativo.

Visto que o miR-214 e o miR-223 tinham sido encontrados superexpressos em lesões de pacientes com pênfigo foliáceo (CIPOLLA, 2016), era de se esperar que talvez estivessem presentes em quantidades diferenciadas em exossomos de pacientes com pênfigo quando comparados com os controles, porém essa diferença não foi vista. É interessante notar que de todos os miRNAs alvos o miR-214 foi o miRNA presente em menor quantidade no grupo amostral, sugerindo que este microRNA pode ter uma função celular no pênfigo mas não ser empacotado nos exossomos. No outro oposto, o miR-223 foi o miRNA mais enriquecido nos exossomos de pacientes e controles. É possível que outras células, além das lesionadas pelo pênfigo, estejam liberando exossomos enriquecidos com miR-223.

O miR-146a e miR-150 foram selecionados para este estudo por serem possíveis candidatos a reguladores da resposta autoimune no PFE. Entretanto, não foi possível observar diferença entre quantidades destes miRNAs nos exossomos de pacientes e controles. São necessários mais estudos no nível celular pra verificar a relação deste microRNAs com o pênfigo.

Na maioria das colunas dos gráficos da quantificação dos microRNAs alvos (FIGURA 7) é possível ver que as barras de erro são bem grandes, mostrando que a variação entre os indivíduos (desvio padrão) de um mesmo grupo foi grande. Algumas variações podem ter sido causadas devido a alguma característica do indivíduo que não foi levada em conta no momento da seleção da amostra como, por exemplo, a etnia dos indivíduos. O pequeno número amostral e a grande variação entre os indivíduos, pode ter sido um dos fatores que influenciou em não serem encontradas diferenças significativas, e apenas tendências, no miR-155 por

exemplo. Aumentando o número amostral talvez seja possível reduzir o desvio padrão e encontrar resultados mais fidedignos.

Este trabalho mostra como é delicado trabalhar com microRNAs exossomais, já que alguns estão presentes em quantidades relativamente baixas dentro dos exossomos. Além dos três pacientes com pênfigo que não amplificaram para o miR-155, dois indivíduos do grupo controle apresentaram *C<sub>q</sub>s* bem elevados (39,85 e 40,96) para este mesmo microRNA. Dois indivíduos também tiveram um *C<sub>q</sub>* bastante alto para o miR-214 (39,85 e 40,96). É necessário ter cautela ao analisar esses dados, e para os fins desta pesquisa essas ampliações, mesmo com *C<sub>q</sub>* altos, não foram excluídas das análises estatísticas. Também é importante notar que diferenças de expressão de microRNAs no nível celular podem não ser encontradas nos exossomos, fator que pode ser explicado devido ao mecanismo de seleção preferencial dos miRNAs no empacotamento dos exossomos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os exossomos foram isolados com sucesso a partir do soro de pacientes com pênfigo e controles, como demonstrado através de NTA e citometria de fluxo. Foi demonstrado que o método de isolamento de exossomos por precipitação é eficaz em fornecer uma fração enriquecida em exossomos.

Neste estudo foi constatado que os miRNA alvos (miR-145, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-214 e miR-223) estão presentes em exossomos séricos de controles saudáveis e de pacientes com pênfigo. Porém, não foi vista diferença significativa na quantidade destes miRNAs entre pacientes com pênfigo ativo e controles. Dois microRNAs (miR-145 e miR-155) foram encontrados enriquecidos em pacientes com pênfigo inativo, sugerindo uma possível função na progressão da doença.

Este estudo inicial com microRNAs exossomais séricos no PFE revelou tendências que merecem ser melhor exploradas em amostras mais numerosas. Por isso, é de grande valia aumentar o número amostral para analisar se as tendências e os resultados encontrados aqui serão ou não validadas em novos estudos. É imprescindível que se investigue mais estes miRNAs antes de se chegar a uma conclusão sobre seu uso como biomarcadores para o pênfigo.



## 6 REFERÊNCIAS

AMAGAI, M. Pemphigus as a paradigm of autoimmunity and cell adhesion. **The Keio Journal of Medicine**, v. 51, n. 3, p. 133-139, 2002.

AMAGAI, M.; KOCH, P.; NISHIKAWA, T.; STANLEY, J. Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Is Localized in the Lower Epidermis, the Site of Blister Formation in Patients. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, n. 2, p. 351-355, 1996.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.

AOKI, V.; RIVITTI, E.; DIAZ, L. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 18-26, 2015.

AOKI, V.; SOUSA, J.; DIAZ, L. Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 3, p. 413-418, 2011.

BARUTTA, F., TRICARICO, M., CORBELLI, A., ANNARATONE, L., PINACH, S., GRIMALDI, S., BRUNO, G., CIMINO, D., TAVERNA, D., DEREGIBUS, M. C., RASTALDI, M. P., PERIN, P. C. E GRUDEN, G. Urinary Exosomal MicroRNAs in Incipient Diabetic Nephropathy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e73798, 2013.

BEUTNER, E.; JORDON, R. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. **Experimental Biology and Medicine**, v. 117, n. 2, p. 505-510, 1964.

BOUFRAQECH, M., ZHANG, L., JAIN, M., PATEL, D., ELLIS, R., XIONG, Y., HE, M., NILUBOL, N., MERINO, M. J. E KEBEBEW, E. miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. **Endocrine Related Cancer**, v. 21, n. 4, p. 517-531, 2014.

BYSTRYN, J; GRANDO, S. A novel explanation for acantholysis in pemphigus vulgaris: The basal cell shrinkage hypothesis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 3, p. 513-516, 2006.

CIPOLLA, G. A. **Análise de expressão de microRNA candidatos à regulação da resposta imune adaptativa em pênfigo foliáceo**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CIPOLLA, G. A. **Implicações da expressão diferencial de micrnas e de variação genética em seus sítios-alvo para a patogênese e terapia do pênfigo**. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

CROSSLAND, R.; NORDEN, J.; BIBBY, L.; DAVIS, J.; DICKINSON, A. Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. **Journal of Immunological Methods**, v. 429, p. 39-49, 2016.

DENG, X., SU, Y., WU, H., WU, R., ZHANG, P., DAI, Y., CHAN, T., ZHAO, M. E LU, Q. The Role of MicroRNAs in Autoimmune Diseases with Skin Involvement. **Scand J Immunol**, v. 81, n. 3, p. 153-165, 2015.

DIAZ, LA., Sampaio, SA., Rivitti, EA., et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). I. Clinical features and immunopathology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 657-669, 1989.

Diaz LA., Sampaio, SA., Rivitti, EA., et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). II. Current and historic epidemiologic studies. **Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p.4-12, 1989.

EL ANDALOUSSI, S., MÄGER, I., BREAKEFIELD, X. O. E WOOD, M. J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 347-357, 2013

GARO, L., MURUGAIYAN, G. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 73, n. 10, p. 2041-2051, 2016.

GRANDO, S. Pemphigus autoimmunity: Hypotheses and realities. **Autoimmunity**, v. 45, n. 1, p. 7-35, 2011.

GRANGE, C., TAPPARO, M., COLLINO, F., VITILLO, L., DAMASCO, C., DEREGIBUS, M. C., TETTA, C., BUSSOLATI, B. E CAMUSSI, G. Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. **Cancer Research**, v. 71, n. 15, p. 5346-5356, 2011.

HARDING, C., HEUSER, J., STAHL, P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. **Eur. J. Cell Biol.** v. 35, n. 2, p. 256–263, 1984.

HASTINGS, M.; PALMA, J.; DUELLI, D. Sensitive PCR-based quantitation of cell-free circulating microRNAs. **Methods**, v. 58, n. 2, p. 144-150, 2012.

HE, L.; HANNON, G. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HERGENREIDER, E., HEYDT, S., TRÉGUER, K., BOETTGER, T., HORREVOETS, A. J. G., ZEIHNER, A. M., SCHEFFER, M. P., FRANGAKIS, A. S., YIN, X., MAYR, M., BRAUN, T., URBICH, C., BOON, R. A. E DIMMELER, S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 249-256, 2012.

HU, G.; DRESCHER, K.; CHEN, X. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. **Front. Gene.**, v. 3, 2012.

KALRA, H.; DRUMMEN, G.; MATHIVANAN, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. **IJMS**, v. 17, n. 2, p. 170, 2016.

KELLER, A., LEIDINGER, P., LANGE, J., BORRIES, A., SCHROERS, H., SCHEFFLER, M., LENHOF, H., RUPRECHT, K. E MEESE, E. Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7440, 2009.

KOCH, P.J., WALSH, M.J., SCHMELZ, M., et al. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. **Eur J Cell Biol** 1990;53:1–12.

KOPPERS-LALIC, D., HACKENBERG, M., BIJNSDORP, I., VAN EIJDHOVEN, M., SADEK, P., SIE, D., ZINI, N., MIDDELDORP, J., YLSTRA, B., DE MENEZES, R., WÜRDINGER, T., MEIJER, G. E PEGTEL, D. Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. **Cell Reports**, v. 8, n. 6, p. 1649-1658, 2014.

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

LÖTVALL, J., HILL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DI VIZIO, D., GARDINER, C., SONG GHO, Y., KUROCHKIN, I. V., MATHIVANAN, S., QUESENBERRY, P., SAHOO, S., TAHARA, H., WAUBEN, M. H., WITWER, K. W. E THÉRY, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 0, 2014.

LU, M., LAI, N., CHEN, H., YU, H., HUANG, K., TUNG, C., HUANG, H. E YU, C. Decreased microRNA(miR)-145 and increased miR-224 expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus involved in lupus immunopathogenesis. **Clin Exp Immunol**, v. 171, n. 1, p. 91-99, 2012.

LUDWIG, A.; GIEBEL, B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 11-15, 2012.

MACFARLANE, L.; R. MURPHY, P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **CG**, v. 11, n. 7, p. 537-561, 2010.

MAHONEY, M. G., WANG, Z., ROTHENBERGER, K., KOCH, P. J., AMAGAI, M. E STANLEY, J. R. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 4, p. 461-468, 1999.

MICHAEL, A., BAJRACHARYA, S., YUEN, P., ZHOU, H., STAR, R., ILLEI, G. E ALEVIZOS, I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. **Oral Diseases**, v. 16, n. 1, p. 34-38, 2010.

O'CONNELL, R.; TAGANOV, K.; BOLDIN, M.; CHENG, G.; BALTIMORE, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response.

**Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604-1609, 2007.

OGATA-KAWATA, H., IZUMIYA, M., KURIOKA, D., HONMA, Y., YAMADA, Y., FURUTA, K., GUNJI, T., OHTA, H., OKAMOTO, H., SONODA, H., WATANABE, M., NAKAGAMA, H., YOKOTA, J., KOHNO, T. E TSUCHIYA, N. Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92921, 2014.

PAULEY, K.; CHA, S.; CHAN, E. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 32, n. 3-4, p. 189-194, 2009.

PERERA, R.; RAY, A. MicroRNAs in the Search for Understanding Human Diseases. **BioDrugs**, v. 21, n. 2, p. 97-104, 2007.

QU, Z.; LI, W.; FU, B. MicroRNAs in Autoimmune Diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 527895, 2014.

RAPOSO, G. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161-1172, 1996.

ROBBINS, P.; MORELLI, A. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195-208, 2014.

SCHILTZ JR, MICHEL B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. **Journal of Investigative Dermatology** 1976; 67: 254–60.

SHIRAKATA, Y., AMAGAI, M., HANAKAWA, Y., NISHIKAWA, T. E HASHIMOTO, K. Lack of Mucosal Involvement in Pemphigus Foliaceus May be Due to Low Expression of Desmoglein 1. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 1, p. 76-78, 1998.

TAGANOV, K.; BOLDIN, M.; CHANG, K.; BALTIMORE, D. NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12481-12486, 2006.

TANG, Y.; LUO, X.; CUI, H. et al. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*, v. 60, n. 4, p. 1065-1075, 2009.

TAYLOR, D.; GERCEL-TAYLOR, C. Corrigendum to “MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer” [Gynecologic Oncology 110: 13–21, 2008]. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 1, p. 153, 2010.

VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., SJÖSTRAND, M., LEE, J. J. E LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VAN DER POL, E., BOING, A. N., HARRISON, P., STURK, A. E NIEUWLAND, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 676-705, 2012.

WANG, J., ZHENG, S., XIN, N., DOU, C., FU, L., ZHANG, X., CHEN, J., ZHANG, Y., GENG, D., XIAO, C., CUI, G., SHEN, X., LU, Y., WANG, J., DONG, R., QIAO, Y. E ZHANG, Y. Identification of Novel MicroRNA Signatures Linked to Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Pathogenesis: Down-Regulated miR-145 Promotes Pathogenetic Th17 Cell Response. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 1287-1302, 2013.

WARNECKE-EBERZ, U., CHON, S., HÖLSCHER, A. H., DREBBER, U. E BOLLSCHWEILER, E. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. **Tumor Biology**, v. 36, n. 6, p. 4643-4653, 2015.

XIA, P.; FANG, X.; ZHANG, Z. et al. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions. **Immunology Letters**, v. 148, n. 2, p. 151-162, 2012.

YÁÑEZ-MÓ, M., SILJANDER, P. R., ANDREU, Z., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 0, 2015.

YANG, M., CHEN, J., SU, F., YU, B., SU, F., LIN, L., LIU, Y., HUANG, J. E SONG, E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 117, 2011.

ZERINGER, E., BARTA, T., LI, M. E VLASSOV, A. V. Strategies for Isolation of Exosomes. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 4, p. pdb.top074476, 2015.

ZHANG, J., LI, S., LI, L., LI, M., GUO, C., YAO, J. E MI, S. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 17-24, 2015.

## ANEXO 1 – DADOS DO GRUPO AMOSTRAL E VALORES OBTIDOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORNAS ALVOS

Código	Idade	Sexo	Lesão na coleta	Em Tratamento	Cq miR-39	Cq miR-145	Cq miR-146a	Cq miR-150	Cq miR-155	Cq miR-214	Cq miR-223
					Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	
C638IAC	33	M	---	---	23,69	35,64	34,99	35,46	36,37	37,89	32,08
C639SAS	36	F	---	---	23,01	33,84	34,19	34,47	35,70	36,47	34,02
C656ITS	36	M	---	---	26,20	37,62	37,00	36,93	36,67	40,96	32,40
C665HCF	33	M	---	---	25,54	37,02	36,97	34,99	38,20	35,03	32,39
C676WBS	18	M	---	---	23,14	35,84	32,77	31,60	34,88	36,17	27,72
C681VAS	44	M	---	---	24,78	36,39	33,82	32,51	35,79	35,91	28,87
C682MER	27	F	---	---	21,16	32,79	32,19	31,26	34,43	34,82	27,75
C683TCS	57	F	---	---	22,07	34,23	34,14	33,37	36,04	35,85	29,07
C690AXA	51	F	---	---	23,45	35,03	34,85	34,87	35,94	38,03	31,09
C691AXU	37	F	---	---	21,41	32,60	32,57	32,89	32,98	34,00	27,56
C692LHF	66	M	---	---	22,69	35,68	33,86	35,90	35,39	39,85	30,45
P242NRS	56	F	Não	---	21,00	29,87	30,68	31,18	30,82	33,18	26,04
P243ERS	70	M	Não	---	21,38	32,69	33,14	32,77	32,79	33,91	27,19
P262OBL	41	M	Sim	---	22,38	35,42	35,69	35,35	ND	37,71	31,41
P307LRS	30	F	Não	---	22,91	32,84	32,72	32,69	34,25	34,85	28,88
P325CEA	47	M	Sim	---	21,12	30,84	31,03	31,63	32,33	33,09	26,50
P362BCP	54	F	Sim	---	20,98	31,21	31,40	32,19	34,37	33,59	25,96
P390BLW	32	F	Sim	---	21,61	32,91	31,53	31,64	32,90	33,31	26,94
P391XQG	15	F	Sim	---	23,15	34,61	34,28	34,59	35,68	34,49	29,08
P398HKU	49	F	Sim	---	21,54	32,95	32,04	32,83	33,52	34,12	28,25
P399LAF	33	M	Sim	---	22,78	33,14	32,78	33,25	35,73	33,65	29,75
P506DLP	15	M	Sim	Não	22,27	32,57	34,54	33,10	39,03	35,09	28,67
P517SLS	33	M	Sim	Não	22,45	35,50	35,22	34,35	ND	35,24	31,25
P520FRA	12	M	Sim	Sim	22,91	34,34	34,37	33,69	37,29	37,17	29,90
P521RSO	41	F	Sim	Não	21,36	31,95	32,22	32,29	36,16	35,02	35,02
P522AGS	32	F	Sim	Não	24,28	33,49	34,65	33,82	36,31	35,94	35,94
P523JAR	45	M	Sim	Sim	22,16	33,93	35,77	32,88	36,16	36,03	30,75
P524JLU	68	M	Sim	Não	22,67	35,91	35,29	35,71	ND	37,01	31,22
P527LSP	19	M	Sim	Sim	21,84	33,90	35,68	34,84	36,94	35,85	30,82
P530GAP	14	F	Sim	Não	21,87	33,47	34,38	33,61	35,87	35,92	29,79

ND: Não determinado. --- = Grupo controle