

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAOLA LUCIO ROSA

**QUANTIFICAÇÃO DOS microRNAs miR-145 E miR-146a EM EXOSSOMOS DE  
PACIENTES COM PÊNFIGO VULGAR E CONTROLES**

CURITIBA

2016

**PAOLA LUCIO ROSA**



**QUANTIFICAÇÃO DOS microRNAs miR-145 E miR-146a EM EXOSSOMOS DE  
PACIENTES COM PÊNFIGO VULGAR E CONTROLES**

Projeto de monografia apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Profa. Dra. Danielle Malheiros

CURITIBA

2016

## RESUMO

Exossomos são pequenas vesículas produzidas por diversos tipos celulares, exercendo muitas funções desconhecidas, e outras parcialmente conhecidas como a sinalização e regulação do sistema imune. Essas vesículas possuem um conteúdo complexo de proteínas e RNAs e interagem com diferentes células do organismo, gerando respostas imunológicas. Há muitos estudos que indicam que os exossomos são capazes de gerar respostas do sistema complemento e aumentar a dispersão de fatores cancerosos em metástases de acordo com seu conteúdo representativo da célula de origem. Além disso alguns microRNAs presentes em exossomos são bons candidatos à regulação da resposta imune adaptativa de pênfigo vulgar, uma doença autoimune que afeta pele e mucosas, causada pela produção de autoanticorpos contra desmogleínas da epiderme. Em função do seu conteúdo e de serem encontrados em todos os fluidos biológicos, tais como sangue, urina, saliva, e líquido mamário, os exossomos são considerados potenciais biomarcadores para os mais diferentes tipos de doenças. Tendo em vista a função de exossomos na regulação do sistema imune, muitas doenças autoimunes vêm despertando interesse para estudos relacionados a exossomos. Considerando essas informações prévias, o objetivo desse estudo foi verificar se os microRNAs selecionados - miR-145 e miR-146a – estão presentes em exossomos séricos e avaliar se existem diferenças quantitativas destes miRNAs entre pacientes com a doença autoimune pênfigo vulgar e controles saudáveis. Para tanto, PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para as quantificações. Houve diferença significativa entre os níveis de miR-145 em pacientes com pênfigo vulgar sob tratamento e controles, com valor de P igual a 0,0205, mas não para o miR-146a (P= 0,3867), sugerindo que há empacotamento diferenciado de microRNAs nos exossomos de pessoas com a doença autoimune de pênfigo vulgar e saudáveis. Estudos futuros, com amostras maiores são necessários para corroborar os resultados aqui encontrados.

Palavras-chave: Exossomos. MicroRNA. Pênfigo Vulgar. MiR-145. MiR-146a. Doença autoimune. Biomarcadores

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA .....	1
1.2 OBJETIVOS .....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	3
1.1.1 Classificação de vesículas.....	5
1.2 MicroRNAs.....	7
1.2.1 miRNAs alvos.....	9
1.3 PÊNFIGO VULGAR.....	11
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	15
3.3 EXTRAÇÃO DE microRNA.....	17
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE RNA.....	17
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE miRNAs.....	18
3.6 ANÁLISE DOS DADOS.....	19
4 RESULTADOS .....	20
4.1 Análise estatística.....	20
5 DISCUSSÃO .....	23
Referências .....	25

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Em organismos multicelulares as funções biológicas são realizadas por complexas organizações celulares coordenadas por comunicação, as quais ocorrem comumente através de moléculas solúveis específicas e seus receptores celulares, mas também podem ocorrer através de troca de fragmentos complexos, membranas ou organelas especializadas como vesículas (LEE et al., 2011).

Células procarióticas e eucarióticas liberam vesículas extracelulares, formadas por bicamadas lipídicas, no espaço intersticial. Essas vesículas vêm despertando interesse, pois possuem muitas funções de utilidade clínica como sinalização celular através do carregamento de variadas proteínas e RNAs. Os materiais genéticos carregados por essas vesículas podem possuir conteúdos semelhantes aos de sua célula de origem, sendo muito úteis em estudos de sinalização de tumores, além de serem facilmente coletados em fluídos corporais como o sangue (LEE et al., 2011).

Um dos grandes conteúdos dessas vesículas é o microRNA, uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificante altamente conservada entre diferentes espécies. Os microRNAs estão envolvidos com diversas funções celulares, mostrando potenciais alterações na presença de algumas doenças humanas, como mostram alguns estudos em que certos miRNAs aparecem em quantidades e expressões alteradas em doenças autoimunes, tumores, infecções entre outras. Muitos miRNA estão relacionados com células específicas do sistema imune (células T e células B), sugerindo que em casos de doenças autoimunes, a expressão desses miRNAs podem estar alterada, sendo um ótimo biomarcador para a detecção da doença e permitindo o prognóstico antecipado, como no caso do pênfigo vulgar - uma doença autoimune que afeta a pele e mucosas, através da produção de auto-anticorpos patogênicos contra as desmogleínas da epiderme (KROL et al., 2010)

Biomarcadores ideais devem ser específicos para o tecido da doença, apresentar uma longa meia-vida, sensíveis às mudanças da patologia com detecção rápida e acessível por métodos não invasivo, critérios nos quais muitos miRNAs presentes em exossomos se encaixam naturalmente, desta maneira a pesquisa associada a miRNAs usados como biomarcadores na doença do pênfigo pode ser

muito vantajosa, permitindo a detecção de susceptibilidade do desenvolvimento de uma doença, sua progressão e antecipar o prognóstico e tratamento precoce.

## 1.2 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Verificar se os microRNAs selecionados - miR-145 e miR-146a - estão presentes em exossomos séricos e, se estiverem, avaliar se existem diferenças quantitativas destes miRNAs entre pacientes com pênfigo vulgar e controles.

### Objetivos Específicos

- Isolar os exossomos do soro de pacientes com pênfigo vulgar e controles;
- Isolar miRNAs exossomais e quantificar os miRNA-145 e miRNA-146a em indivíduos com pênfigo vulgar e indivíduos controle.
- Verificar se alguns dos microRNAs analisados se comporta como um bom biomarcador candidato para o pênfigo vulgar.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 VESÍCULAS EXTRACELULARES

Em 1940 foram realizados estudos abordando a coagulação sanguínea, mostrando que o plasma, livre de células, continha um fator derivado das células que promovia a coagulação sanguínea. 20 anos depois esse fator foi identificado por microscopia eletrônica como sendo pequenas vesículas provenientes de plaquetas que possuíam entre 20 e 50 nm de diâmetro. Enquanto isso, o nome “exossomo” surgiu com o isolamento de vesículas de reticulócitos ovinos, sendo que essas vesículas possuíam vários componentes e atividades semelhantes a membrana plasmática dos reticulócitos, mas sem a detecção da enzima citosólica. Então concluiu-se que essa liberação de vesículas poderia ser um mecanismo para dividir as funções específicas da membrana (POL et al., 2012).

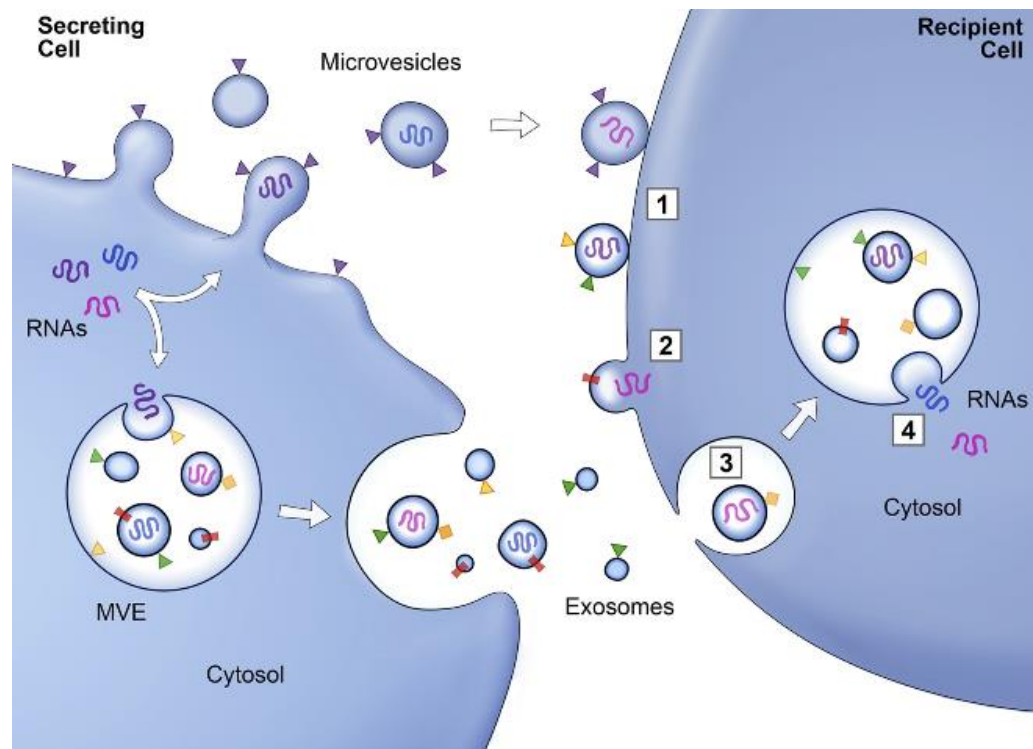
Em seguida foi descoberto que os exossomos são formados dentro de endossomos multivesiculares ou corpos multivesiculares, e são liberados quando suas membranas se fundem com a membrana plasmática. Desde então as vesículas extracelulares passaram a receber atenção para a descoberta de suas diversas funções, despertando interesse em várias áreas importantes como medicina e farmácia (POL et al., 2012).

As funções dessas vesículas são baseadas em suas origens e conteúdos, que diferem dependendo de sua classificação, podendo ser exossomos, corpos apoptóticos ou microvesículas. Elas variam em conteúdo de proteínas, lipídios e material genético - RNAm, miRNA, e outros RNA não codificantes (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

As vesículas são secretadas por algumas células no espaço intersticial, migrando até interagirem com receptores e serem absorvidas por outras células, podendo exercer o papel de sinalização celular tanto local como à distância (LEE et al., 2011). Outra função recentemente estudada é a capacidade de apresentação de antígeno pelas vesículas, que também são secretadas por células tumorais, promovendo angiogênese e proliferação de células tumorais, além disso essas vesículas liberadas também podem conter moléculas imunossupressoras que inativam os linfócitos T ou células natural killer para suprimir as respostas imunes. Nas vias respiratórias as vesículas presentes no fluido bronco-alveolar podem

aumentar a secreção de citocina pró-inflamatória em pacientes asmáticos pela ativação de células alvo. As vesículas produzidas por célula T ou sanguíneas contêm proteínas funcionais que desempenham um papel no desenvolvimento de células eritroleucêmicas pluripotentes, ativando a diferenciação dessas células. Por fim, uma das importantes funções das vesículas é a troca de RNAs não codificantes entre células (FIGURA 1), por exemplo exossomos de células T transferem miRNA de células apresentadoras de antígeno, assim a troca pode afetar a regulação pós-transcricional se houver troca fragmentos menos degradados, ou seja RNA funcional, o que confirma a capacidade que as vesículas possuem de gerar metástases, pois se ocorre a transferência de mRNA que codifica proteínas relacionadas ao ciclo celular, pode haver o desencadeamento da proliferação dessas células (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

FIGURA 1 – TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS E RNAs PELAS VESÍCULAS EXTRACELULARES



NOTA: Liberação de microvesículas e exossomos no meio intersticial carregando proteína (triângulos), proteínas transmembranas (retângulos) e RNA (símbolos em S) podendo haver a incorporação direta na célula (2), comunicação e ligação com a célula (1), endocitose (3) e fusão com uma vesícula endocítica (FONTE: RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).



### 1.1.1 Classificação de vesículas

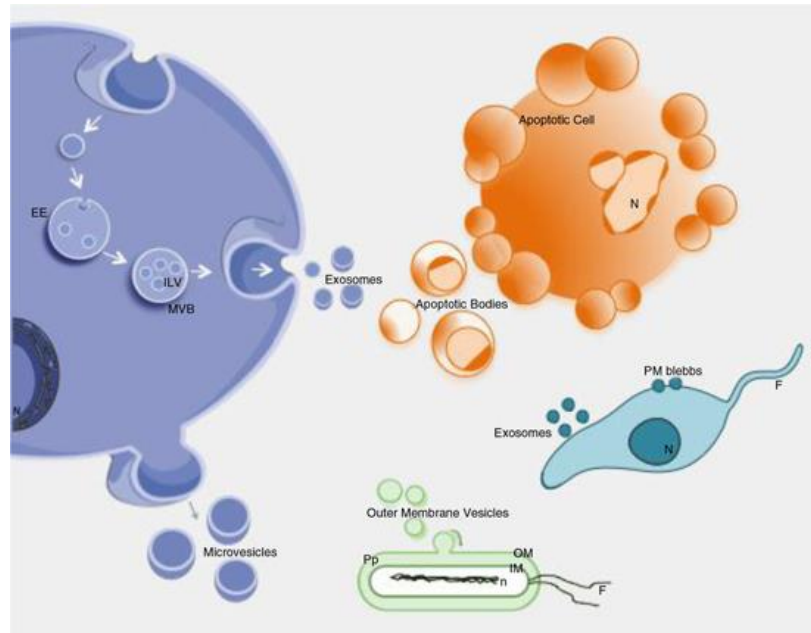
As de vesículas extracelulares diferem em tamanho, densidade, formato e conteúdo de marcadores, sendo que há três tipos de vesículas: os corpos apoptóticos são os maiores, com dimensões entre 1 e 5 micrômetros; os exossomos de 40 a 100 nanômetros e as microvesículas 100 a 1000 nanômetros (MECKES; TRAUB, 2011). Essas vesículas passaram a receber atenção como potenciais biomarcadores, o que permitiria a investigação biológica de células de regiões difíceis de serem atingidas em organismos *in vivo*, como por exemplo, tumores sólidos que crescem em órgãos e voltam a aparecer em metástases imprevisíveis. Sendo assim, a liberação de grande quantidade de vesículas poderia revelar a presença dessas metástases (COLOMBO et al., 2012).

As microvesículas contém muita variedade de proteínas e RNAs, e são liberadas pela membrana plasmática através de estímulos como o estresse celular, ativação e transformação (FIGURA 2). Apesar de ainda ser desconhecido o funcionamento completo dessas vesículas, é provável que o agrupamento delas em microdomínios da membrana plasmática gere a liberação da mesma para fora da célula, e também acredita-se que a adição de fragmentos da membrana em proteínas citoplasmáticas induz a secreção de microvesículas a partir da membrana plasmática (MECKES; TRAUB, 2011).

Os corpos apoptóticos também são envolvidas por uma membrana, mas são liberados pelas células após a morte celular e contém DNA, organelas celulares e outros diversos restos celulares (FIGURA 2). Eles podem transportar fragmentos de DNA com oncogenes e agir na imunossupressão, além de serem importantes em comunicações celulares, por serem liberados por células lisadas (MECKES; TRAUB, 2011).

Já os exossomos são as vesículas extracelulares mais estudadas, formadas por endocitose celular e formação de endossomos multivesiculares que podem ser degradados por lisossomos ou fusionados com a membrana plasmática para completar a formação dos exossomos que serão liberados para o meio extracelular (FIGURA 2), sendo os únicos secretados a partir de membranas internas (MECKES; TRAUB, 2011).

FIGURA 2 - LIBERAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES



NOTA: Representação da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática formando exossomos, liberação de corpos apoptóticos por células em apoptose, e fissão da membrana plasmática seguida de brotamento de microvesículas (FONTE: YAÑEZ et al., 2015).

Os exossomos são potenciais biomarcadores muito eficazes, pois são encontrados em urina, plasma, saliva, leite materno e fluido amniótico. A determinação biológica do destino do exossomo – degradado ou liberado para o meio extracelular – ocorre provavelmente pela produção distinta da composição do exossomo pelos endossomos multivesiculares. Um indicativo é que a maquinaria de ESCRT – complexo endossomal necessário para o transporte – envolvido na biogênese de corpos multivesiculares reconhecendo proteínas ubiquitinadas na membrana endossomal e conduzindo a uma cisão vesicular, está presente nos componentes dos exossomos, e é necessária para o transporte e formação deles para fora da célula (MECKES; TRAUB, 2011).

Estudos recentes indicam que os exossomos agem na modulação do sistema imune, promovendo a angiogênese, suprimindo diretamente a resposta citotóxica de linfócitos T e células NK e suprimindo o sistema imune via citocinas e microRNAs (SELIGER, et al). Os exossomos derivados de macrófagos infectados apresentam citocinas pró inflamatórias, aumentando a produção de EROs. Eles inibem a resposta imune expressando FasL e TNF, regulando a apoptose de células T,

também podem alterar a expressão de moléculas de células NK em resposta a IL-2 vesicular (GREENING et al., 2015).

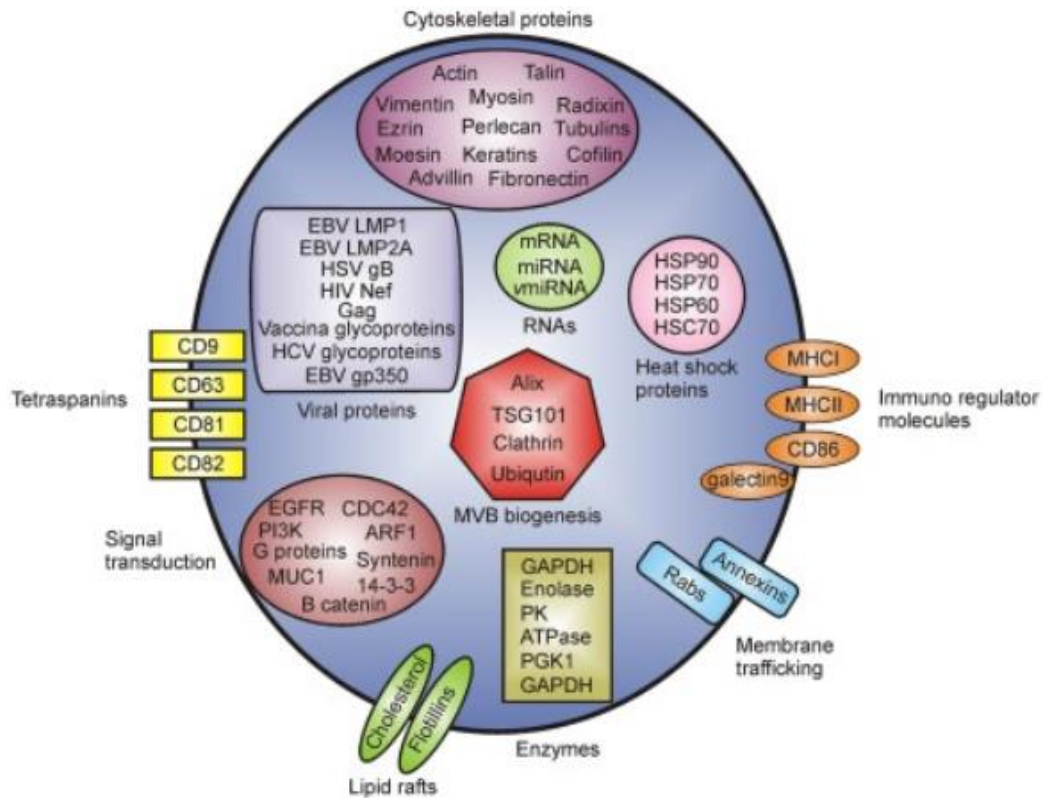
Em termos de conteúdo, os exossomos possuem grandes quantidades de miRNA, RNA não codificante e RNAm em seu interior. Apesar de grande parte estar degradada em fragmentos menores que 200 nucleotídeos, também há fragmentos maiores de RNAm, podendo ser utilizado para gerar proteínas através de tradução *in vitro*. Além disso, o conteúdo de miRNA é um possível marcador de células cancerosas por ser semelhante ao de suas células de origem (VLASSOV et al., 2012). Foram encontrados também miRNA específicos diferentes dos intracelulares, sendo capazes de silenciar alguns alvos em células receptoras (MECKES e TRAUB, 2011).

O conteúdo proteico dos exossomos também os distingue de outras vesículas, sendo que todos os exossomos possuem proteínas de transporte e membrana como GTPases, anexinas, flotilinas, tetraspaninas – CD9, CD63, CD81, CD82 –, proteínas de choque térmico como Hsc70 e Hsp90, proteínas envolvidas na biogênese como Alix e TSG101, além de fosfolipases e proteínas relacionadas com lipídios (FIGURA 3). Essas proteínas são comumente utilizadas como marcadores positivos da presença de exossomos, mas existem mais de 4400 proteínas variadas associadas a exossomos. Os marcadores mais utilizados são as tetraspaninas, Alix, TSG101 e Rab5b. Porém o pequeno tamanho dos exossomos limita a carga de substâncias transportadas, sendo cerca de 100 proteínas e 10.000 nucleotídeos, semelhante ao carregado por ribossomos eucariotos (VLASSOV et al., 2012).

## 1.2 MicroRNAS

Os miRNA são moléculas muito pequenas de RNA reguladores não codificantes – moléculas transcritas e nunca traduzidas em polipeptídeos -, presentes em simples fita com aproximadamente 22 nucleotídeos. Reprimem RNAs mensageiros (RNAm) por ligação a sua região 3' não traduzida, silenciando a expressão dos genes, o que inibe a sua tradução em proteínas. Eles desempenham muitos papéis biológicos, incluindo a sinalização celular, proliferação, diferenciação e regulação imune (KROL et al., 2010).

FIGURA 3 – COMPOSIÇÃO DOS EXOSSOMOS.



NOTA: Ilustração das proteínas específicas e RNAs presentes nos exossomos, sendo as mais presentes miRNA viral, proterinas quinases, proteínas do MHC1 e MHC2, PGK1, fosfoglicerato quinase, MUC1 e tetraspaninas (FONTE: MECKES e TRAUB, 2011).

A maioria dos genes de miRNA são transcritos pela RNA polimerase 2 a partir de promotores independentes análogos aos genes codificadores de determinadas proteínas, porém a transcrição também pode ser dependente de RNA polimerase 3 quando o miRNA está localizado a jusante de elementos repetitivos. Aproximadamente 60% dos genes humanos são regulados por miRNAs, o que indica que muitas de suas funções ainda são desconhecidas, além de que acredita-se que cada tipo celular tenha um perfil distinto de miRNA, sendo um dos complexos ribonucleoproteicos mais abundantes das células quando em associação com proteínas (KROL et al., 2010; BARTEL, 2009).

Os miRNAs podem controlar a expressão gênica dependendo do grau de complementariedade entre eles e fragmentos de RNAm, logo se o pareamento for perfeito o RNAm será clivado e se for imperfeito a tradução do RNAm será inibida. Após a clivagem os miRNAs podem reconhecer e processar novos transcritos, permitindo que um único miRNA seja capaz de controlar centenas de genes (LEWIS

et al., 2003). Eles estão envolvidos com diversos processos biológicos associados a algumas doenças, gerando interesse para novos estudos que analisem os possíveis efeitos de biomarcadores. Na doença de Parkinson, por exemplo, foi encontrado o miRNA-34b e miRNA-34c em quantidades muito diminuídas havendo decréscimo da expressão o que reflete numa grande diminuição da viabilidade celular dos neurônios dopaminérgicos (MOYANO et al., 2011). Já o miRNA-133a está altamente presente em exossomos do miocárdio de pacientes com doenças cardiovasculares, além de que esse miRNA regula uma proteína que contribui para a hipertrofia cardíaca, então tratamentos com seus inibidores reduz o grau da doença. Liu e colaboradores (2010) demonstraram que exossomos derivados de alguns tipos de tumores promovem metástases através do transporte de citocina de células supressoras mielóides. Comparado com os miRNAs presentes em células, os ribossomais são mais estáveis e resistentes à degradação, congelamento e descongelamento (REID et al., 2011).

### 1.2.1 miRNAs alvos

Muitos estudos indicam que uma regulação por miRNA é necessária para manter o bom funcionamento do sistema imune e prevenir a incidência de doenças autoimunes (BARTEL, 2004; STANCZYK et al., 2008; PAULEY et al., 2008). Tang et al. (2009) realizaram um estudo analisando a expressão de 156 microRNAs em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, uma doença em que autoanticorpos atacam inúmeros autoantígenos, e observaram que alguns miRNAs como miR-146a possuíam a expressão reduzida em 6 vezes em pacientes.

Os miRNAs participam da diferenciação inicial das células B após o contato com o antígeno, além da diferenciação em células plasmáticas, regulação das vias de indução de linhagens de células T e da indução, função e manutenção de uma linhagem de células T reguladoras. Sendo que nas células T o miRNA-17 parece ter importância para a expansão de células T CD4+ e CD8+, já que com a ausência de miR-17 ocorre perda de células T no timo e no sistema imune periférico. (LU; LISTON, 2009).

Nos órgãos linfoides periféricos os miRNAs agem na geração de diferentes linhagens de células Th, sendo que a falta de miR-155 induziu a produção de Th2. E

também em células B a ausência de miR-92 induziu o aumento de expressão de uma molécula pró-apoptótica, o que resultou em bloqueio da transição de células pró-B para pré-B . E estudos realizados com artrite reumatoide demonstraram que há superexpressão de miR-146a e miR-155 em pacientes em relação à controles (LU; LISTON, 2009).

Os miRNA-145 e miRNA-146a são umas das moléculas que mais estimularam o estudo do envolvimento de miRNAs com pênfigo foliáceo por Cipolla (2012), além há variedade de estudos indicando que esses miRNA podem atuar como reguladores na resposta imune inata, e também como supressores tumorais, o miRNA-145 por exemplo, está associado com a inibição de etapas do ciclo celular o que explica a sua relação com metástases e supressão tumoral (WANG et al., 2015).

O miRNA-145, apesar de pouco conhecido, tem sido frequentemente relatado como regulador negativo para doenças de células B e câncer de próstata. Ele está localizado no cromossomo 5q32-33, dentro de uma região de aproximadamente 4,09 kb. (FUSE et al., 2011). A subexpressão de miR-145 foi encontrada em algumas doenças autoimunes, como esclerose sistêmica, esclerose múltipla (DENG et al., 2015) e em células T de lúpus eritematoso sistêmico (LU et al., 2012).

A maioria dos vertebrados possui duas cópias do gene que codifica o miR-146, o miR-146a e o miR-146b, sendo o primeiro o alvo escolhido para a realização deste estudo, porque há evidência de que este microRNA está intensamente envolvido no controle da imunidade inata, podendo atuar como um modulador da produção de citocina pró-inflamatória em macrófagos. Isso ocorre porque o miRNA-146a regula a produção de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sendo que o receptor destas citocinas associado à cinase (importantes na sinalização de citocinas pró-inflamatórias) são os alvos moleculares para o miR-146a (LABBAYE; TESTA, 2012).

O gene codificante do miRNA-146a está localizado no cromossomo 5 em humanos, e além da sua atividade na resposta imune inata, sugere-se que também possa atuar como modulador da resposta imune adaptativa, sendo pouco expresso em células T naive (células maduras que ainda não encontraram um antígeno distinto), com sua expressão induzida após a ativação das células T, através de estímulos do receptor dessas células (LABBAYE; TESTA, 2012).

O miR-146a foi encontrado em baixa expressão quando o nível de metástase em células endoteliais da medula óssea e proliferação celular estava alta.

Um dos principais genes alvos de miR-146a, ROCK1, está envolvido com metástases de células PC3. Ele também pode ter como alvo o EGFR e seu gene, com potencial alteração funcional significativa no câncer do pulmão (WANG et al., 2015).

Muitos estudos indicam que esses miRNA selecionados possuem relações com variadas doenças, e funções definidas na regulação do sistema imune, sendo alvos vantajosos para o estudo de biomarcadores em doenças autoimunes com ênfase no pênfigo vulgar (BARTEL, 2004; DENG et al., 2015; LU et al., 2012; PAULEY et al., 2008; STANCZYK et al., 2008; WANG et al., 2015).

### 1.3 PÊNFIGO VULGAR

Pênfigo engloba um grupo de doenças autoimunes que afeta a pele e mucosas, sendo caracterizada pela produção de autoanticorpos patogênicos da classe de imunoglobulinas contra as desmogleínas presentes nos desmossomos, causando a separação da camada espinhosa da epiderme com formação de fissão intraepidermal e bolhas visíveis a olho nu (FIGURA 4). É uma doença multifatorial em que estão envolvidos fatores genéticos múltiplos e ambientais. (DIAZ et al., 1989; GROVES, 2009).

Há duas teorias que explicam a perda de adesão celular no pênfigo, a primeira propõe que os autoanticorpos inibem alostericamente a interação de Dsg1 e Dsg3 em desmossomos de queratinócitos adjacentes, induzindo perda de adesão celular. Isso ocorreria nos domínios extracelulares 1 e 2 localizados na região NH<sub>2</sub> – terminal das desmogleínas, onde ocorre a ligação do autoanticorpo patógeno (PAYNE et al., 2005).

FIGURA 4 – LESÕES DE PÊNFIGO VULGAR NA PELE E MUCOSA



FONTE: KUNIWAKE, 2014

A segunda explicação deriva de uma série de observações de vias de sinalização ativadas pelo autoanticorpo de pênfigo foliáceo e vulgar, com envolvimento de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), proteína de choque térmico 27 (Hsp27), proteínas quinases (PKA, JNK, p38 MAPK) e outras tirosina quinases, onde ocorre perda de adesão celular epidérmica (acantólise) como um resultado principal da ativação de enzimas apoptóticas intracelulares de queratinócitos após a ligação de distintos autoantígenos do pênfigo (GRANDO et al., 2009) . Estudos mais sofisticados mostraram que entre os anticorpos monoclonais isolados (mAb) de um paciente de pênfigo foliáceo o mAb patogênico específico de Dsg1 reconhece exclusivamente a forma madura de Dsg1 sem a prósequência N-terminal enquanto que os mAb não patogênicos foram capazes de ligar preferencialmente a forma precursora (YOKOUCHI et al., 2009).

A importância da via de sinalização MAPK p38 na patologia do pênfigo, principalmente o pênfigo vulgar, têm sido relatada com muita frequência na literatura. A ativação dessa via pode ocorrer pela MAP quinase-fosfatase-1 (MKP-1), gerando fosforilação e indução de um feedback negativo, reação que pode estar envolvida em doenças autoimunes. A MKP-1 está subexpressa em lesões cutâneas e acredita-se que isso contribua para a inflamação de pênfigo. Dessa maneira RNAs



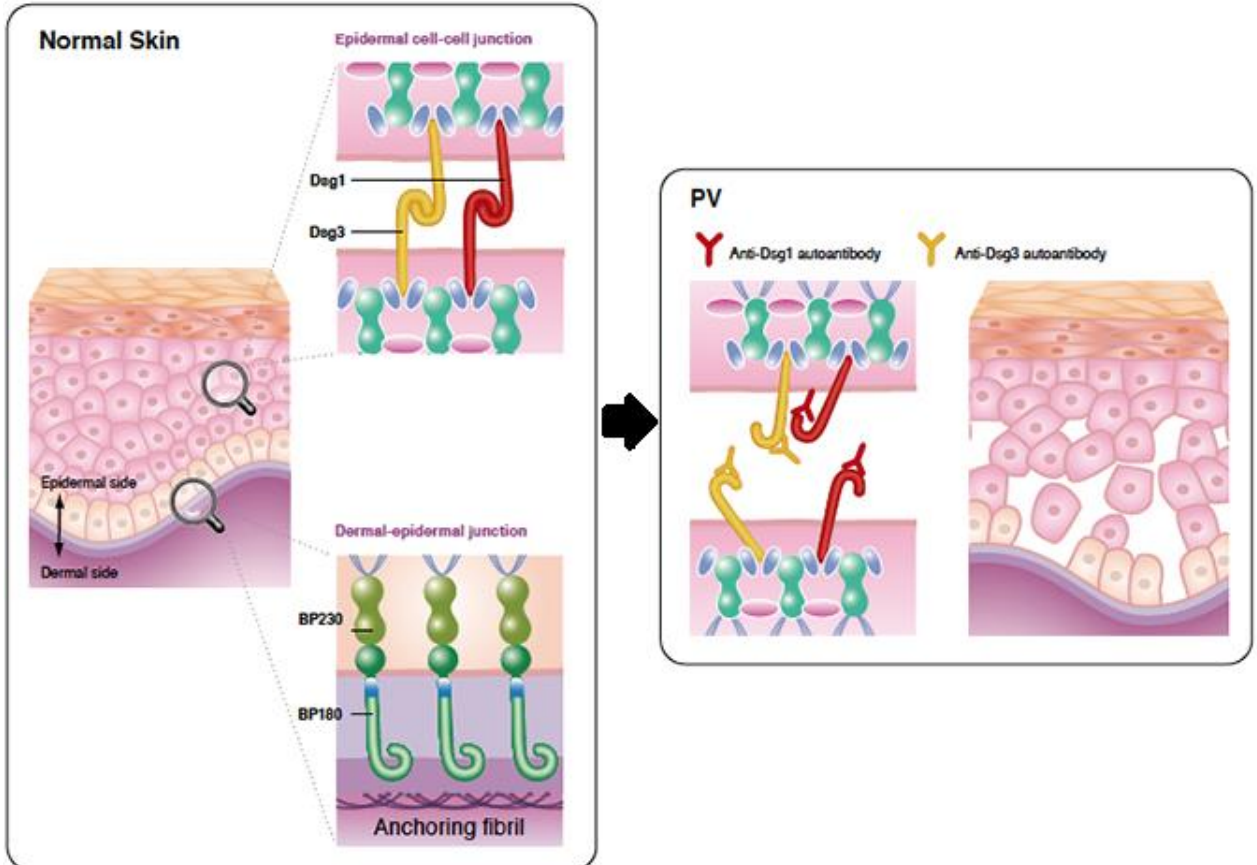
reguladores como microRNAs podem supostamente regular a MKP-1, interferindo na inflamação característica da doença de pênfigo vulgar (PV).

O pênfigo vulgar é uma enfermidade grave com incidência de aproximadamente 0,5 casos a cada cem mil habitantes por ano, sendo que os pacientes de pênfigo vulgar frequentemente desenvolvem inicialmente lesões que predominam nas mucosas, causadas pela interação de auto-anticorpos com a desmogleína 3 localizada nas camadas mais basais da epiderme, em seguida os sintomas podem evoluir, menos usualmente, para lesões tanto cutâneas quanto em mucosas causadas pela interação de auto-anticorpos com desmogleína 3 (Dsg3) e desmogleína 1 (Dsg1), localizada nas camadas mais superficiais da epiderme e mucosas (FIGURA 5) (CULTON et al., 2015). Os auto-anticorpos IgG de pacientes com essa doença ocasionam o agrupamento e endocitose da desmogleína 3 por um mecanismo dependente da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (GROVES, 2009).

A ativação de células B para a produção de autoanticorpos anti-desmogleína é dependente de células T específicas, e estudos recentes demonstraram que as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suprimem a atividade e proliferação de células T autoespecíficas, sendo observado que as células T reguladoras Tr1 induzidas por antígeno específicas para desmogleína 3 estão presentes em menor frequência em pacientes com pênfigo vulgar do que em indivíduos saudáveis, sugerindo que essas células Tr1 possam ser importantes para o desenvolvimento da doença (VELDMAN et al., 2004).

Os pacientes podem ficar com a doença ativa por meses até vários anos, sendo que o grupo étnico, sexo e idade do paciente são variáveis que influenciam o prognóstico da doença, pois alelos diferentes foram sugeridos como causadores de susceptibilidade ao pênfigo vulgar em diferentes etnias, como o *HLA-DRB1\*04* em iranianos e *HLA-DRB1\*08:04* em brasileiros. O tratamento ocorre principalmente com corticosteroides, ou ainda remoção de anticorpos patogênicos, utilização de imunoglobulina intravenosa e medicações para reduzir a dor, sendo que o tratamento mais utilizado com hormônios possui falta de especificidade e um efeito amplo que pode danificar a homeostase do paciente e até mesmo levar à morte em aproximadamente 5% dos casos (LEHMANN et al., 1983; KNEISEL e HERTL, 2011).

FIGURA 5 – ILUSTRAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE DESMOGLEINAS COM AUTOANTICORPOS GERANDO A DOENÇA DE PÊNFIGO VULGAR



NOTA: Ligações estáveis de Dsg1 e Dsg3 na epiderme de uma pessoa saudável e na epiderme de uma pessoa com PV, aonde autoanticorpos se ligam e atacam as desmogleínas interrompendo as ligações sub-dérmicas e gerando uma doença bolhosa (FONTE: adaptado de Medical & Biological Laboratories. Disponível em: < <http://www.mbl.co.jp/e/company/autoimmune.html>).

Herbst e Byrtryn (1999) realizaram um estudo sobre a incidência de remissão na doença de pênfigo vulgar à longo prazo, sendo que 5% dos pacientes foram à óbito e 75% dos pacientes só obtiveram remissão completa da doença em 10 anos. Esse estudo demonstra a necessidade de novos tratamentos com ação mais rápida e eficaz para a doença de pênfigo. O tratamento precoce está associado a rápida remissão da doença, pois pacientes com sintomas iniciais submetidos ao tratamento foram duas vezes mais propensos a chegar na inativação da doença do que pacientes com sintomas graves.

As características auto imunes da doença estão bem definidas na literatura, mas a etiologia permanece mal conhecida, sendo que frequentemente o reconhecimento da doença ocorre apenas depois do aparecimento das lesões.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

As amostras biológicas já haviam sido coletadas em 2014, através de venopunção de 40 mL de sangue periférico realizada de maneira voluntária, com preenchimento de ficha de averiguação. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000 x g durante 7 minutos para separação do soro e armazenadas em freezer de -80°C.

O conjunto de amostras é composto de 11 indivíduos controle saudáveis (CTL), 10 indivíduos com a doença do pênfigo vulgar portando lesões ativas e com tratamento (PV/T), e 3 indivíduos com a doença do pênfigo vulgar com lesões ativas e sem o início do tratamento (PV), como descrito na Tabela 1. Os pacientes foram diagnosticados com pênfigo vulgar através de dados clínicos e imunohistoquímicos.

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). Este trabalho 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.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM PÊNFIGO VULGAR E CONTROLES ENVOLVIDOS NO ESTUDO

Pacientes	Data coleta	Lesão coleta	Tratamento coleta	Idade coleta	Sexo
<b>PV/T</b>					
PV014VLT	31/10/2014	Sim	Sim	58	F
PV020DSF	25/04/2014	Sim	Sim	42	F
PV022SCL	25/07/2014	Sim	Sim	64	M
PV043EPM	25/04/2014	Sim	Sim	34	M
PV046VYS	08/05/2014	Sim	Sim	48	F
PV048CBN	30/05/2014	Sim	Sim	29	M
PV049JNI	27/06/2014	Sim	Sim	38	F
PV056SQL	09/12/2014	Sim	Sim		
PV060WQV	16/12/2014	Sim	Sim	38	F
PV061FFA	16/12/2014	Sim	Sim	41	F
<b>PV</b>					
PV041WYL	18/03/2014	Sim	<b>Não</b>	61	M
PV052FPD	26/11/2014	Sim	<b>Não</b>	43	F
PV053QAT	04/12/2014	Sim	<b>Não</b>		F
<b>Controles</b>					
472EKC	31/03/2014	Não	-	29	M
473IRR	31/03/2014	Não	-	35	F
474RHI	31/03/2014	Não	-	34	M
475ULC	31/03/2014	Não	-	59	M
476ICM	31/03/2014	Não	-	55	F
477OVU	31/03/2014	Não	-	55	M
479JOY	31/03/2014	Não	-	30	M
480LCO	12/09/2014	Não	-	23	F
423AEV	12/09/2014	Não	-	18	F
101VKC	12/09/2014	Não	-	33	F
616SFY	12/09/2014	Não	-	26	F

NOTA: PV/T: Pacientes com lesão ativa e com tratamento; PV: pacientes com lesão ativa e sem tratamento; CTL: amostras controle.

### 3.2 ISOLAMENTOS DOS EXOSSOMOS

Para o isolamento de exossomos, foi utilizado 300 uL de soro de cada amostra e o kit Total Exosome Isolation Reagent (from serum) (Life Technologies, Carlsbad, California), de acordo com o protocolo do fabricante, onde adiciona-se 60 uL do reagente Total Exosome Isolation, e incuba-se por 30 minutos na geladeira. Em seguida é centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos e descarta-se o sobrenadante, então adiciona-se 200 uL de tampão fosfato-salino 1x (PBS) e ressuspende-se. Nesse momento foi retirado uma alíquota de 5 uL para a posterior caracterização de exossomos.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE microRNA

Os miRNA foram isolados dos exossomos através da utilização do *mirVana™ microRNA Isolation kit* (Ambion, Austin, TX, USA) de acordo com o protocolo do fabricante, onde adiciona-se 300 uL de trizol (reagente contendo fenol) para realizar a lise das vesículas. Em seguida foi adicionado 360 uL de tampão de lise do kit e 0,75 uL de *miRNeasy Serum/Plasma Spike in control* do kit em concentração de 25 fmol. Foi utilizado o microRNA 39 como controle exógeno, pois não existem bons controles endógenos para vesículas extracelulares. Após misturar, foi acrescentado 36 uL do reagente *homogenate additive* e deixado por 10 minutos em gelo. Então foi adicionado 60 uL de clorofórmio e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 x g para separar a fase aquosa da orgânica, e retirou-se a fase aquosa para o descarte da fase orgânica. Em seguida iniciou-se a lavagem, com a utilização de etanol 100% e centrifugação para e de soluções de lavagem 1 e 2/3. Por fim utilizou-se a solução de eluição a 95°C para eluir o RNA desejado e permitir a estocagem de dois eppendorfs com 50 uL cada, para cada amostra (duplicata).

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DE RNA

Para verificar a quantidade e pureza da fração enriquecida de RNA foi utilizado método fluorimétrico no equipamento Quantus™ Fluorometer (Promega,

Madison, USA), que mede a densidade de moléculas por fluorescência, podendo ser calibrado para captar moléculas desoxirribonucleicas ou ribonucleicas. Um uL das amostras de RNA foram diluídas em 100 uL de QuantiFluor® Dye working solution e 99 uL de tampão TE (tris-HCl com EDTA) 20x, de acordo com o protocolo do fabricante.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DE miRNAs

A quantificação dos miR-145 e miR-146a foi realizada por PCR em tempo real utilizando-se sondas de hidrólise, onde primeiramente foi realizada a transcrição reversa dos miRNA para cDNA. Foi produzida uma mistura de reação, de acordo com o protocolo de TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) (Tabela 2).

TABELA 2 – COMPONENTES E QUANTIDADES DA MISTURA DE REAÇÃO PARA A TRANSCRIÇÃO REVERSA

	1 amostra
H <sub>2</sub> O	2,07
10x RT Buffer	0,75
100 nM dNTP	0,08
Rnase inhibitor	0,1
Reverse transcription	0,5
Primer	1,5
RNA	2,5
TOTAL	7,5

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.

Em seguida à pipetagem dos 7,5 uL, por amostra, em poços numa placa de PCR, ocorre a amplificação, permitindo que a transcriptase reversa sintetize cDNA a partir das moléculas de RNA especificadas pelos primers. Nesse processo utiliza-se uma amostra sem RNA, mas com H<sub>2</sub>O para comparação do equipamento, chamada de amostra branca.

Com o término da amplificação e obtenção de cDNA, é preparado outro mix para a amplificação do cDNA através da PCR em tempo real, mostrado na tabela 3.

TABELA 3 – COMPONENTES DA MISTURA PARA PCR EM TEMPO REALI

	1 amostra
H <sub>2</sub> O	3,8
TaqMan Universal Mix	5
TaqMan miRNA	0,5
cDNA	0,7
TOTAL	9,3

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.

As amplificações ocorreram no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ON, Canada).

Os ciclos ocorreram com uma variação de 95°C por 15 segundos para que ocorra a desnaturação da dupla fita de cDNA quebrando as pontes de hidrogênio. Em seguida a temperatura diminui para 60°C por 1 minuto para que ocorra a hibridação dos primers na fita molde, ocorrendo 45 vezes esse ciclo.

Também foi realizada uma PCR em tempo real com a utilização de primer para o controle exógeno cel-miR-39, logo uma placa com todas as amostras foi realizada com a utilização deste miR-39 para posterior comparação.

### 3.6 ANÁLISE DOS DADOS

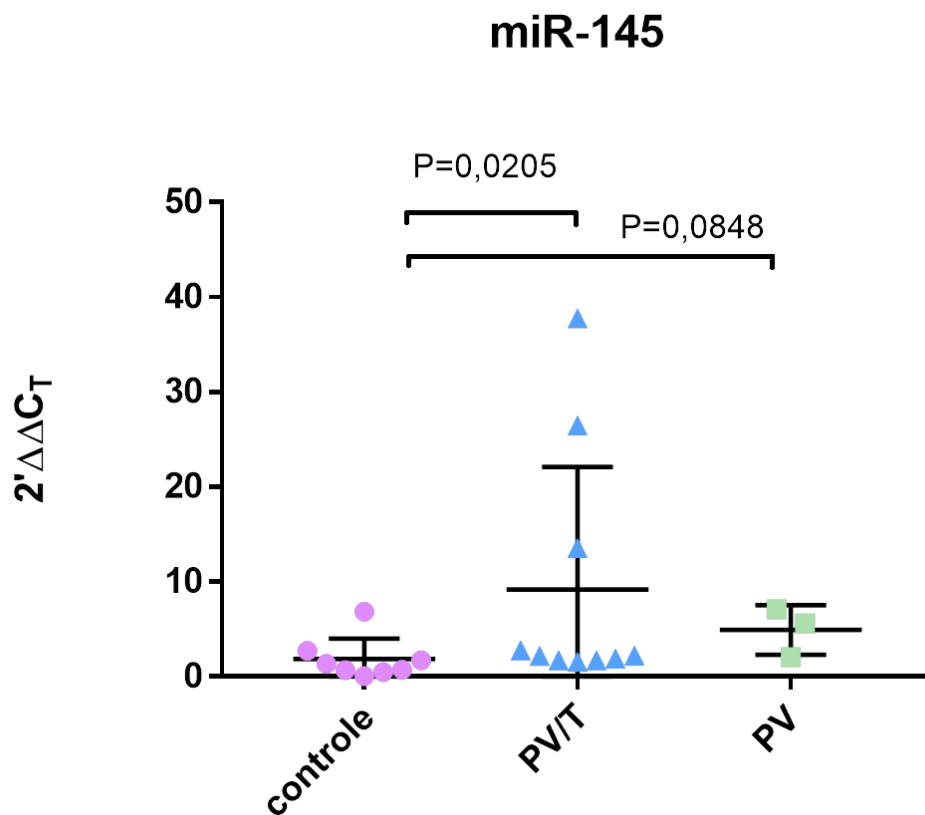
Para a quantificação dos miRNAs alvo se foram utilizados o C<sub>q</sub> médio e o método do 2'<sup>ΔΔ</sup>Ct. Como controle técnico foi utilizado o miRNA exógeno cel-miR-39. Os dados de C<sub>T</sub> foram utilizados para o cálculo dos valores de 2'<sup>ΔΔ</sup>Ct para cada amostra dos microRNAs alvos, utilizando os valores C<sub>T</sub> de todas as amostras amplificadas com cel-miR-39 como referência. A significância estatística das diferenças de quantificação foram calculadas usando o teste não paramétrico de Mann Whitney. O limite de significância adotado foi de P ≤ 0,05. As análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4.03* (San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise estatística

As quantidades relativas de miR-145 foram comparadas entre os controles e os grupos de pacientes com e sem tratamento (Gráfico 1). Quando comparados pacientes com tratamento e controles houve diferença estatística significativa ( $P=0,0205$ ), estando miR-145 em maior quantidade em exossomos de pacientes. Já quando comparados os controles com pacientes sem tratamento foi observada uma tendência de diferença quantitativa ( $P=0,0848$ ). Entretanto, esse resultado tem que ser interpretado com cautela em função do baixo número amostral para indivíduos sem tratamento ( $n=3$ ).

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE miR-145 EM CONTROLES, PACIENTES COM TRATAMENTO E PACIENTES SEM TRATAMENTO

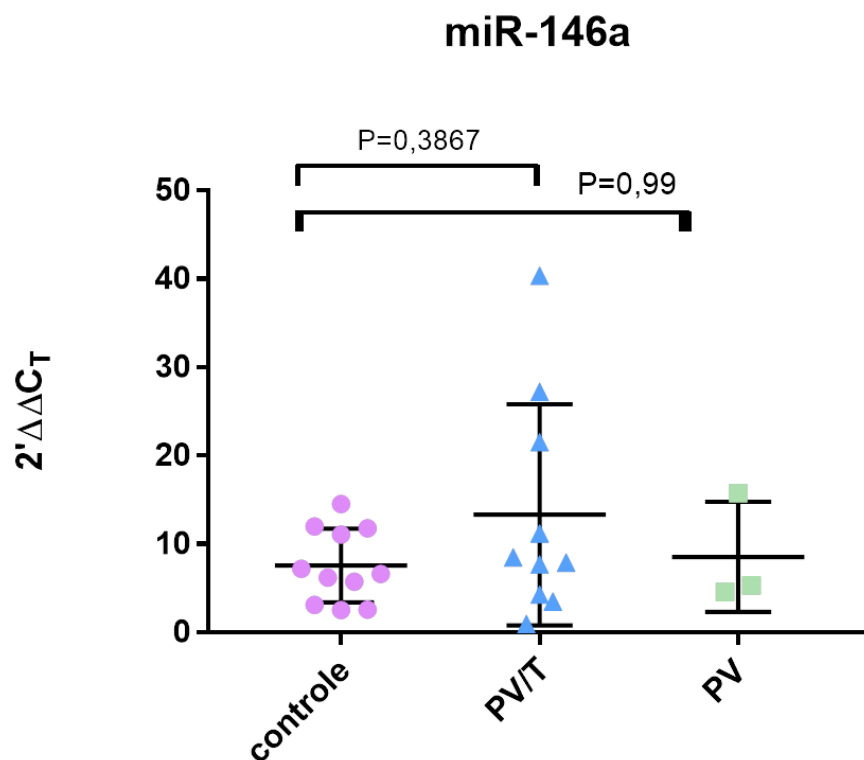


NOTA: Distribuições das quantidades relativas de miR-145 em controles saudáveis (círculos), pacientes com pênfigo vulgar sem tratamento (quadrados) e pacientes com tratamento (triângulos). Barras horizontais representam a média e desvio padrão.



As mesmas análises foram feitas para o alvo miR-146a, comparando controles com todos os pacientes, sendo que as diferenças encontradas mostraram-se estatisticamente não significantes. Para as comparações entre pacientes sem tratamento e controles o valor de P foi igual a 0,99, já a comparação de pacientes com tratamento e controle o P foi de 0,3867.

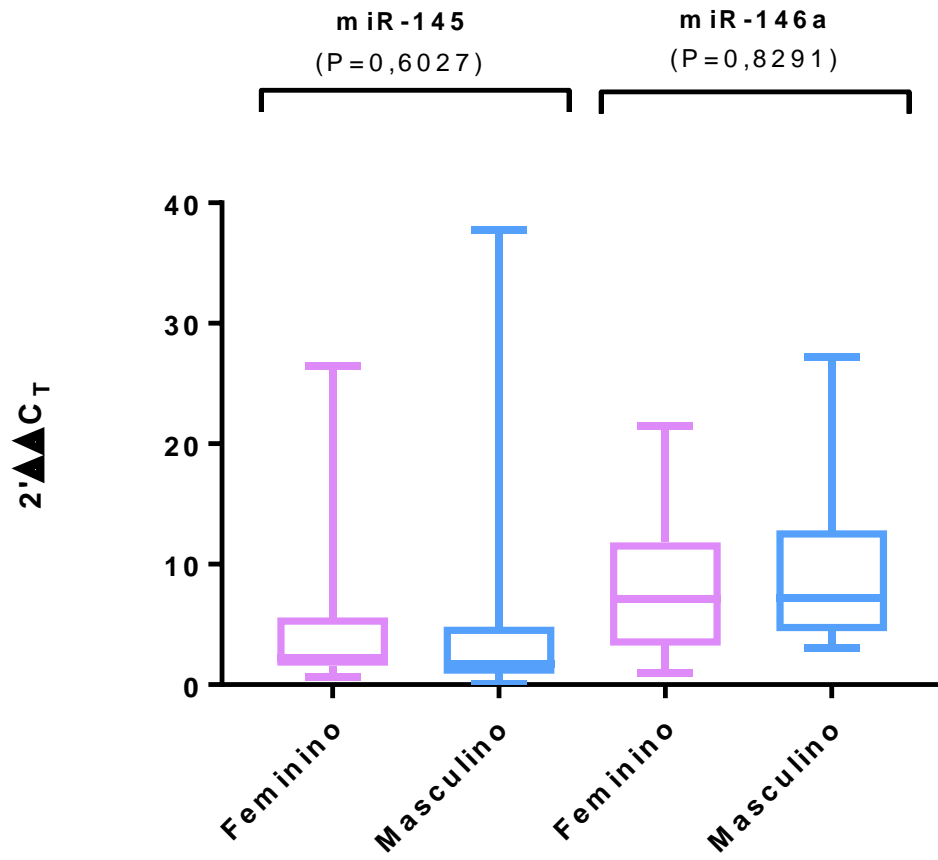
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE miR-146a EM CONTROLES, PACIENTES COM TRATAMENTO E PACIENTES SEM TRATAMENTO



NOTA: Distribuições das quantidades relativas de miR-146a em controles (círculos), pacientes com pênfigo vulgar sem tratamento (quadrados) e pacientes com pênfigo vulgar com tratamento (triângulos). Barras horizontais representam a média e desvio padrão.

Também foram comparadas as diferenças de expressão entre indivíduos dos sexos feminino e masculino (Gráfico 3). Em nenhum desses testes houve uma diferença significativa, o que mostra que os níveis desses microRNAs não variam de acordo com o sexo dos indivíduos.

GRÁFICO 3 – CONCENTRAÇÕES DE miR-145 E miR-146a EM TODAS AS AMOSTRAS DO SEXO FEMININO E MASCULINO



NOTA: Distribuições das concentrações de miR-145 e miR-146a em todas as amostras do sexo feminino representada na cor rosada, e todas as amostras do sexo masculino em azul, sendo que a maioria das amostras está representada dentro das caixas e o desvio padrão nos traços verticais.

## 5 DISCUSSÃO

Os exossomos são vesículas secretadas por grandes variedades de células, sendo capazes de promover e regular a resposta imune, além de provavelmente possuir funções desconhecidas. A existência dessas vesículas aumentou consideravelmente o interesse em potenciais biomarcadores para descoberta e tratamento precoce de doenças, apesar de ainda não ser conhecido o tipo de doença que essas vesículas são capazes de sinalizar. Desta maneira, as doenças mais relacionadas, como as envolvidas com o sistema imune são as de maior interesse atual.

Por esse motivo esse trabalho foi realizado com a doença pênfigo vulgar, uma doença autoimune na qual os autoanticorpos reconhecem e atacam as proteínas desmogleínas da pele. A descoberta precoce de doenças como a de pênfigo, podem evitar o nível avançado da doença, além de fornecer um tratamento mais rápido e eficiente.

Considerando essas informações, e o resultado obtido pelo trabalho de Cipolla (2012), foram escolhidos os miR-145 e miR-146a como alvos para esse trabalho. A comparação de miR-145 com pacientes e controles revelou diferença significativa, demonstrando que o nível de microRNA em exossomos é significativamente distinto em pessoas saudáveis e pessoas com uma doença autoimune como a do pênfigo em tratamento. A base dos tratamentos nos pênfigos, é a corticoterapia. É possível, portanto, que o efeito de tal tratamento seja um empacotamento preferencial de determinados tipos de miRNAs, como o mir-145, em vesículas extracelulares. O significado disso ainda precisaria ser melhor explorado.

O teste feito entre pacientes com tratamento (PV/T) e controles (CTL) com resultado significativo para miR-145, diferente dos pacientes sem tratamento (PV) e controle (CTL), demonstra que há alteração entre doentes e saudáveis, além de que o alto número de amostras de PV/T diminui a influência de amostras individuais, logo diminui a margem de erro, o que pode ter ocorrido em PV. Alguns indivíduos de PV/T se destacaram acima da média, podendo haver feridas mais intensas no momento da coleta.

Não houve diferenças estatisticamente significativas quando comparados os níveis de miR-146a entre pacientes e controles. Há duas possibilidades para explicar esse resultado, primeiramente porque os níveis desse microRNA podem não ser

alterados na doença de pênfigo vulgar, apesar de ser um microRNA muito ligado à regulação do sistema imune, ou pode ter ocorrido erro na metodologia, considerando o baixo campo amostral é o que pode influenciar no resultado deste microRNA.

Em relação ao sexo dos indivíduos, os resultados foram como o esperado, indicando que não houve influencia desse fator no resultado das análises, com os valores de microRNA semelhantes nos sexos feminino e masculino para cada alvo.

Esses resultados mostram que há alterações de miR-145 entre pacientes e indivíduos saudáveis, sugerindo que esse microRNA possa ser um bom candidato a biomarcador para a doença do pênfigo vulgar. Além disso, há microRNAs inexplorados para utilização como biomarcadores, logo novas doenças autoimunes devem ser exploradas em níveis de microRNAs obtidos por exossomos para permitir diagnósticos precoces e tratamento adiantado.

## Referências

- BALA, S. et al. Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Scientific Reports*, Budapest, v. 10721, 29 mar. 2015.
- BARTEL, D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. V. 116, p. 281–97, 2004.
- BARTEL, D. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. v. 136, p.215-233, 2009.
- BORGER, V. et al. Comparison of isolation methods for EVs from fresh and frozen serum and plasma samples. University Hospital Essen Transfusion Medicine, Essen, 2016.
- CAMARGO, C. M.; AUGUSTO, D. G.; PETZL-ERLER, M. L. Differential gene expression levels might explain association of *LAIR2* polymorphisms with pemphigus. *Human Genetics*, Curitiba, v. 135, p. 233-244, 31 dec. 2015.
- 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.
- COLOMBO, E. et al. Microvesicles: novel biomarkers for neurological disorders. *Frontiers in Physiology*, Milão, 29 mar. 2012.
- CULTON, D. A. et al. Mucosal pemphigus vulgaris anti-dsg3 IgG is pathogenic to the oral mucosa of humanized dsg3 mice. *Journal of Investigative Dermatology*, North Carolina, v. 10, p. 1038, 26 mar. 2015.
- DENG, X. et al. The Role of MicroRNAs in Autoimmune Diseases with Skin Involvement. *Scand J Immunol*, v. 81, n. 3, p. 153-165, 2015.
- DENZER, K. et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, Utrecht, p. 3365, 13 set. 2000.
- DIAZ, L. A., et al. Endemic pemphigus foliaceus: 2. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol*, 1989, v. 92, p. 4-12.
- FUSE, M. et al. Restoration of *miR-145* expression suppress cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting *FSCN1*. *International Journal of Oncology*, Kagoshima, v. 10, 2011.
- GRANDO, S. A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity*, v. 45, p. 7-35. 2011
- GREENING, D. W. et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 40, p. 72-81, Victoria, 2015.

GROVES, R.W. Pemphigus: a brief review. *Clin Med*, 2009, v. 9, 371-5

HANEKLAUS, M. et al. miR-223: Infection, inflammation and cancer. *Journal of Internal Medicine*, Dublin, v. 274, p. 215-226. 2013.

HERBST, A. BYSTRYN, J. C. Patterns of remission in pemphigus vulgaris. *American Academy of Dermatology*, p. 122-127, New York. 1999.

JOHNSTONE, R. M. et al. Turbide, Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes), *J. Biol. Chem.* p. 262. 1987.

KASINSKI, A. L.; SLACK, F. J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Rev. Cancer*, v. 11, p. 849-864. 2011. KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Ver. Gene*, v. 11, p. 597-610. 2010.

KNEISEL, A.; HERTL, M. Autoimmune bullous skin diseases part 2: diagnosis and therapy. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* v. 9, p. 927-947. 2011

KUNIWAKE, S. M. Caracterização de microRNAs circulantes nas doenças autoimunes pênfigo foliáceo endêmico e pênfigo vulgar. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

LABBAYE, C.; TESTA, U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, Rome, v. 299, p. 5-13, 2012.

LEE, T. et al. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging Science of cellular ‘debris’. *Springer*, Montreal, p. 1-13, 13 jan. 2011.

LEHMANN, P.; ZHENG, P.; LAVKER, R. M.; KLIGMAN, A. M. Corticosteroid atrophy in human skin. A study by light, scanning, and transmission electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* v. 81, p. 169-176. 1983

LEWIS, B. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, v.115, p. 787, 2003.

LIU, Y. et al. Contribution of MyD88 to the tumorexosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells. *Am. J. Pathol.* v.176, p. 2490-2499. 2010.

LU, L. F.; LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. *Immunology*, v.127, p. 291, 2009.

LU, M. et al. 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.

MECKES, D. G; TRAUB, N. R. Microvesicles and viral infection. *Journal of Virology*, Chapel Hill, v. 85, no. 24, p. 12844-12854, dec. 2011.

MOYANO, M. E. et al. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum. Mol. Genet*, v. 20, p. 3067–3078. 2011.

PAULEY, K. et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, v. 10, p.101, 2008.

PAYNE, A. S. et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. *J. Clin. Invest.* v. 115, p. 888-899. 2005

POL, E. et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews*, Amsterdam, v. 64, p. 676-705, 2012.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles and friends. *The Journal of Cell Biology*, Paris, p. 373, 18 fev. 2013.

REID, G.; KIRSCHNER, M. B.; VAN, Z. N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* v. 80, p. 193–208. 2011.

STANCZYK, J. et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* v. 58, p. 1001-1009, 2008.

SELIGER, B.; RITZ, U.; FERRONE, S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer.* v. 118, p. 129-38, 2006.

TANG, Y. et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type 1 interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*, v. 60, p. 1065, 2009.

VLASSOV, A. et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *BBA General Subjects*, Austin, p. 941, 1 abr. 2012.

VELDMAN, C. et al. Type 1 regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol*, v. 172, p. 6468, 2004.

YAÑEZ-MÓ et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, Porto, v. 4, p. 27066, 14 may. 2015.

YOKOUCHI, M. et al. Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by

proteolytic processing of prosequence. *J. Invest. Dermatol.* v. 129, p. 2156-2166. 2009.

WANG, R. J. et al. Serum miR-125a-5p, miR-145 and miR-146a as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Journal Clinics Pathology*, v.8, p.765-771, jan. 2015.

ZHANG, J. et al. microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb. *International Journal of Oncology*, v. 40, p.747-756, oct. 2011.