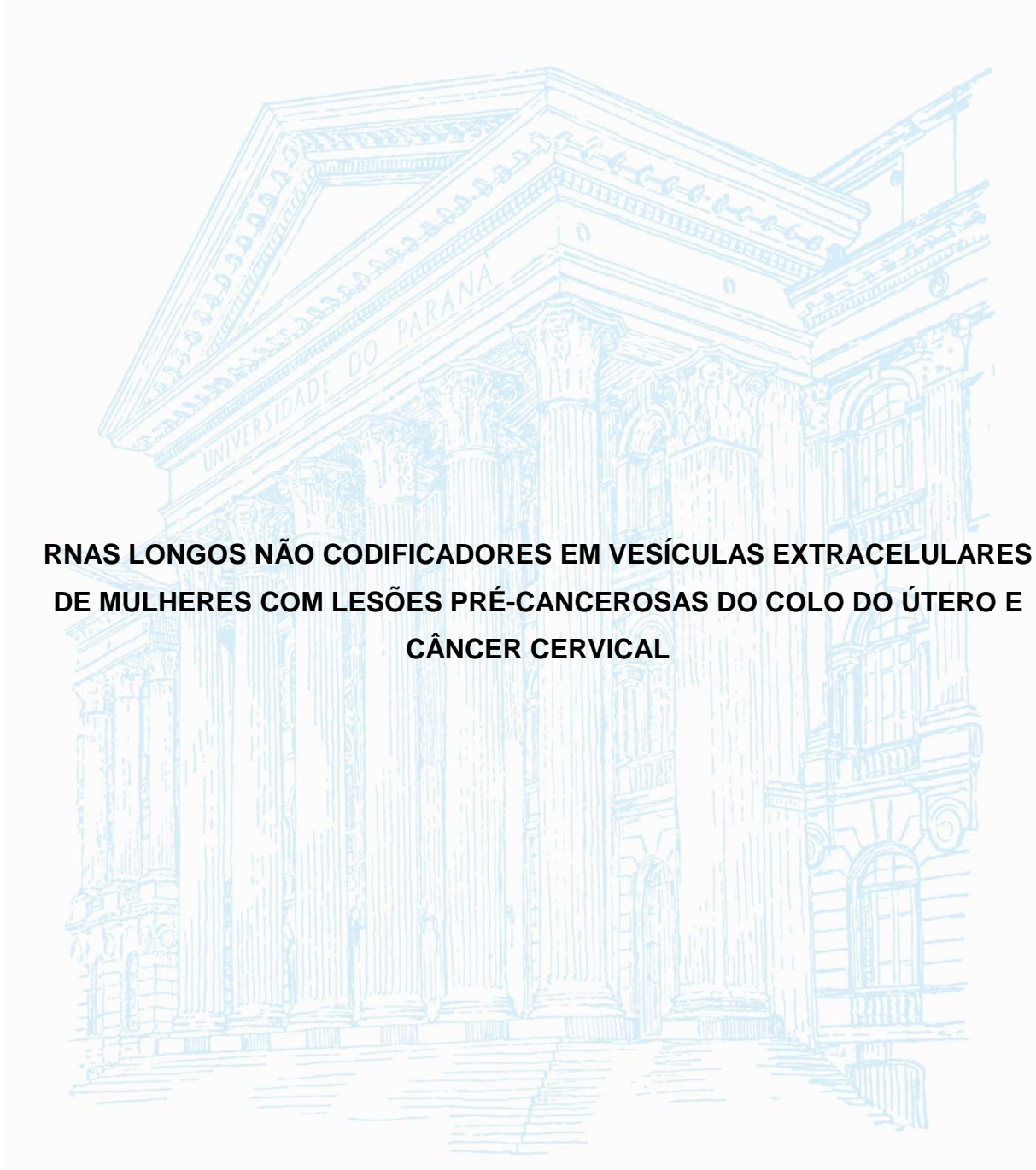


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELEN CRISTINA BECKERT



**RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES EM VESÍCULAS EXTRACELULARES
DE MULHERES COM LESÕES PRÉ-CANCEROSAS DO COLO DO ÚTERO E
CÂNCER CERVICAL**

CURITIBA

2019

HELEN CRISTINA BECKERT

**RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES EM VESÍCULAS EXTRACELULARES
DE MULHERES COM LESÕES PRÉ-CANCEROSAS DO COLO DO ÚTERO E
CÂNCER CERVICAL**

Monografia apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel, Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Danielle Malheiros Ferreira

Coorientadora: Msc. Fernanda Costa Brandão Berti

CURITIBA

2019

RESUMO

A infecção persistente pelo HPV na região da endocérnix pode progredir para lesões intraepiteliais escamosas (LIE) consideradas pré-malignas, que podem ser subdivididas em lesões de baixo grau (LIEBG) e lesões de alto grau (LIEAG). Deve-se considerar que o diagnóstico precoce das lesões pode evitar o progresso da mesma para o estágio de câncer cervical. Neste contexto, sabe-se que vesículas extracelulares (VEs) isoladas de vários fluidos biológicos podem carrear em seu interior RNAs não codificantes, como por exemplo, microRNAs e lncRNAs, capazes de alterar o fenótipo de células receptoras, e, portanto, disseminar o fenótipo pré-cancerígeno ou cancerígeno e modular o microambiente pré-tumoral. Os lncRNAs HOTAIR e PVT1 já foram previamente associados por expressão diferencial à progressão do câncer cervical. Portanto, o objetivo deste trabalho, foi quantificar e verificar se há diferenças de expressão de HOTAIR e PVT1 extraídos de VEs circulantes em plasma sanguíneo de 10 mulheres com LIEBG, 11 mulheres com LIEAG, três mulheres com câncer cervical e de nove mulheres saudáveis. As VEs foram isoladas por precipitação com kit comercial e caracterizadas por rastreamento de nanopartículas (NTA), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e *Western Blotting* (WB). Foi estabelecido um protocolo de isolamento de RNA total das vesículas que permite separação por tamanho (microRNAs e lncRNAs). A quantificação dos lncRNAs foi feita por RT-PCR em tempo real. Não houve diferença estatisticamente significativa de tamanho ($p=0,6286$) e de concentração ($p=0,6286$) entre vesículas isoladas de plasma de controles e de pacientes com diferentes com lesões. Em fotomicrografias de MET, foi possível a visualização de vesículas majoritariamente de tamanho entre 100 e 200 nm. Através da técnica de WB, foi possível a detecção de proteínas características de vesículas nas partículas isoladas, tais como CD9 e CD63. Não houve diferença estatisticamente significativa de expressão do HOTAIR entre pacientes com algum tipo de lesão e controles ($p=0,1348$); em pacientes com câncer cervical em relação a controles ($p=0,6667$), bem como em todas as demais comparações realizadas. O lncRNA PVT1 somente foi detectado em vesículas isoladas de plasma de uma paciente com câncer cervical. Os resultados até o momento corroboram estudos anteriores, os quais demonstram que ambos os transcritos, HOTAIR e PVT1, podem ser mais relevantes localmente na progressão tumoral cervical e que o último atua em nível sistêmico majoritariamente livre no sangue.

Palavras-chave: Lesão intraepitelial escamosa. Vesículas extracelulares. RNA longo não codificador.

ABSTRACT

Persistent HPV infection in the endocervix region may progress to squamous intraepithelial lesions (LIE) considered pre-malignant, which may be subdivided into low-grade lesions (LIEBG) and high-grade lesions (LIEAG). It should be considered that early diagnosis of lesions may prevent its progress towards cervical cancer. In this context, it is known that extracellular vesicles (EVs) isolated from various biological fluids can carry non-coding RNAs, such as microRNAs and lncRNAs, capable of altering the phenotype of acceptor cells, spreading the precancerous or carcinogenic phenotype, or modulating the pre-tumor microenvironment. LncRNAs HOTAIR and PVT1 have been previously associated by differential expression with cervical cancer progression. Therefore, the aim of this study was to quantify and verify if there are differences in expression of HOTAIR and PVT1 extracted from circulating EVs in blood plasma from 10 women with LIEBG, 11 women with LIEAG, 3 women with cervical cancer and 9 healthy women. The EVs were isolated by precipitation with a commercial kit and characterized by nanoparticle tracking (NTA), transmission electron microscopy (TEM) and Western Blotting (WB). A protocol for total RNA isolation from vesicles has been established that allows size separation (microRNAs and lncRNAs). LncRNAs were quantified by real-time RT-PCR. There was no statistically significant difference in size ($p = 0.6286$) and concentration ($p = 0.6286$) between isolated plasma vesicles of controls and patients with different lesions. In photomicrographs of TEM, it was possible to visualize mostly vesicles with size between 100 and 200 nm. Through the WB technique, it was possible to detect characteristic proteins of vesicles in isolated vesicle particles, such as CD9 and CD63. There was no statistically significant difference in HOTAIR expression between patients with some type of lesion and controls ($p = 0.1348$); in cervical cancer patients in relation to controls ($p = 0.6667$), as well as in all other comparisons. LncRNA PVT1 was only detected in vesicles isolated from plasma from a cervical cancer patient. The results to date corroborate with previous studies, which show that both HOTAIR and PVT1 may be more locally relevant in cervical tumor progression and the latter transcript to act mostly free in the blood, at systemic level.

Key-words: Squamous intraepithelial lesion. Extracellular vesicles. Long Non-coding RNA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – RESUMO DE FUNÇÕES DOS LNCRNAS.....	14
FIGURA 2 – VIA ENDOSSOMAL DE EXOSSOMOS.....	19
FIGURA 3 – PROGRESSÃO DAS LESÕES DA ENDOCÉRVIX.	23
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS EM AMOSTRAS DE CONTROLES (1), PACIENTES COM LIEBG (2) E PACIENTES COM LIEAG (3).....	29
FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE VESÍCULAS.	30
FIGURA 6 – FILME DE REVELAÇÃO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	31
FIGURA 7 – EFICIÊNCIA E ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS.....	32
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO HOTAIR.	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PERFIL CLÍNICO DAS PACIENTES.....	25
TABELA 2 - ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR	- Ancestralidade predominantemente africana
CC	- Câncer Cervical
cDNA	- DNA complementar
eRNA	- RNA com função de <i>enhancer</i>
EUR	- Ancestralidade predominantemente europeia
HPV	- Papilomavírus humano
lncRNA	- RNA longo não codificador
LIEBG	- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LIEAG	- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
microRNA	- Pequeno RNA não codificador
MIS	- Ancestralidade autodeclarada parda
MKL1	- Cofator transcricional <i>Megakaryoblastic leukemia</i>
mRNA	- RNA mensageiro
NIC 1	- Neoplasia intraepitelial cervical grau 1
NIC 2	- Neoplasia intraepitelial cervical grau 2
NIC 3	- Neoplasia intraepitelial cervical grau 3
NTA	- <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
ORF	- <i>Open Reading Frame</i> (região abertura de leitura)
PL	- Plasma depletado de vesículas
qPCR	- PCR quantitativa em tempo real
RT-PCR	- Reação de Transcrição Reversa seguida de PCR
VE	- Vesícula Extracelular
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
WB	- <i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES: ORIGEM, ESTRUTURA E FUNÇÃO	11
2.2	RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES NO CÂNCER CERVICAL	15
2.3	VESÍCULAS EXTRACELULARES	17
2.4	VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)	20
2.5	LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E CÂNCER CERVICAL	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4	RESULTADOS	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	29
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS ALVOS POR PCR EM TEMPO REAL	32
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO 1- ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA	49
	ANEXO 2- EXTRAÇÃO DE RNA VESICULAR	50
	ANEXO 3- PREPARAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	51
	ANEXO 4- PREPARAÇÃO PARA WESTERN BLOOT	52

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o local da infecção primária, os vírus do tipo papiloma humano (HPVs, do inglês *Human Papillomavirus*) podem ser classificados em cutâneos e genitais. A transmissão de ambas as formas pode se dar por contato direto ou por transmissão perinatal (NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L.; 2014). Segundo o potencial carcinogênico, os HPVs podem ser classificados como de alto, indeterminado e de baixo risco (BARROW-LAING, L.; CHEN, W.; ROMAN, A., 2010; ZHANG, B.; CHEN, W.; ROMAN, A., 2006) sendo que os primeiros estão mais diretamente envolvidos com desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e cânceres (GOTTSCHLING, M. et al., 2011).

A progressão da infecção pelo HPV na endocérnix até o estabelecimento de lesões pré-cancerosas e posteriormente de carcinoma *in situ* pode ser subdividida em quatro estágios. Primeiramente, ocorre infecção do epitélio na zona de transformação cervical, local onde eventualmente a replicação dos genomas celulares e virais passa a ser sincronizada, ou seja, a infecção se torna persistente (HERFS, M. et al.; 2012; JACOBSON, D.L. et al., 1999; MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A., 2010). Posteriormente, há transformação do epitélio em lesão pré-cancerosa. De acordo com a classificação citopatológica (Bethesda) mais aceita atualmente, as lesões podem ser subdividas como de alto grau (também denominadas de LIEAG) ou de baixo grau (conhecidas como LIEBG) (DAVEY, D.D. et al., 2004). As lesões de baixo grau podem ser geralmente associadas histologicamente a neoplasias intraepiteliais do tipo 1 (NIC 1), e as lesões de alto grau podem ser geralmente associadas a neoplasias do tipo 2 (NIC 2) e do tipo 3 (NIC 3) (SCHIFFMAN, M. et al., 2007; RICHART, R. M., 1972; COX, J.T. et al., 2003). Pesquisas recentes demonstram que inclusive em países considerados desenvolvidos, está ocorrendo aumento da incidência de lesões, principalmente de alto grau (ORUMAA, M. et al., 2019). O câncer cervical é o mais comum entre as mulheres no mundo, com cerca de 500.000 novos casos em média todos os anos (WHO, Cervical Cancer, 2018). O diagnóstico precoce de lesões pré-cancerosas poderia evitar a progressão das mesmas e consequentemente o desenvolvimento de carcinomas cervicais. Nesse sentido, as vesículas extracelulares, e especialmente seus conteúdos, têm sido apontadas como promissores biomarcadores em diversos tipos de cânceres (WANG, M. et al., 2019) e poderiam ser utilizadas como bioindicadoras de lesões pré-cancerosas.

O termo “vesículas extracelulares” (VEs) se refere a partículas vesiculares delimitadas por bicamada lipídica, naturalmente secretadas por células, capazes de carrear em seu interior proteínas, lipídios, açúcares, moléculas de RNA e DNA e de refletir o microambiente em que as células de origem estão. Também possuem o potencial de alterar o perfil de expressão de células receptoras (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017). Podem ser classificadas considerando-se vários critérios, dentre eles o tamanho, sendo as VEs consideradas como

pequenas VEs (< 100nm ou < 200nm) ou médias/grandes VEs (> 200nm) e conforme as condições ou células de origem (como corpos apoptóticos, oncosomas, VEs liberadas sob condição de hipóxia, por exemplo) (THÉRY, C. et al., 2018). As vesículas podem ser encontradas em vários tipos de fluidos biológicos, como sangue e fluido cervicovaginal (ZHANG, J. et al., 2016). No caso do câncer cervical, já foram realizados estudos considerando o potencial de moléculas carregadas por vesículas extracelulares como biomarcadores da doença (LIU, J. et al., 2014; ZHANG, J. et al., 2016).

Os lncRNAs ou RNAs longos não codificantes, são moléculas de RNA com tamanho médio superior a 200 nucleotídeos e podem atuar regulando a expressão gênica em diferentes níveis. Por exemplo, podem interferir na transcrição, no processamento do transcrito, atuar como esponjas, sequestrando outros transcritos a fim de que os mesmos não estejam disponíveis para atuar em seus alvos, entre outros mecanismos (MAASS, P.G. et al., 2014; GEISLER, S.; COLLIER, J., 2013). Inúmeros lncRNAs já foram associados com a progressão tumoral na região da endocérnix, tais como os lncRNAs HOTAIR, H19 e PVT1, sendo que este último já foi detectado como marcador sorológico da progressão de lesões pré-cancerosas (LIU, M. et al., 2018; FEIGENBERG, T. et al., 2013; YANG, J. P. et al., 2016).

Portanto, a hipótese deste trabalho é que RNAs longos não codificadores previamente associados ao câncer cervical podem ser empacotados em vesículas extracelulares, que poderiam circular em plasma de pacientes tanto com lesões pré-cancerosas ou já diagnosticadas com câncer cervical, refletindo o conteúdo das células da endocérnix.

Considerando este contexto, o objetivo geral deste trabalho foi verificar se há diferença entre mulheres com diferentes tipos de lesões pré-cancerosas ou câncer cervical e mulheres saudáveis quanto aos níveis de expressão de lncRNAs previamente associados ao câncer cervical tais como HOTAIR e PVT1, através do isolamento de vesículas extracelulares no plasma sanguíneo e da quantificação da expressão dos transcritos isolados a partir destas vesículas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RNAS LONGOS NÃO CODIFICADORES: ORIGEM, ESTRUTURA E FUNÇÃO

Vários mecanismos foram propostos a fim de explicar a origem de sequências de RNA longas não codificadoras, dentre estes, duplicações de sequências gênicas do DNA ou do RNA, perda da capacidade codificadora de regiões previamente codificadoras de proteínas, a evolução local de elementos transponíveis e a evolução de regiões gênicas previamente não codificadoras, com a aquisição ao longo do tempo de elementos reguladores (MARQUES, A. C.; PONTING, C.P., 2014). Os RNAs longos não codificadores podem ser classificados em diversas categorias: conforme o tamanho (RNAs longos, RNAs grandes, RNAs muito longos, macro lncRNAs), conforme proximidade com genes codificadores de proteínas (longos intergênicos ncRNA, grandes intergênicos ncRNA, transcritos naturais antisense, lncRNAs antisense, lncRNAs bidirecionais, RNAs totalmente intrônicos, RNAs intrônicos circulares, dentre outras classificações internas), conforme relações com elementos reguladores (pseudogenes, telômeros, centrômeros, transcritos de regiões ultraconservadas, enhancer lncRNA, RNAs associados a 3'UTR), conforme a biogênese, conforme a localização subcelular de origem (lncRNAs nucleares, mitocondriais, dentre outras subclassificações), conforme a função (lncRNA scaffold, lncRNA guia, ribo-ativador, ribo-repressor, RNA competidor endógeno, lncRNAs precursores) e conforme associação com fenômenos biológicos específicos (induzidos por hipóxia, associados a senescência, induzidos por estresse, dentre outras subclassificações) (JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M.; 2017).

Os RNAs antisense, ou transcritos antisense naturais, são geralmente originados de sequências gênicas que são transcritas em ambas as direções podendo formar pares de senso-antisense, assim tendo identidade parcial de sequência com o *locus* que atuam (JOHNSSON, P., et al., 2014). De maneira geral, transcritos antisense podem causar efeitos inibitórios ao bloquear estruturas presentes nos mRNAs necessárias para ancoragem no ribossomo, encobrir segmentos de RNA principalmente sequencias regulatórias, competir por fatores de transcrição e pela montagem do complexo de RNA Pol II, interferir na edição de mRNAs através da ação conjunta com enzimas ADARs (WIGHT, M.; WERNER, A., 2013; HUNDLEY, H. A.; BASS, B. L., 2010) ou efeitos estimulatórios ao subjugar efeitos criados por estruturas inibitórias presentes nos mRNAs, estabilizar o transcrito senso através de complementariedade de sequencias, como no caso do transcrito não codificante PTENpg1 e o gene supressor tumoral PTEN (JOHNSSON, P., et al., 2013; FAGHIHI, M.A., 2010). A maioria dos transcritos antisense naturais atua em *cis*, regulando a expressão de genes

próximos, mas alguns podem atuar em *trans* regulando a expressão de genes localizados a distância (WIGHT, M.; WERNER, A., 2013).

Os RNAs longos intergenicos, ou seja, aqueles que se localizam entre genes codificadores de proteínas, podem ser constituídos de vários éxons (KHALIL, A.M. et al., 2009), e foram identificados importantes representantes no genoma humano como o RNA intergenico antisense HOX ou HOTAIR. Este está localizado entre os genes HOXC12 e HOXC11 (JOHNSSON, P., et al., 2014), e tem papel relevante na remodelação da cromatina, principalmente no *locus* HOXD (DURET, L., et al., 2006), além de padrão de expressão alterado em alguns tipos de canceres (GUPTA, R.A., et al., 2010). RNAs que são transcritos a partir de sequencias “enhancers” podem ser classificados como eRNAs ou enhancer RNAs e atuam amplificando a expressão de transcritos localizados próximos ou não com o auxílio do complexo mediador para modular a arquitetura da cromatina (ØROM, U. A. et al. 2010; LAI, F. et al. 2013). Os lncRNAs HOTAIR e HOTTIP também podem ser considerados como enhancer lncRNAs uma vez que são codificados e regulam a expressão de genes do agrupamento HOX (RINN, J. L. et al. 2007; WANG, K. C. et al. 2011).

A estrutura dos genes de lncRNAs é similar a encontrada em genes de mRNAs, porém no caso dos genes longos não codificadores há maior prevalência de histonas acetiladas tais como H3K27ac e também há maior atuação de complexos repressores tais como Swr1, Rsc entre outros. Após a transcrição, alguns lncRNAs passam por processamentos inexistentes ou pouco usuais em RNAs codificadores. Os lncRNAs MALAT1 e NEAT, por exemplo, são processados em suas extremidades 3' pela RNase P a fim de originar uma estrutura similar a tRNA e os lncRNAs em suas formas maduras (QUINN, J. J.; CHANG, H. Y.; 2016). A maioria dos genes de RNAs longos não codificadores são transcritos por mecanismos similares àqueles de genes codificadores de proteínas, se utilizando da maquinaria de RNA polimerase II e complexos de iniciação e de alongamento, além de que a maioria dos transcritos gerados passam por processamento e tem uma cauda poli-A adicionada (GUTTMAN, M. et al. 2009; MERCER, T. R.; MATTICK, J. S., 2013). Frequentemente as estruturas secundárias complexas de lncRNAs, as quais podem ser subdivididas em módulos de hélices, loops e grampos e são interconectadas por pareamentos de outros tipos que não Watson-Crick (MERCER, T. R.; MATTICK, J. S., 2013; CRUZ, J.A.; WESTHOF, E., 2009; BLYTHE, A. J.; FOX, A. H.; BOND, C. S., 2016), são mais relevantes funcionalmente do que a própria sequência do transcrito, porém, elementos repetitivos podem ser cruciais para a existência e funcionalidade de determinados domínios estruturais de lncRNAs, como exemplificado por Xist, transcrito que possui uma região A de concentração de elementos repetitivos que contribuem para a formação de loops que permitem agregação de PCR1 (JEON, Y.; LEE, J.T., 2011; WUTZ, A., RASMUSSEN, T.P.; JAENISCH, R., 2002; HASEGAWA, Y. et al., 2010).

Uma das funções propostas para lncRNAs seria a repressão ou ativação da cromatina em “cis”. Neste caso o exemplo clássico seria o transcrito Xist, envolvido no processo de compensação de dosagem em fêmeas de mamíferos. Durante o processo proposto, o transcrito se posiciona ao longo de quase toda a extensão do cromossomo X futuramente inativado, expõe sequências específicas para recrutamento de proteínas tais como SMART/HDAC1 associadas a proteína repressora, a fim de desencadear eventos de deacetilação no cromossomo X, ou seja, silenciamento da expressão (CERASE et al., 2015; DA ROCHA, S. T.; HEARD, E., 2017). Já os lncRNAs que atuam em “trans” podem ser subdivididos em pelo menos três categorias: lncRNAs que regulam conformações da cromatina de genes distantes, lncRNAs que regulam a organização de estruturas nucleares e subnucleares, lncRNAs que interagem e regulam a função de outros RNAs ou proteínas (KOPP, F; MENDELL, J. T. 2018).

Os lncRNAs são capazes de interagir com o DNA através de pareamento Watson-Crick formando dupla hélices, ou principalmente através da formação de estruturas triplex híbridas de DNA e RNA nas quais o RNA adentra a cavidade maior da dupla hélice de DNA e estabelece ligações com sequências específicas alterando a expressão das mesmas (MERCER, T. R.; MATTICK, J. S., 2013; LI, Y. et al., 2016).

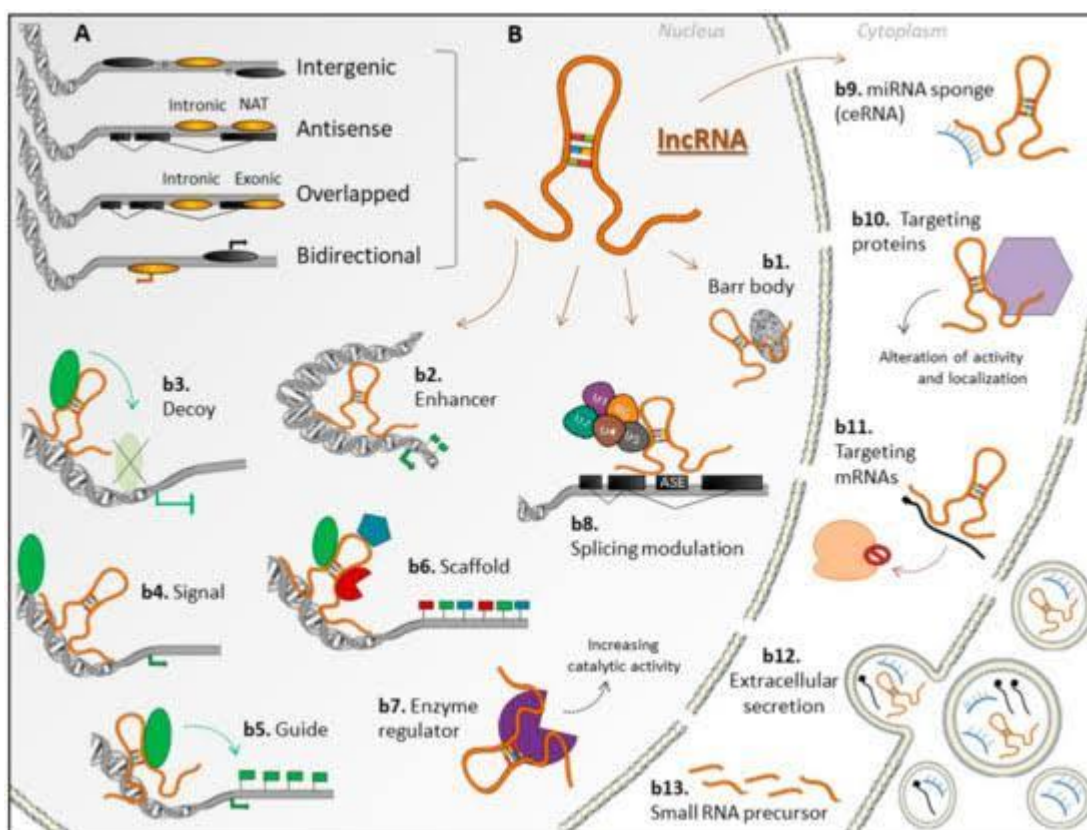
A expressão de mRNAs pode ser controlada através de lncRNAs sendo que estes se ligam aos transcritos mensageiros e regulam sua estabilidade na célula e sua taxa de tradução, conforme observado no caso de BACE1AS. Este forma uma estrutura duplex com BACE1 e inibe a ligação do miR-485-5p, devido ao fato de que esta última poderia reduzir consideravelmente a expressão da proteína (FAGHIHI, M. A. et al. 2008), ou servem como esponjas de microRNAs indiretamente modulando a expressão de seus transcritos alvo, como LINCMD1 que sequestra miR-133 e miR-135 e auxilia na diferenciação de tecidos musculares (CESANA, M. et al. 2011) e RNAs competidores endógenos como HULC (WANG, J. et al. 2010).

Já se tratando da interação entre transcritos longos não codificantes e proteínas, sabe-se que ribonucleoproteínas, quinases, proteínas ligantes de DNA e algumas enzimas podem ser localizadas complexadas com esses transcritos (HOGAN, D.J., et al., 2008; CIESLA, J., 2006). A ancoragem de proteínas pode depender de motivos estruturais específicos como no caso do lncRNA LARP7 (BLYTHE, A. J.; FOX, A. H.; BOND, C. S. 2016). Podem ser formados complexos de lncRNA ligados a proteínas, estas funcionalmente distintas ou não, que podem atuar principalmente regulando a expressão de genes, alterando a conformação da cromatina localmente, como no caso de complexos funcionais compostos com HOTAIR ou KCNQ1OT1 ou ANRIL (KUGEL, J. F.; GOODRICH, J. A., 2012; SPITALE, R. C. et al, 2011) e organizando estruturas subnucleares, como no caso de NEAT1, que por meio de ligações entre transcritos e entre estes e proteínas permite certa compartimentalização do núcleo em estruturas

menores (SUNWOO, H. *et al.* 2009; SASAKI, Y. T. F., *et al.*, 2009; BLYTHE, A. J.; FOX, A. H.; BOND, C. S. 2016).

Além de aglutinar proteínas em sua estrutura, lncRNAs podem afetar a atividade de algumas proteínas como fatores de transcrição ou proteínas de *splicing*, ou lncRNAs flanqueados por pequenos RNAs nucleolares, capazes de regular a função de proteínas de *splicing* em algumas linhagens celulares humanas (YIN, Q.-F. *et al.* 2012; GEISLER, S.; COLLIER, J., 2013) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – RESUMO DE FUNÇÕES DOS LNCRNAs



Legenda: Algumas das funções que os lncRNAs podem exercer são atuar como *enhancer* (como exemplificado em b2), esqueleto para ancoragem de proteínas (como exemplificado em b6), remodelador de cromatina, regulador de atividade enzimática (como exemplificado em b7), como esponja de microRNAs (como exemplificado em b9), como inibir da expressão de mRNAs (como exemplificado em b11), como precursor de microRNA (como exemplificado em b13), entre outras atividades. Fonte: Adaptado de SALVIANO-SILVA, A. *et al.*, 2018.

Quanto a resposta do hospedeiro a infecções virais, estudos demonstram que lncRNAs podem regular a atividade de vias de sinalização desencadeadas por receptores de reconhecimento de patógenos, regular a produção de interferons e de citocinas dentre outros mecanismos (CARPENTER, S., 2016; OUYANG, J.; HU, J.; CHEN, J.-L., 2016). Já quanto ao desenvolvimento de cânceres, RNAs não codificadores podem estar relacionados ao crescimento tumoral, transição epitélio mesenquimal e potencial metastático, angiogênese e quimioresistência, além de poder contribuir para modulação do microambiente tumoral

(WANG, M. et al., 2019). Diferentes padrões de expressão de lncRNAs estão envolvidos na supressão e no desenvolvimento tumoral em vários locais do sistema reprodutor feminino, como no caso do carcinoma endometrial, do câncer cervical, do câncer de ovário, dentre outros (HOSSEINI, E. S., et al, 2017). Vários lncRNAs já foram associados a progressão tumoral cervical e alguns também a progressão de lesões pré-cancerígenas.

2.2 RNAs LONGOS NÃO CODIFICADORES NO CÂNCER CERVICAL

O lncRNA HOTAIR participa de várias vias associadas a progressão tumoral cervical, dentre elas a via HOTAIR/microRNA 143-3p/BLC2, como esponja do miR-17-5p, a via HOTAIR/miR-23b/MAPK1, na via de sinergismo entre STAT3 e HOTAIR, na superexpressão de metaloproteinases de matriz como MMP-9, dentre outras (LIU, M. et al.,2018; JI, F. et al.,2018; LI, Q. et al., 2018; ZHANG, Y. et al., 2018, Kim HJ, et al, 2015). A expressão anormalmente alta do HOTAIR em amostras de tecidos com carcinoma cervical foi correlacionada com o tamanho tumoral e presença de metástases nos linfonodos (LIU, S.; ZHANG, M.; QU, P., 2016). Já em linhagens de câncer cervical, o HOTAIR pode regular a expressão de fatores de crescimento vascular e a transição epitélio mesenquimal (KIM, H. J. et al.,2015). O mesmo transcrito também está relacionado a progressão tumoral no câncer de ovário (Qiu J-j, et al, 2014) e no carcinoma endometrial (He X, et al, 2014). Estudos recentes avaliando níveis de expressão de HOTAIR em linhagens de células de câncer cervical resistentes a radioterapia, demonstraram que a maior expressão desse transcrito está correlacionada com a maior expressão da via de sinalização Wnt, a qual é responsável por maior proliferação celular e transição epitélio-mesenquimal (GUO, X. et al, 2019). Outro estudo conduzido recentemente também com linhagens de células de câncer cervical permitiu a observação de que a maior expressão de HOTAIR está diretamente relacionada a maior expressão do cofator transcricional *Megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1)*, este por sua vez relacionado com expressão de genes que auxiliam na progressão tumoral (ZHENG, P. et al, 2018). Investigando a expressão do HOTAIR em vesículas extracelulares isoladas de fluido cervicovaginal de pacientes com câncer cervical e controles, foi possível observar que o mesmo é mais expresso no estágio de câncer cervical e, portanto, as vesículas nesse caso podem contribuir para espalhar o fenótipo malignizado na endocérvice (ZHANG, J. et al, 2016). Como o HOTAIR apresenta funções fisiopatológicas as vezes similares e bem descritas em vários tipos de cânceres, o transcrito se torna interessante inclusive como potencial biomarcador. Em se tratando de outro tipo de carcinoma de células escamosas, o câncer de laringe, o transcrito não codificante em questão foi detectado em elevados níveis de expressão em vesículas extracelulares isoladas de soro, e em combinação com o miR-21,

pode vir a ser utilizado como biomarcador para esse tipo de malignidade (WANG, J. et al, 2014).

No caso do lncRNA EBIC, foi demonstrada que há uma ligação física entre o transcrito e o *enhancer* do homólogo 2 zeste (EZH2), o que reduz a expressão de E-caderinas e facilita a progressão tumoral e formação de metástases (Sun, N.-X., et al, 2014). Já o lncRNA MEG3 atua como supressor tumoral no caso de cânceres de ovário e de útero (SHENG, X. et al, 2014). Outros estudos demonstraram correlação entre expressão aumentada do lncRNA H19 e altas taxas de proliferação celular e desenvolvimento de tumores sólidos esferoidais em linhagens celulares de câncer cervical (IEMPRIDEE, T.,2017). A expressão elevada de H19 também já foi detectada em amostras teciduais de neoplasias intraepiteliais cervicais do tipo 3 (FEIGENBERG, T. et al.,2013). Estudos posteriores utilizando de técnicas de bioinformática foram capazes de relacionar os transcritos H19 e HOTAIR a outros microRNAs e mRNAs em redes de competidores endógenos, a fim de identificar candidatos a marcadores moleculares de câncer cervical (QIN, S. et al, 2019). O lncRNA MALAT1 também tem sua expressão aumentada em células tumorais cervicais, conforme observado em um estudo com amostras de biópsias de pacientes com HPV de alto risco e câncer cervical. Além disso, a partir de estudos em linhagens celulares de câncer cervical, foi possível observar que a alta expressão de MALAT1 induz queda na expressão do miR-124 e com isso aumento da expressão de GRB2, relacionado ao aumento do potencial de invasão, proliferação celular e escape da apoptose (LIU, S. et al, 2015). A expressão mais elevada de MALAT1 em linhagens celulares de câncer cervical também pode ser diretamente relacionada a menor expressão do miR-375 e corresponde também a níveis elevados de expressão de DNMT1, relacionado a transição epitélio mesenquimal (LIU, S. et al, 2016).

O lncRNA PVT1 já foi associado por meio de várias vias com câncer cervical, dentre elas a via PVT1/ EZH2/miR-195, a via PVT1/ EZH2/miR-200b, como esponja do miR-424, como repressor de TGF- β 1, dentre outras (SHEN, C.-J.; CHENG, Y.-M.; WANG, C.-L., 2017; ZHANG, S.; ZHANG, G.; LIU, J., 2016; GAO, Y.-L. et al., 2017; WANG, X. et al., 2018). Recentemente, em experimentos com três linhagens celulares de câncer cervical, foi proposto que a maior expressão do lncRNA PVT1 é diretamente relacionada a maior expressão do mRNA da Ciclina D1 e com a ativação da proteína BCL-2, ambas as moléculas relacionadas a regulação do ciclo celular. Também foi proposto que o PVT1 funciona como esponja para o microRNA miR-16, o que pode permitir a ativação da via NF-Kb, relevante para permitir a continuidade do ciclo celular e evitar apoptose (WANG, C. et al, 2019). Em outro estudo recente, foi apontada outra via de atuação do PVT1 no câncer cervical: em linhagens celulares desse tipo de câncer, foi demonstrado que a alta expressão desse transcrito está diretamente relacionada a baixos níveis de expressão do miR-140-5p, o que permite maior expressão da proteína Smad3, envolvida com proliferação celular (CHANG, Q.-Q. et al, 2019).

Interessantemente, o lncRNA PVT1 também é diferencialmente expresso em carcinoma seroso de alto grau, principalmente em casos em que primariamente a origem é estabelecida no ovário, sendo que o mesmo é encontrado mais expresso nos tumores primários e em metástases sólidas e em menor quantidade, em vesículas extracelulares provenientes dessas células tumorais (FILIPPOV-LEVY, N. et al, 2018).

Em outro estudo com pacientes com câncer cervical, foi mensurada a expressão do PVT1 no soro e pode ser observado que não há diferenças significativas entre pacientes com diferentes HPVs e pacientes com HPV negativo e que a expressão do transcrito pode ser diretamente relacionada ao tamanho do tumor primário (WANG, X. et al, 2018). Esse transcrito também foi detectado como marcador sorológico do progresso de lesões pré-cancerosas da endocérnix (YANG, J. P. et al., 2016).

2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares compreendem um conjunto não homogêneo e complexo de estruturas delimitadas por uma bicamada lipídica contendo moléculas como ácidos nucléicos, proteínas, lipídios e açúcares (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017; HENDERSON, M. C.; AZORSA, D. O., 2012; THÉRY, C., ZITVOGEL, L., AMIGORENA, S., 2002). A maioria dos ácidos nucléicos encontrados no interior de vesículas pode ser classificado como RNA e possui tamanho médio de 200 pares de bases, porém é detectada a presença de fragmentos de RNA de mais de 4 mil pares de bases (BATAGOV, A. O. & KUROCHKIN, I. V., 2013).

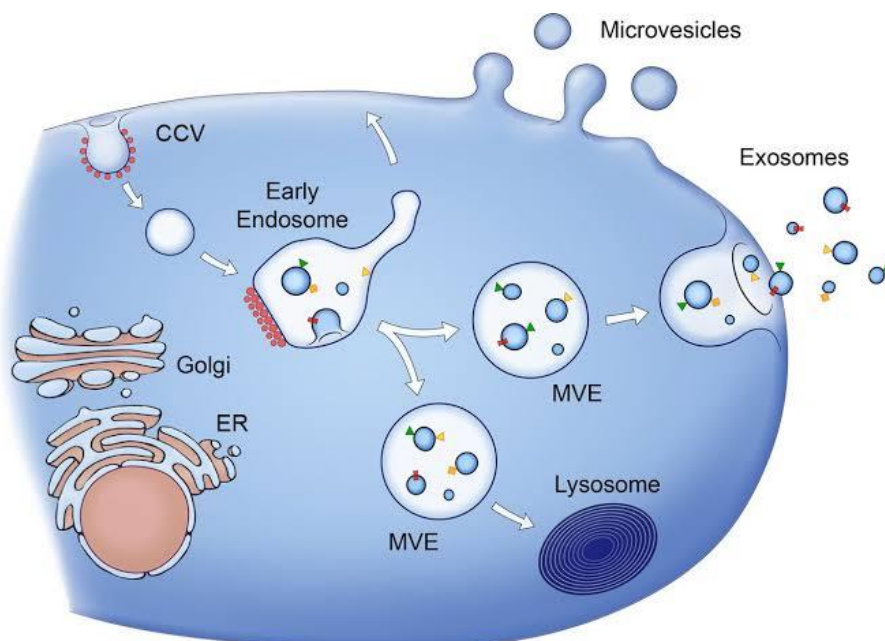
Atualmente entende-se que a função essencial das vesículas é intermediar a comunicação entre as células, podendo desempenhar funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (ANDALOUSSI, S. et al., 2013), tanto em estados fisiológicos como no encadeamento e estabelecimento de estados patológicos (FRÜHBEIS, C., FRÖHLICH, D., KRÄMER-ALBERS, E.M., 2012; MARCILLA, A., TRELIS, M., CORTÉS, A., 2012; REGEV-RUDZKI, N. et al., 2013), sendo que seu conteúdo tem potencial de alterar o fenótipo da célula aceptora (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017), varia conforme a célula de origem e o microambiente em que a mesma se encontra em dado momento (RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W., 2013).

As partículas vesiculares podem ser classificadas considerando-se vários critérios, dentre eles o tamanho, sendo as VEs consideradas como pequenas VEs (< 100nm ou < 200nm) ou médias/grandes VEs (> 200nm) e conforme as condições ou células de origem (como corpos apoptóticos, oncosomos, VEs liberadas sob condição de hipóxia, por exemplo) (THÉRY, C. et al., 2018). Classicamente, exossomos são vesículas com tamanho aproximado de 30-150 nm, vesículas com tamanho aproximado entre 50-1000 nm são denominadas de

microvesículas e em determinados contextos vesículas entre 50-5000 nm são consideradas como corpos apoptóticos (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017).

Frequentemente exossomos provem de origem endossomal (SIMONS, M.; RAPOSO, G., 2009) (FIGURA 2) e microvesículas são originadas de dobramentos da membrana celular no sentido do espaço intercelular (MINCIACCHI, V. R. et al., 2015). A via endossomal, mais bem caracterizada que a via de formação de microvesículas, consiste na formação do endossomo inicial a partir da invaginação de parte da membrana celular. Essa partícula vesicular pode se fundir com outras partículas vesiculares já processados no retículo endoplasmático e no complexo de golgi, destinando sua carga para reciclagem ou degradação. Os endossomos iniciais que não se fusionaram se transformam em endossomos tardios e têm parte de sua membrana invaginada constituindo agora corpos multivesiculares que passam por processos de amadurecimento e formação de vesículas intraluminais. Nessa etapa, é essencial a participação de complexos proteicos, como os ESCRTs, capazes de selecionar a carga das vesículas e direcioná-las ao seu destino (KATZMANN D J. et al., 2003; BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017; HENNE, W. M. et al., 2013). Em vertebrados, a maquinaria ESCRT pode compreender até 30 proteínas diferentes, geralmente formando 5 subcomplexos. O subcomplexo ESCRT-0 seria responsável pelo direcionamento de cargas ubiquitinadas para vesículas que serão direcionadas para degradação. Os subcomplexos I, II e III seriam responsáveis pelo desenvolvimento de vesículas intraluminais. Já o subcomplexo que abriga a proteína Vps4 seria responsável por assegurar a correta excisão da membrana plasmática para liberação de exossomos e também pela possível reciclagem dos subcomplexos ESCRT (HENNE, W.M.; BUCHKOVICH, N.J.; EMR, S.D., 2011; RAIBORG, C.; STENMARK, H., 2009; HENNE, W.M.; STENMARK, H.; EMR, S.D., 2013). Interessantemente, dependendo do tipo celular em questão, as vias e as proteínas dos subcomplexos podem apresentar funcionalidades diferentes. Por exemplo, a depleção de Tsg101 (geralmente componente do subcomplexo I) em células HeLa impede a secreção de vesículas, enquanto que em células epiteliais pigmentadas da retina somente afeta a seleção da carga vesicular (COLOMBO, M., MOITA, C., VAN NIEL, G., 2013; ABRAMI, L., et al, 2013).

FIGURA 2 – VIA ENDOSSOMAL DE EXOSSOMOS



Legenda: Através de invaginações da membrana celular, formam-se endossomos iniciais, estes se fusionam entre si e a outros compartimentos vesiculares e formam endossomos tardios. Estes por sua vez amadurecem e originam corpos multivesiculares (MVE) com vesículas intraluminais em seu interior. Algumas dessas estruturas se fundem a lisossomos e outras se fundem a membrana da célula e liberam exossomos. Fonte: Adaptado de SIMONS, M.; RAPOSO, G., 2009.

Por fim, alguns corpos multivesiculares são direcionados a se fundir com a membrana plasmática e as vesículas intraluminais liberadas para a circulação ou espaço extracelular consiste nos exossomos (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017; ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O., 2016; GRANT, B. D.; DONALDSON, J. G., 2009).

A composição da membrana das vesículas geralmente é diferente daquela observada nas células secretoras (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017) devido a que a maioria das moléculas componentes da bicamada lipídica dos exossomos provem do complexo de golgi, predominando moléculas como colesterol, fosfatidilserina e glicoesfingolípídios (LLORENTE, A. et al., 2013; MORELLI, A. E. et al., 2004; LAULAGNIER, K. et al., 2004). Algumas proteínas são mais enriquecidas na superfície dos exossomos e podem ser utilizados como biomarcadores, como tetrasporinas do tipo CD9, CD63, sendo essas consideradas por estudiosos como essenciais para formação de exossomos (ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O., 2016); Alix (MCCULLOUGH, J. et al., 2008); TSG101, proteína componente do subcomplexo ESCRT I (MCCULLOUGH, J. et al., 2008) entre outras.

As vesículas podem atuar no sistema imune de maneira a carrear MHC-I e/ou MHC-II e facilitar apresentação de antígenos (NAKAYAMA, M., 2015). Podem intermediar a ativação de células B durante a sinapse imunológica (CHOUDHURI, K. et al., 2014), promover rejeição a transplantes (LIU, Q. et al., 2016), auxiliar na apresentação de antígenos tumorais, conferir resistência a drogas para células tumorais mais sensíveis, contribuir para evitar inflamações

crônicas ou desenvolvimento de autoimunidades (ROBBINS, P. D.; DORRONSORO, A.; BOOKER, C. N., 2016; BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017), além de modular o microambiente pré-tumoral e tumoral (WANG, M. et al., 2019). No caso de infecções virais, alguns tipos virais podem recrutar a maquinaria ESCRT e induzir a secreção de vesículas contendo partes virais, por exemplo. Já os vírus do tipo papiloma podem inibir a secreção de vesículas por indução da degradação de p53 ou podem alterar a carga vesicular a fim de maximizar a liberação de fatores de inibição de apoptose (YU, X.; RILEY, T.; LEVINE, A.J., 2009). Infecções pelo HIV podem impedir a liberação de vesículas por inibir interações necessárias entre algumas proteínas dos subcomplexos de ESCRT e CD63 e CD81 (GAN, X.; GOULD, S.J., 2011).

As vesículas têm suas cargas alteradas dependendo do estado fisiopatológico e, portanto, podem ser utilizadas como bioindicadoras do estado imune do indivíduo para rastreamento de diversas doenças (CLAYTON, A. et al., 2003; PANT, S., HILTON, H., BURCZYNSKI, M. E., 2012; REVENFELD, A. L. et al., 2014).

2.4 VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV)

Os vírus do tipo papiloma, geralmente delimitados por estruturas em forma de icosaedro e com genoma constituído de DNA de fita dupla circular, têm sua origem evolutiva há cerca de 350 milhões de anos (PFISTER, H., FUCHS, P.G., 1987; BRAVO, I.G., DE SANJOSE, S., GOTTSCHLING, M. et al., 2010). Há cerca de 200 milhões de anos, esses vírus passaram a infectar não só epitélios como também mucosas e a diversificar os possíveis hospedeiros, incluindo mamíferos e posteriormente humanos (BRAVO, I.G; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M., 2015).

Os vírus do tipo papiloma humano (HPVs) podem ser subdivididos de acordo com o local da infecção primária em cutâneos e genitais. A transmissão de ambas as formas pode se dar por contato direto ou por transmissão perinatal (NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L., 2014). Segundo seu potencial carcinogênico, os HPVs podem ainda ser subdivididos como de alto, indeterminado e de baixo risco, sendo que principalmente os primeiros evoluíram a capacidade de direcionar a proliferação celular tanto na camada basal da epiderme quanto na camada parabasal (BARROW-LAING, L.; CHEN, W; ROMAN, A., 2010; ZHANG, B.; CHEN, W.; ROMAN, A., 2006), e, portanto, estão diretamente envolvidos com desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e cânceres (GOTTSCHLING, M. et al., 2011). Os tipos carcinogênicos de HPV mais relevantes seriam HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59 e HPV68 (TYLER, K.; NATHANSON, N., 2001). Os tipos HPV16 e HPV18 aparecem em cerca de 70% dos casos de câncer cervical e em 50% dos casos de neoplasia cervical intraepitelial de grau 3 (SMITH,

J.S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B., 2007). A co-transmissão de vários subtipos virais ocorre em cerca de 30% dos casos (HERRERO, R., CASTLE, P.E., SCHIFFMAN, M., et al, 2007). A maioria dos tipos de HPV intitulados como de alto risco para desenvolvimento de cânceres são evolutivamente relacionados ao gênero Alpha (GOTTSCHLING, M., GOKER, M., STAMATAKIS, A., et al., 2011) e têm como uma de suas estratégias principais a ativação de vias de danos de DNA (como a via ataxia telangiectasia – ATM) nas células infectadas para manter a estabilidade dos epissomos virais principalmente na fase de amplificação do genoma viral em células das camadas parabasais (MOODY, C.A., LAIMINS, L.A., 2009).

As ORFs do genoma viral podem ser subdivididas em regiões de transcrição inicial (denominada E de “early”), expressas tanto nas células que estão ativamente produzindo novos vírus quanto nas células nas quais a infecção é latente, e regiões de transcrição tardia (denominada de L de “late”), somente expressas em células infectadas produtivas (PFISTER, H.; FUCHS, P. G., 1987; BAKER, C. C. et al., 1987). Os HPVs desenvolveram mecanismos específicos de evasão do sistema imune do hospedeiro, sendo que seus genomas podem codificar proteínas como E5, E6 e E7, que podem auxiliar em mecanismos como inibição parcial da apresentação de peptídeos virais conjugados a moléculas de MHC de classe I (ASHRAFI, G. H. et al., 2006) e também contribuem para migração de células pré-malignas e malignas (BARILLARI, G. et al., 2018). A proteína viral E6 é considerada potencialmente carcinogênica tanto se produzida por vírus de baixo risco ou de alto risco, pois em ambos os casos desencadeia inativação da proteína p53 (DOORBAR, John et al., 2015). Outras proteínas virais também desempenham importantes funções, dentre elas E1 (helicase necessária para replicação do genoma viral), L1 (proteína relevante na formação do capsídeo viral), E2 (atua no genoma viral e da célula hospedeira), E5 (regula positivamente o receptor de fator de crescimento epitelial mantendo sua sinalização e conseqüentemente as condições para replicação de células da camada parabasal) dentre outras (LAZARCZYK, M. et al, 2008; DOORBAR, J. et al, 2015). As proteínas virais também podem regular a expressão de RNAs não codificadores das células hospedeiras e vice-versa, além de poder influenciar na quantidade e no conteúdo de vesículas extracelulares liberadas pelas células hospedeiras (CAI, X. et al.; 2006; SHARMA, S. et al.; 2015; HONEGGER, A. et al., 2013).

2.5 LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E CÂNCER CERVICAL

A progressão da infecção pelo HPV até o estabelecimento de lesões pré-cancerosas e posteriormente de carcinoma *in situ* pode ser subdividida em 4 estágios. Primeiramente, ocorre entrada do vírus na zona de transformação cervical, local que abriga tecido metaplásico originário do processo fisiológico de substituição de tecido glandular por tecido epitelial

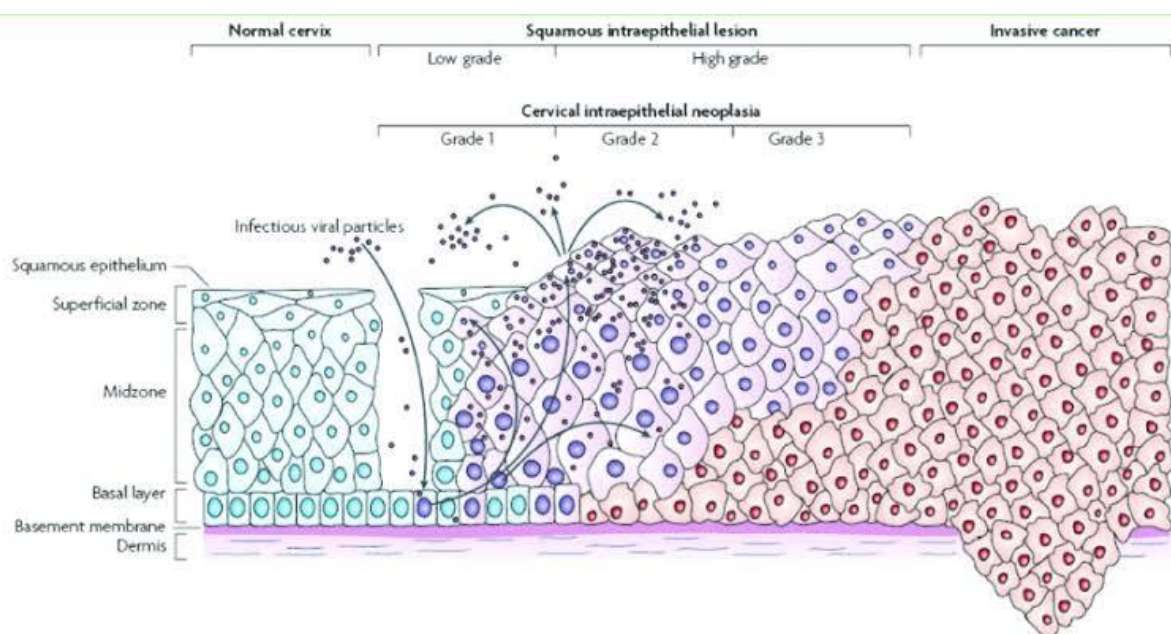
escamoso, e é reconhecidamente o principal local de origem das lesões pré-cancerosas e dos cânceres cervicais (HERFS, M. et al.; 2012; JACOBSON, D.L. et al., 1999; BERTI, F. C. B., et al, 2019). Na camada basal do epitélio na zona de transformação cervical, os vírus são endocitados por queratinócitos, no interior dos quais o genoma viral se torna exposto e é parcialmente realocado próximo ao genoma nuclear da célula hospedeira. Depois que a célula inicialmente infectada passa por pelo menos um evento de mitose e uma de suas células filhas entra em diferenciação em direção a camada parabasal, a replicação dos materiais genéticos celulares e virais passa a ser sincronizada (MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A., 2010). As proteínas virais E1 e E2 são relevantes nessa fase do ciclo viral, pois auxiliam na ancoragem dos epissomos virais nos cromossomos mitóticos e conseqüentemente na sincronização comentada anteriormente. Além disso, outras proteínas virais também são relevantes, tais como a proteína E7, que apresenta domínios de ligação para proteínas como p21, considerada supressora tumoral, e assim permite a expressão elevada de CDK2 e a continuidade da divisão celular (SHIN, M. K.; BALSITIS, S., BRAKE, T.; LAMBERT, P. F, 2009; JONES, D. L.; ALANI, R. M.; MUNGER, K., 1997). Nesta etapa, pode-se dizer que houve persistência da infecção viral.

Posteriormente, há transformação do epitélio em lesão pré-cancerosa. Em estágios mais avançados de lesões pré-cancerosas, é comum a ruptura da forma epissomal do material genético viral em regiões genômicas correspondentes a proteínas virais reguladoras como a E2 e integração do genoma viral juntamente ao genoma nuclear da célula hospedeira em regiões já mais instáveis (DOORBAR, J., et al, 2012; NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L., 2014). A partir desse estágio, a coexpressão das proteínas virais E1 e E2 é responsável pela replicação do genoma viral integrado, o que aciona os mecanismos de reparo de DNA e de recombinação dinamizando o acúmulo de mutações no genoma nuclear e conseqüentemente as chances de progressão para estágios malignos (MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A., 2010).

A classificação histológica das lesões pré-cancerosas subdivide as mesmas em estágios denominados neoplasias intraepiteliais do tipo 1 (NIC 1), consideradas indicativas de infecção ativa pelo HPV, do tipo 2 (NIC 2), consideradas como anormalidades celulares moderadas, e do tipo 3 (NIC 3), caso no qual o epitélio cervical foi quase que inteiramente substituído por células derivadas de clones com possíveis anomalias genéticas (SCHIFFMAN, M. ET AL., 2007, RICHART, R. M., 1972; COX, J.T. et al., 2003) e finalmente invasão da membrana basal do epitélio, com estabelecimento de carcinoma *in situ* (SCHIFFMAN, M. et al., 2007) (FIGURA 3). Nos estágios de NIC 3 e carcinomas *in situ*, pode ser observada a coexistência de formas epissomais e cópias integradas do genoma viral, estas últimas parcialmente associadas à instabilidade genômica característica de cânceres (KADAJA, M. et al., 2009; BIBBO, M. et al., 1989; STEINBECK, R. G., 1997). Já a classificação Bethesda, a qual

considera exames citopatológicos ou de biópsias, subdivide as lesões em intraepiteliais escamosas de alto grau (também denominadas de LIEAG) e lesões intraepiteliais de baixo grau (conhecidas como LIEBG) (DAVEY, D.D. et al., 2004) e estes resultados são frequentemente relacionados a resultados citológicos obtidos com o exame Papanicolau.

FIGURA 3 – PROGRESSÃO DAS LESÕES DA ENDOCÉRVIX



Legenda: O HPV tende a atingir as camadas mais basais da endocérnix por meio de pequenas lesões no epitélio da mesma. Com a persistência da infecção viral, o genoma viral é replicado simultaneamente ao genoma celular a medida que as células epiteliais são repostas nas camadas mais superficiais. Em cada estágio da progressão da lesão, mais células são clones com prováveis anomalias e aumenta a probabilidade de invasão da derme e consequentemente instalação de tumores. Fonte: Adaptado de WOODMAN, C.B.; COLLINS, S.I.; YOUNG, L.S., 2007.

Considerando dados mundiais, no caso de detecção de NIC 1, somente 10% tendem a progredir para o estágio de NIC 3. No caso de NIC 2, 20 % tendem a progredir para os estágios de NIC 3 e câncer cervical. Já a NIC 3 tem 10 a 15% de chances de evoluir para carcinoma invasivo (OSTÖR, A. G., 1993). O câncer cervical é o mais comum entre as mulheres no mundo, com cerca de 500.000 novos casos em média todos os anos (WHO, Cervical Cancer, 2018). Pesquisas apontam que em países em desenvolvimento, esse tipo de malignidade é a principal causa de morte entre mulheres jovens (DENNY, L., 2012). Estudos mostram que a maioria das mulheres com câncer de colo de útero do estágio invasivo tem entre 35 e 55 anos, e que a média de intervalo de tempo entre a lesão pré-cancerosa e o estágio invasivo é menor em relação ao tempo entre infecção e início da lesão intraepitelial (SCHIFFMAN, M. et al., 2007). Dados recentes evidenciam que em nações em desenvolvimento como a África Subsaariana, há mais de 75.000 casos novos por ano de câncer cervical e cerca de 50.000 mortes por ano (MBOUMBA BOUASSA, R.-S. et al., 2017).

Em países desenvolvidos como o caso da Noruega, as taxas de incidência de NIC 2 aumentaram de 3,6 para 6,7% ao ano e as taxas de incidência de neoplasias intraepiteliais cervicais do tipo 3 aumentaram 1,6% ao ano (ORUMAA, M. et al., 2019).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de plasma sanguíneo de 33 mulheres. Destas, 10 com NIC 1 (ou lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), 11 com NIC 2 ou NIC 3 (também classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de alto grau), 3 diagnosticadas com câncer cervical e 9 mulheres saudáveis (TABELA 1). As amostras foram coletadas no Hospital Erasto Gaertner, com aprovação do Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (CAAE 02385318.4.0000.0102).

TABELA 1: PERFIL CLÍNICO DAS PACIENTES

Código	Idade	Ancestralidade	Biópsia	Colposcopia	Código	Idade	Ancestralidade	Biópsia	Colposcopia
EGP009	41	AFR	NIC 1 (LIEBG)	LIEAG	EGP045	28	EUR	NIC 1 (LIEBG)	endocérnix normal
EGP010	32	MIS	NIC 2 (LIEAG)	LIEBG	EGP046	46	EUR		NIC 2 (LIEAG)
EGP013	56	EUR	NIC 1 (LIEBG)	endocérnix normal	EGP047	24	EUR		endocérnix normal
EGP015	31	EUR	NIC 2 (LIEAG)	NIC 2 (LIEAG)	EGP048	47	EUR		endocérnix normal
EGP017	39	AFR	NIC 2 (LIEAG)	NIC 2 (LIEAG)	EGP050	63	EUR	NIC 2 (LIEAG)	ASC-H
EGP019	54	EUR	NIC 1 (LIEBG)	NIC 2 (LIEAG)	EGP053	46	EUR		endocérnix normal
EGP022	51	EUR	NIC 1 (LIEBG)	endocérnix normal	EGP054	38	EUR		endocérnix normal
EGP023	18	MIS	NIC 1 (LIEBG)	endocérnix normal	EGP060	73	EUR		endocérnix normal
EGP024	37	AFR	NIC 1 (LIEBG)	NIC 1 (LIEBG)	EGP062	43	EUR	NIC 1 (LIEBG)	endocérnix normal
EGP026	56	AFR	NIC 1 (LIEBG)	ASC-US	EGP063	38	EUR	NIC 3 (LIEAG)	ASC-H
EGP030	34	EUR		endocérnix normal	EGP064	29	MIS		endocérnix normal
EGP031	24	EUR	NIC 2 (LIEAG)	endocérnix normal	EGP065	61	EUR		endocérnix normal
EGP032	56	EUR	NIC 3 (LIEAG)		EGP072	45		CC	
EGP035	46	EUR		endocérnix normal	EGP078	40	EUR	NIC 3 (LIEAG)	
EGP039	45	MIS	NIC 2 (LIEAG)	endocérnix normal	EGP087	23	EUR	NIC 3 (LIEAG)	
EGP044	44	EUR	NIC 1 (LIEBG)	NIC 3 (LIEAG)	EGP025	33	EUR	CC	malignidade
					EGP0121	34	EUR	CC	malignidade

Legenda: EUR- ancestralidade predominantemente europeia; MIS- parda; AFR- ancestralidade predominante africana; Códigos iniciados em EGP – amostras coletadas no Hospital Erasto Gaertner; LIEBG- lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; LIEAG – lesão intraepitelial escamosa de alto grau; CC – câncer cervical; NIC 1- Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 1; NIC 2-Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 2; NIC 3- Neoplasia Intraepitelial Cervical grau 3; ASC-US/ ASC-H- outras lesões. Fonte: A autora (2019).

É relevante salientar que no presente trabalho foi estabelecido o seguinte critério de classificação das amostras: o diagnóstico primariamente considerado foi o estabelecido pela biópsia em caso de não realização ou contradição com os resultados da colposcopia e em caso de não realização da biópsia, foi considerado o laudo da colposcopia.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas por 15 minutos a 1000xg e o sobrenadante coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e identificado como plasma.

A fim de isolar as vesículas extracelulares do plasma, principalmente a fração enriquecida com exossomos, utilizou-se o kit *Exosome Isolation Reagent from plasma* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). O protocolo detalhado está no ANEXO 1.

A partir das amostras com vesículas isoladas do plasma sanguíneo foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, EUA) e fenol:clorofórmio

foram utilizados para o isolamento do RNA vesicular. O protocolo detalhado está no ANEXO 2.

A caracterização morfológica das vesículas extracelulares foi aferida a partir da metodologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas ou NTA (do inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis*), com o equipamento NanoSight LM10 (Malvern, Worcestershire, UK) do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ, Paraná, Brasil). Para tanto foram utilizadas 3 amostras de pacientes com lesão de alto grau, 3 amostras de pacientes com lesão de baixo grau e 3 amostras de mulheres saudáveis. A Análise de Rastreamento de Nanopartículas, que considera as propriedades da distribuição do espectro de luz e o movimento browniano das partículas, fornece dados como a moda, a mediana e a média do tamanho das partículas, no caso vesículas em suspensão, além da concentração das mesmas por mililitro de solução. As vesículas isoladas foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos para formação de pellet, o qual foi ressuscitado e diluído em PBS filtrado (tampão fosfato salino) filtrado, até a concentração final da solução vesículas + PBS estar em torno de 1:1000. As soluções foram injetadas lentamente no NanoSight LM10 e foram gravados em média 5 vídeos de 30 segundos para cada amostra a partir de uma câmera acoplada ao microscópio a partir do qual as luzes espalhadas pelas partículas serão visualizáveis. O teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis, que se baseia na verificação da distribuição das amostras a partir da análise de postos de variância de um fator, foi utilizado para comparação das amostras não pareadas dos 3 grupos descritos previamente.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) também foi utilizada para complementar a caracterização morfológica. A técnica consiste em um microscópio no qual um feixe de elétrons é lançado em direção a amostra, sendo o contraste na imagem obtida resultante da absorção de elétrons devido a espessura e composição do material. A metodologia básica de utilização do microscópio consiste em inserir no porta objeto de espécime uma micrograde circular (Standard A, 200 mesh) contendo a amostra preparada. O protocolo detalhado está no ANEXO 3.

Para caracterização proteica das vesículas foram realizados ensaios de Western Blot em uma amostra de paciente com lesão de alto grau e outra de uma mulher saudável, sendo que foram preparadas alíquotas com vesículas e alíquotas com plasma depletado de vesículas para cada amostra. As vesículas foram previamente isoladas segundo o protocolo descrito no ANEXO 1. O protocolo geral seguido consta no ANEXO 4.

A fim de quantificar as concentrações das amostras de RNA isoladas de vesículas, foi utilizado o QuantiFluor® Dye System e o equipamento Quantus™ Fluorometer (Promega, USA). Este utiliza intercalantes fluorescentes específicos para RNA e fornece a concentração em ng/µl e para tanto deve ser ajustado para RNA e calibrado corretamente. Para o preparo de soluções de calibragem foi diluída solução de TE 20x até a concentração de 1x com água

sem nucleases. Depois o fluorescente de RNA foi diluído com TE 1x até a concentração de 1:400 para a preparação de working solution; 5µl de solução padrão de RNA foram diluídos em 200µl de working solution para se obter a amostra padrão; para preparo de amostra branca, 1µl de amostra padrão foi diluído em 200µl de working solution. Para quantificar amostras, foi diluído 1µl das mesmas em 200µl de working solution.

Após a quantificação, o RNA foi concentrado utilizando-se o equipamento SpeedVac (ThermoFisher Scientific) e posteriormente ressuspendido em 14µl de água livre de nucleases. Nesta etapa, todas as amostras possuíam RNA com concentrada aproximadamente igual a 2 ng/µl.

Após a concentração do RNA, cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O mix de transcrição reversa 2x foi preparado no gelo e para cada reação de 20µl de volume final foram adicionados 2µl de tampão de transcrição reversa 10x, 0,8µl de mix de dNTP 25x (100mM), 2µl de primers randômicos (de pouca especificidade) de transcrição reversa 10x, 1µl de transcriptase reversa MultiScribe™ e 0,5µl de inibidor de RNase. O mix foi homogeneizado e deixado no gelo, até que 6,3µl do mesmo foram misturados em um tubo com 13,7µl de RNA molde (este volume deverá ser correspondente a máxima concentração de RNA alcançada, próxima de 2µg de RNA) e o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado. O termociclador foi ajustado para: Etapa 1-25°C, 10 minutos; Etapa 2- 37°C, 120 minutos; Etapa 3- 85°C, 5 minutos; Etapa 4- 4°C.

Para quantificar os lncRNAs alvos extraídos das vesículas foi empregada a técnica de PCR em tempo real, utilizando-se o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), que possui composto fluorescente com afinidade por DNA dupla fita. O protocolo do mix utilizado para um volume final de reação de 8µl consistiu na adição de 5µl de GoTaq, 0,25µl do primer forward (10µmol/µl), 0,25µl do primer reverse (10µmol/µl), 1,5µl de água livre de nucleases. O mix foi homogeneizado e 7µl do mesmo foram pipetados nos poços designados da placa de qPCR (Applied Biosystems; placas de 96 e de 384 poços) e em seguida foram pipetados 1µl de cDNA de cada amostra em cada poço, seguida de homogeneização. Deve-se salientar que foi preparado um mix para cada transcrito testado. O controle endógeno utilizado foi GAPDH (forward: 5'CCCACTCCTCCACCTTTGAC3'; reverse: 5'CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA3'). Foram também desenhados *primers* para os alvos escolhidos: HOTAIR (forward: 5'TGTAGACCCAGCCCAATTTAAG3'; reverse: 5'GGACCTTTGCTTCTATGTTCCCTC3') e PVT1 (forward: 5'-ATAGATCCTGCCCTGTTTGC-3'; reverse: 5'- CATTTCCTGCTGCCGTTTTTC-3'). A reação foi otimizada, considerando a validação dos *primers* por curva de *melting* (para averiguar a especificidade) e estabelecimento de curva padrão (para averiguar a eficiência). As curvas padrão foram estabelecidas utilizando-se amostras de cDNA extraído de células sanguíneas em

concentração inicial de 10ng/μl e com fator de diluição 0,5x. Conforme a concentração de cDNA era reduzida pela metade, o Ct deveria tender a aumentar em $2^{0,5}$.

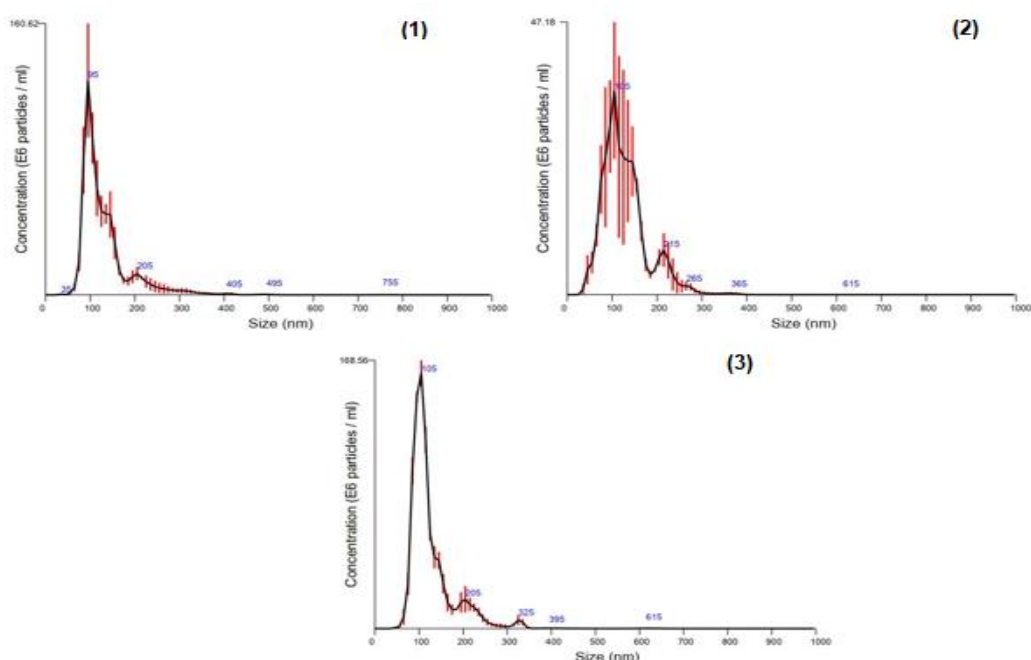
As curvas de amplificação de qPCR foram interpretadas utilizando-se a metodologia de $2^{-\Delta\Delta CT}$ que se baseia em reduzir do valor de CT da amostra o valor de CT do controle endógeno a fim de minimizar erros de pipetagem e ciclagem, e deste novo valor reduzir a mediana do controle e por fim calculou-se o “fold”, valor representativo da expressão da amostra relativo ao controle da reação. Esse sistema se baseia na hipótese de que a cada ciclagem da PCR, a quantidade de produto é dobrada. Os resultados foram analisados quanto a significância estatística através de testes não paramétricos, como Mann Whitney.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Foi possível estabelecer uma linha de processamento das amostras de sangue, incluindo o isolamento de vesículas das amostras de mulheres com diferentes tipos de lesões pré-cancerígenas. A eficiência dos métodos propostos foi testada por meio da avaliação da morfologia e da quantidade das partículas vesiculares isoladas (FIGURA 4).

FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DAS PARTÍCULAS EM AMOSTRAS DE CONTROLE (1), PACIENTES COM LIEBG (2) E PACIENTE COM LIEAG (3)



Observação: Os picos em preto destacam a concentração em número de partículas/ml em relação ao tamanho das vesículas observadas; já as barras em vermelho são melhor indicativo do tamanho médio das vesículas nas concentrações mais proeminentes. Fonte: A autora (2019).

Não houve diferença significativa de tamanho médio ($p=0,6286$) e de concentração média de nanopartículas enriquecidas em exossomos ($p=0,6286$) entre as 3 amostras de controles, 3 mulheres com lesão de baixo grau e 3 mulheres com lesão de alto grau (TABELA 2). Não houve diferença significativa também entre o diâmetro das vesículas de controles e de pacientes com diferentes tipos de lesão em 10% do ensaio ($p=0,9286$) e nem em 90% do ensaio ($p=0,2964$).

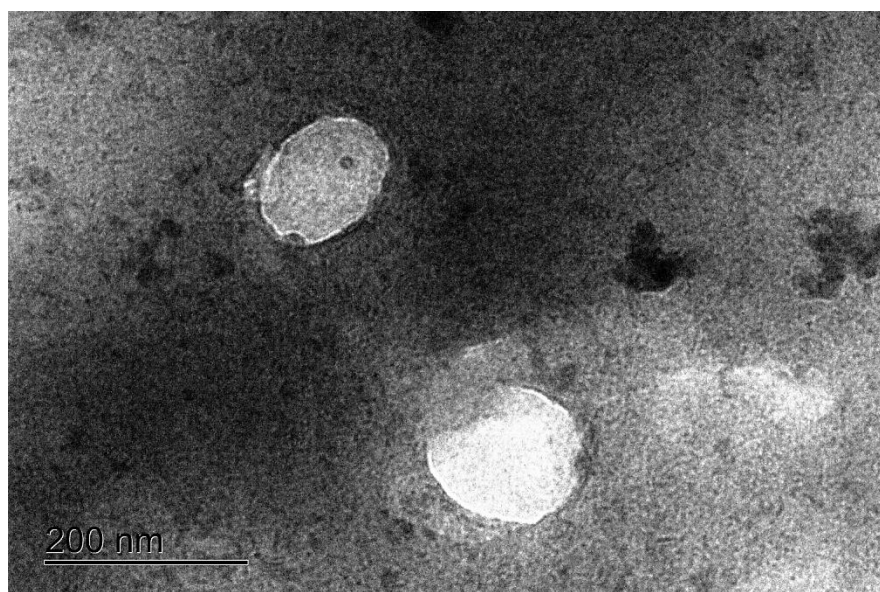
TABELA 2: ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS

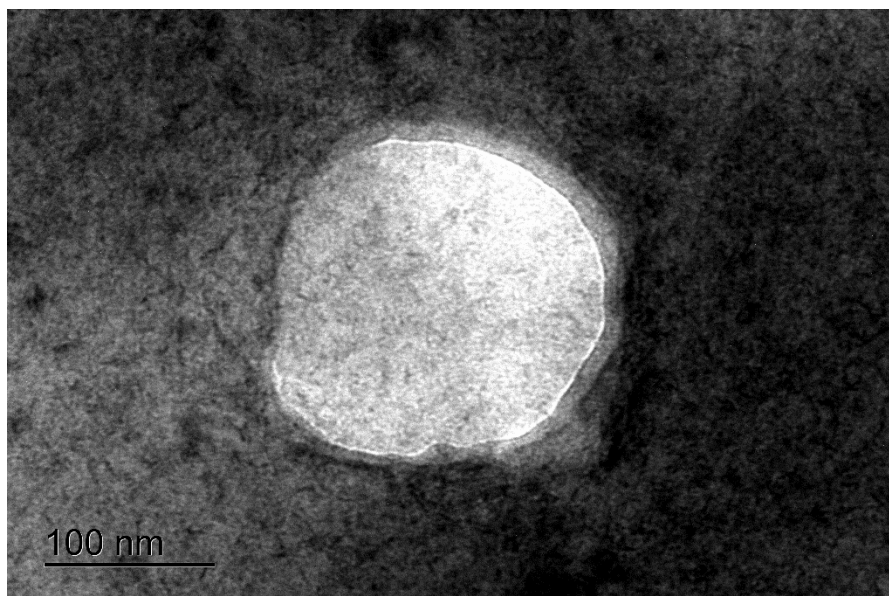
Amostras	Tamanho	Concentração	D10	D90
Controles	126,3	6,77	75,5	195,7
LIEBG	147,2	5,23	69,7	217,7
LIEAG	122,3	8,84	70,2	184,4
Valor de p	0,6286	0,6286	0,9286	0,2964
Sob. Controles	64,7	4,32	13,7	135,2
Sob. LIEBG	101,1	3,9	32,2	171,5
Sob. LIEAG	133,8	3,52	74,9	216,8

Observações: Medianas dos tamanhos em nm; mediana das concentrações em $\times 10^{11}$ partículas/ μ l; medianas de diâmetros em nm; D10- diâmetros em 10% do ensaio; D90- diâmetros em 90% do ensaio. Fonte: A autora (2019).

Foi feita a visualização da população de vesículas extracelulares isoladas do plasma de uma amostra de paciente com lesão de alto grau (FIGURA 5). Foi possível notar que a população é relativamente heterogênea quanto ao caráter tamanho, sendo a maioria das vesículas encontradas na faixa entre 100 e 200 nm, característico de exossomos.

FIGURA 5: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE VESÍCULAS



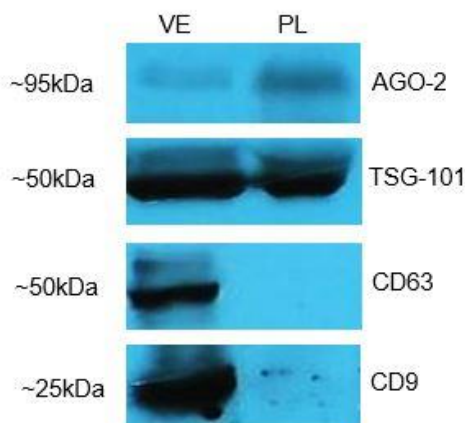


Observações: Fotomicrografias em aumento de 30000 e 50000x respectivamente.

Fonte: A autora (2019).

As proteínas AGO-2 não precipitaram juntamente com as vesículas (VE), demonstrando sua localização no exterior das mesmas, o que é evidenciado pela presença, embora não muito expressiva, dessa proteína no plasma depletado de vesículas (PL). Esperava-se que a proteína TSG-101 fosse detectada em maior quantidade nas vesículas isoladas, porém a mesma foi detectada em quantidades similares tanto nas vesículas isoladas quanto no plasma depletado de vesículas. As proteínas CD9 e CD63 foram observadas em quantidades significativamente maiores no isolado de vesículas, fato que auxilia a classificar o mesmo como sendo vesículas extracelulares (FIGURA 6).

FIGURA 6: FILME DE REVELAÇÃO DE WESTERN BLOTTING

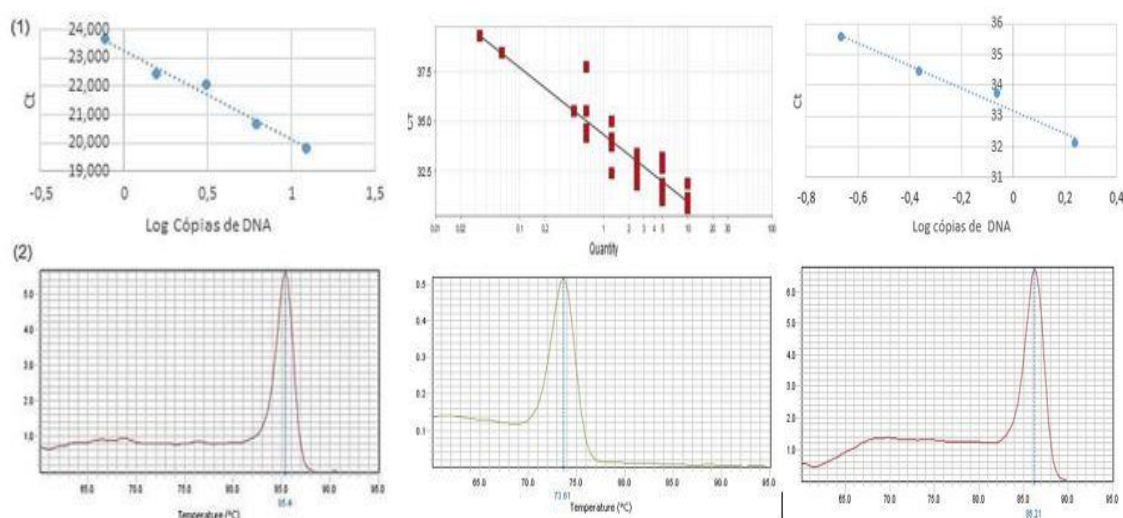


Legenda: Proteínas vesiculares em amostras de isolado de vesículas e em amostras de plasma depletado das mesmas. Observações: Indicação do tamanho esperado para as proteínas a esquerda e da identificação das proteínas a direita. Fonte: A autora (2019).

4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS ALVOS POR PCR EM TEMPO REAL

O controle endógeno GAPDH teve sua eficiência mensurada em 108,20%, e os *primers* de HOTAIR e PVT1 tiveram 97,125% e 89,60%, de eficiência, respectivamente (FIGURA 7 (1)). Quanto à especificidade, foi feita uma PCR com gradiente de temperatura entre 58°C e 63°C e posteriormente, a curva de *melting* demonstrou que todos os *primers* são específicos em todas as temperaturas testadas, com exceção dos *primers* do PVT1, que tem melhor especificidade em torno de 62°C (FIGURA 7 (2)).

FIGURA 7: EFICIÊNCIA E ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS

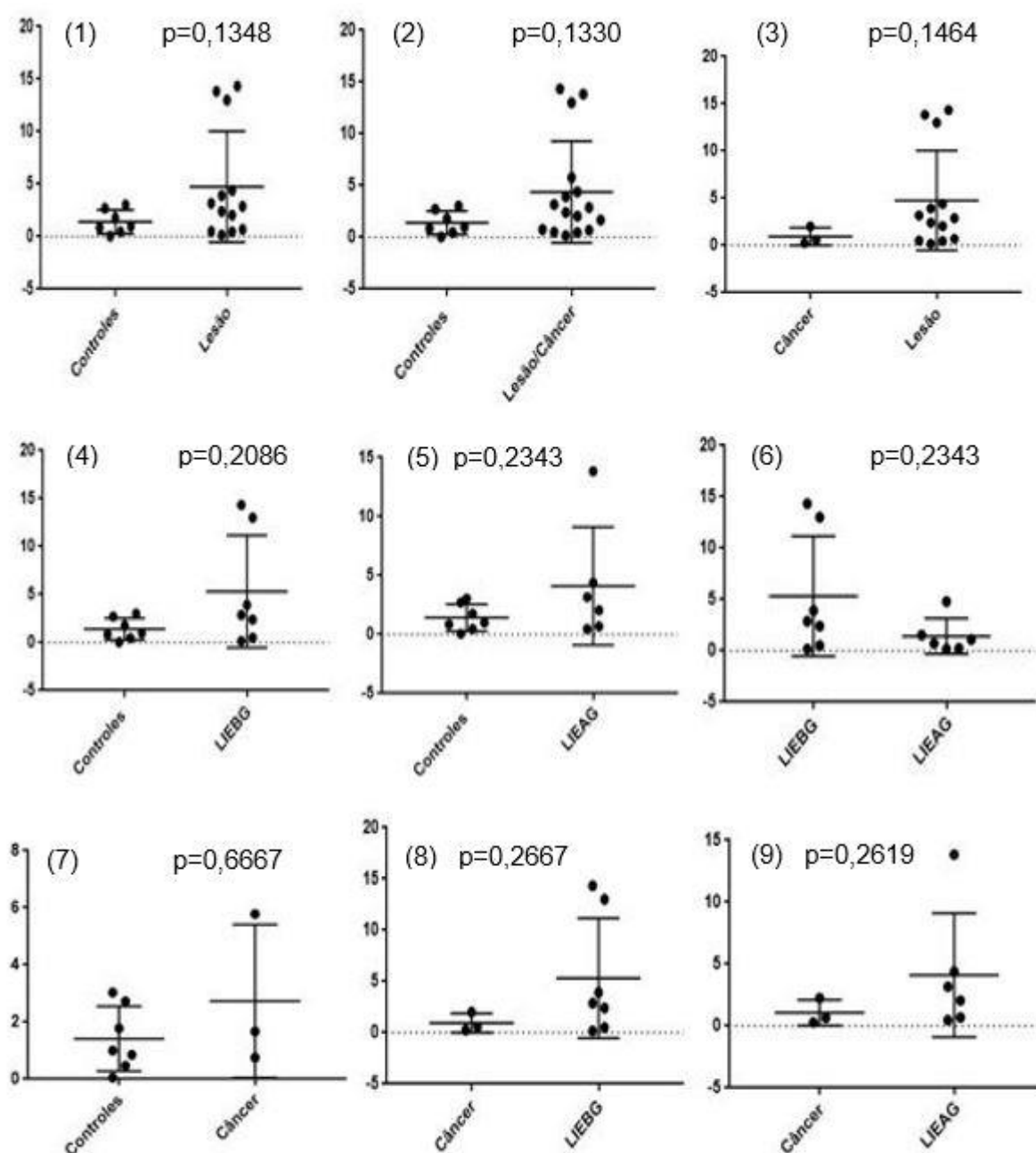


Legenda: (1) Curva padrão GAPDH (esquerda); Curva padrão HOTAIR (centro); Curva padrão PVT1 (direita) – eixo x log do número de cópias de DNA e eixo y Ct; (2) Exemplos de picos verificados na curva de *melting* dos *primers* GAPDH (esquerda); HOTAIR (centro) e PVT1 (direita). Fonte: A autora (2019).

A partir da realização de qPCRs foi possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa de expressão do RNA longo não codificante HOTAIR em mulheres com algum tipo de lesão cervical (NIC 1+NIC 2+NIC 3) em relação a mulheres saudáveis ($p=0,1348$; $\text{fold}=2,88$) (FIGURA 8 (1)). Considerando mulheres com lesão ou diagnosticadas com câncer cervical em relação a mulheres com endocérvix normal também não foi observada significância estatística ($p=0,1330$; $\text{fold}= 2,65$) (FIGURA 8 (2)). Também em mulheres com algum tipo de lesão cervical em relação a mulheres com câncer, não houve diferença considerável na expressão de HOTAIR ($p=0,1464$; $\text{fold}=1,72$) (FIGURA 8 (3)). Além disso, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na expressão de HOTAIR mensurada em mulheres com lesão de baixo grau em relação a controles ($p=0,2086$; $\text{fold}=2,88$) (FIGURA 8 (4)); em mulheres com lesão de alto grau em relação a controles ($p=0,2343$; $\text{fold}= 2,62$) (FIGURA 8 (5)); em mulheres com lesão de alto grau em relação a mulheres com lesão de baixo grau ($p=0,2343$; $\text{fold}=0,91$) (FIGURA 8 (6)); em pacientes com

câncer em relação a controles ($p=0,6667$; $\text{fold}=1,67$) (FIGURA 8 (7)); em pacientes com lesão de baixo grau em relação a pacientes com câncer ($p=0,2667$; $\text{fold}=1,72$) (FIGURA 8 (8)); em pacientes com lesão de alto grau em relação a pacientes com câncer ($p=0,2619$; $\text{fold}=1,57$) (FIGURA 8 (9)).

FIGURA 8: EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO HOTAIR



Legenda: (1)-Análise entre controles e pacientes com lesão cervical (NIC 1+NIC 2+NIC 3); (2)- Análise entre pacientes com algum tipo de lesão cervical ou diagnosticadas com câncer cervical; (3)-Análise entre pacientes com lesão cervical (NIC 1+NIC 2+NIC 3) e pacientes diagnosticadas com câncer cervical; (4)- Análise entre controles e pacientes com lesão de baixo grau; (5)- Análise entre controles e pacientes com lesão de alto grau; (6)- Análise entre pacientes com lesão de baixo grau e pacientes com lesão de alto grau; (7)- Análise entre controles e pacientes com câncer cervical; (8)- Análise entre pacientes com câncer e

pacientes com lesão de baixo grau; (9)- Análise entre pacientes com câncer e pacientes com lesão de alto grau. Teste Mann Whitney. Fonte: A autora (2019).

O lncRNA PVT1 foi detectado em apenas uma paciente diagnosticada com câncer (Ct médio=35,490). Nas demais amostras o mesmo não foi detectado. Por isso, os dados não serão mostrados.

5. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) foi capaz de detectar partículas de tamanho médio correspondente ao tamanho esperado para exossomos. Igualmente importante foi a verificação de que não haviam diferenças significativas entre as concentrações e tamanhos de vesículas de controles e de pacientes com diferentes tipos de lesões. Como o NTA não consegue discernir entre vesículas individuais, agregados de vesículas e complexos proteicos de tamanhos similares, técnicas auxiliares são necessárias para dar suporte a caracterização. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permitiu a visualização de vesículas isoladas no plasma, além de evidenciar que a população de vesículas isoladas pode ser ligeiramente heterogênea quanto ao tamanho, embora a média e a mediana de distribuição das partículas vesiculares esteja em conformidade com o esperado para o isolamento de fração enriquecida com vesículas de menor tamanho tais como exossomos.

Diversos estudos preconizam a caracterização e análise funcional de vesículas e seus conteúdos, incluindo RNAs não codificantes, como meio de compreender a comunicação intercelular em diferentes contextos fisiopatológicos e estabelecer protocolos de usos desses compartimentos vesiculares no diagnóstico e acompanhamento do avanço de doenças, tais como cânceres já estabelecidos e lesões pré-cancerosas (BARILE, L.; VASSALLI, G., 2017; LÖTVALL et al., 2014).

No presente trabalho não foram encontradas diferenças no perfil de expressão do lncRNA HOTAIR entre mulheres com diferentes tipos de lesão cervical em relação a mulheres saudáveis ou comparando os tipos de lesão entre si, mulheres com alguma anormalidade cervical (seja lesão pré-cancerosa ou câncer cervical) em relação a controles, e entre mulheres com alguma lesão na endocérvix em relação a mulheres diagnosticadas com câncer cervical.

Estudos anteriores somente averiguaram o papel desse transcrito não codificador no contexto do câncer cervical e somente no nível do colo uterino, em análises com amostras de biópsias da endocérvix de pacientes (LIU, S.; ZHANG, M.; QU, P., 2016), vesículas isoladas de fluido cervicovaginal de pacientes (ZHANG, J. et al, 2016) e linhagens celulares de câncer cervical (KIM, H. J. et al., 2015). Nesses estudos foi verificado que ao menos em nível celular, o HOTAIR tende a atuar como oncogene, facilitando a proliferação celular, a transição epitélio mesenquimal, evitando a apoptose, entre outros mecanismos propostos (KIM, H. J. et al., 2015; GUO, X. et al, 2019). A expressão diferencial do HOTAIR não havia sido averiguada no sangue ou em vesículas extracelulares circulantes no sangue no contexto de lesões pré-cancerosas ou câncer cervical até o presente momento. Os resultados aqui encontrados indicam que o transcrito em questão talvez não seja relevante a nível sistêmico no contexto

fisiopatológico de lesões na endocérnix e sua progressão tumoral. Outra hipótese a ser considerada é a de que a sinalização mediada por vesículas circulantes no sangue seja somente uma sinalização secundária, e o HOTAIR seja majoritariamente transportado livre no sangue.

Estudos com maior número amostral são necessários para averiguar mais precisamente a expressão diferencial deste transcrito e verificar se as tendências descritas se mantêm. Além disso, é interessante destacar que os resultados obtidos podem não refletir precisamente a realidade devido a limitações de técnica. Nesse caso pode-se considerar que poucas vesículas provenientes de células da endocérnix e carreando o lncRNA HOTAIR, por exemplo, podem atingir a circulação e serem suficientemente relevantes para a patologia ou para resposta imune do organismo a lesões ou ao câncer, porém seu percentual reduzido dificulta seu rastreamento.

Já no caso do lncRNA PVT1, os resultados observados no presente trabalho demonstraram que talvez o mesmo não seja carregado em quantidades significativas em vesículas extracelulares isoladas do plasma de pacientes com diferentes tipos de anormalidades cervicais (lesão ou câncer cervical) ou de mulheres saudáveis. Pode-se hipotetizar que os dados obtidos talvez reflitam uma falha de técnica, principalmente em relação aos *primers*, porém os mesmos foram testados com amostras de cDNA transcrito a partir de RNA isolado de sangue de indivíduos controles do painel do laboratório e tiveram sua especificidade e eficiência confirmadas. Interessantemente, no contexto de lesões pré-cancerosas no colo do útero, esse transcrito já foi descrito como possível marcador isolado livre no soro (YANG, J. P. et al., 2016). Estudos anteriores descrevem o PVT1 como relevante para proliferação celular e para evitar apoptose no contexto do câncer cervical (CHANG, Q.-Q. et al, 2019; WANG, C. et al, 2019). Estudos anteriores ainda demonstraram que o transcrito é passível de carregamento em vesículas em outros contextos fisiopatológicos, tais como no carcinoma seroso de alto grau originário do ovário (FILIPPOV-LEVY, N. et al, 2018). Pode-se hipotetizar, portanto, que talvez esse transcrito seja relevante fisiopatologicamente para lesões da endocérnix e sua possível progressão tumoral, porém não é majoritariamente carregado em vesículas extracelulares e sim transportado livre no sangue, como meio de sinalização menos específica e dispendiosa para as células secretoras.

Principalmente em pesquisas relacionadas ao câncer, biomarcadores podem ser padrões diferenciais genéticos, epigenéticos ou de proteínas. Podem ainda ser definidos como formas alternativas de monitoramento de processos fisiopatológicos, sendo que no caso do câncer podem representar moléculas encontradas em células malignas ou secretadas pelas mesmas, ou então moléculas que fazem parte da resposta do organismo ao início do desenvolvimento tumoral ou ao tumor já estabelecido (KUMAR, S.; MOHAN, A.; GULERIA, R., et al, 2006). Diante dos resultados do presente trabalho, pode-se sugerir que em trabalhos

futuros sejam testados também os padrões diferenciais de expressão de RNAs não codificadores relacionados a resposta do organismo a presença de diferentes tipos de lesão pré-cancerígena e ao câncer *in situ*.

REFERÊNCIAS

- ABELS, E. R.; BREAKEFIELD, X. O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. **Cellular and molecular neurobiology**. V.36, n.3, p.301-312, 2016.
- ABRAMI, L., et al. Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. **Cell Rep**, 2013.
- ANDALOUSSI, S. et al. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews. Drug Discovery**.V.12, p.347–357, 2013.
- ASHRAFI, G. H. et al. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. **International journal of cancer**, v. 119, n. 9, p. 2105-2112, 2006.
- BARILE, L.; VASSALLI, G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. **Pharmacology & therapeutics**. V. 174, p. 63-78, 2017.
- BARILLARI, G. et al. The impact of human papilloma viruses, matrix metallo-proteinases and HIV protease inhibitors on the onset and progression of uterine cervix epithelial tumors: A review of preclinical and clinical studies. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1418, 2018.
- BARROW-LAING, L.; CHEN, W.; ROMAN, A. Low-and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. **Virology**, v. 400, n. 2, p. 233-239, 2010.
- BAKER, C. C. et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **Journal of virology**, v. 61, n. 4, p. 962-971, 1987.
- BATAGOV, A.O., KUROCHKIN, I.V. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'- untranslated regions. **Biol Direct**. 2013.
- BERTI, F. C. B., et al. From squamous intraepithelial lesions to cervical cancer: Circulating microRNAs as potential biomarkers in cervical carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 2019.
- BLYTHE, A. J.; FOX, A. H.; BOND, C. S. The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**. V.1859, n.1, p.46-58, 2016.
- BRAVO, I. G.; DE SANJOSÉ, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432-438, 2010.
- BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, medicine, and public health**, v. 2015, n. 1, p. 32-51, 2015.

BIBBO, M. et al. DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. **American journal of clinical pathology**, v. 92, n. 3, p. 261-265, 1989.

CAI, X. et al. Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication. **Journal of virology**, v. 80, n. 21, p. 10890-10893, 2006.

CARPENTER, S. Long noncoding RNA: novel links between gene expression and innate immunity. **Virus research**, v. 212, p. 137-145, 2016.

CERASE, A. et al. Xist localization and function: new insights from multiple levels. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 166, 2015.

CESANA, M. et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. **Cell**. V.147, p.358–369, 2011.

CHANG, Q.-Q. et al. LncRNA PVT1 promotes proliferation and invasion through enhancing Smad3 expression by sponging miR-140-5p in cervical cancer. **Radiology and Oncology**, 2019.

CHOUDHURI, K., LLODRA, J., ROTH, E. W., TSAI, J., GORDO, S., WUCHERPFENNIG, K. W., ... DUSTIN, M. L. Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. **Nature**. V. 507, p.118–123, 2014.

CIESLA, J. Metabolic enzymes that bind RNA: yet another level of cellular regulatory network? **Acta Biochim. Pol.** V. 53, p.11–32, 2006.

CLAYTON, A., HARRIS, C. L., COURT, J., MASON, M. D., & MORGAN, B. P. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. **European Journal of Immunology**. V. 33, p.522–531, 2003.

COLOMBO, M., MOITA, C., VAN NIEL, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **J Cell Sci**. v.126, p.5553–5565, 2013.

COX, J. T. et al. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 188, n. 6, p. 1406-1412, 2003.

CRUZ, J.A.; WESTHOF, E. The dynamic landscapes of RNA architecture. **Cell**. V.136, p.604–609, 2009.

DA ROCHA, S. T.; HEARD, E. Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. **Nature structural & molecular biology**, v. 24, n. 3, p. 197, 2017.

DAVEY, D. D. et al. Bethesda 2001 implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 128, n. 11, p. 1224-1229, 2004.

DENNY, L. Cervical cancer: prevention and treatment, **Discov. Med**, v.14, p. 125–131. 2012.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. 55-70, 2012.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, p. 2-23, 2015.

DURET, L., CHUREAU, C., SAMAIN, S., WEISSENBACH, J. & AVNER, P. The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. **Science**. V.312, p.1653–1655, 2006.

FAGHIHI, M. A. et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feedforward regulation of β -secretase. **Nature Med**. V.14, p.723–730, 2008.

FAGHIHI, M.A., ZHANG, M., HUANG, J., MODARRESI, F., VAN DER BRUG, M.P., NALLS, M.A., COOKSON, M.R., ST LAURENT, 3RD, G., WAHLESTEDT, C. Evidence for natural antisense transcript mediated inhibition of microRNA function. **Genome Biol**. V.11, R56, 2010.

FEIGENBERG, T. et al. Expression of the h19 oncofetal gene in premalignant lesions of cervical cancer: a potential targeting approach for development of nonsurgical treatment of high-risk lesions. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2013, 2013.

FILIPPOV-LEVY, N. et al. Expression and clinical role of long non-coding RNA in high-grade serous carcinoma. **Gynecologic oncology**, v. 148, n.3, p.559-566, 2018.

FRÜHBEIS, C., FRÖHLICH, D., KRÄMER-ALBERS, E.M. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. **Front Physiol**. V.3, p.119, 2012.

GAN, X.; GOULD, S.J. Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins. **Mol Biol Cell**, v, 22, n.6, p.817-830, 2011.

GAO, Y.-L. et al. Long Noncoding RNA PVT1 Facilitates Cervical Cancer Progression via Negative Regulating of miR-424. **Oncology research**, v. 25, n. 8, p. 1391-1398, 2017.

GEISLER, S.; COLLIER, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. **Nature reviews Molecular cell biology**. V.14, n.11, p.699, 2013.

GRANT, B.D., DONALDSON, J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** V.10, p.597–608, 2009.

GUO, X. et al. Long noncoding RNA HOTAIR knockdown inhibits autophagy and epithelial–mesenchymal transition through the Wnt signaling pathway in radioresistant human cervical cancer HeLa cells. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n.4, p.3478-3489, 2019.

GOTTSCHLING, M. et al. Quantifying the phylodynamic forces driving papillomavirus evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 7, p. 2101-2113, 2011.

GUPTA, R.A., et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature.** V.464, p.1071–1076, 2010.

GUTTMAN, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature.** V.458, p.223–227, 2009.

GYÖRGY, B., SZABÓ, T.G., PÁSZTÓI, M., et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci.** V.68, p.2667–2688, 2011.

HASEGAWA, Y., BROCKDORFF, N., KAWANO, S., TSUTUI, K.; NAKAGAWA, S. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. **Dev. Cell.** V.19, p.469–476, 2010.

HE, X., et al. The long non-coding RNA HOTAIR is upregulated in endometrial carcinoma and correlates with poor prognosis. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 2, p.325–332, 2014.

HENNE, W.M.; N.J. BUCHKOVICH; S.D. EMR. The ESCRT pathway. **Dev Cell**, v. 21, n.1, p. 77-91, 2011.

HENNE, W.M., STENMARK, H., EMR, S.D. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. **Cold Spring Harb Perspect Med.** V.5, n.9, a016766, 2013.

HENDERSON, M.C., AZORSA, D.O. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. **Front Oncol.** V. 2, n. 38, 2012.

HERFS, M. et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10516-10521, 2012.

HERRERO, R., CASTLE, P.E., SCHIFFMAN, M. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. **J Infect Dis**, v. 191, p.1796–807, 2005.

HOGAN, D.J., RIORDAN, D.P., GERBER, A.P., HERSCHLAG, D.; BROWN, P.O. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. **PLoS Biol.** V.6, e.255, 2008.

HOSSEINI, E. S., et al. Dysregulated expression of long noncoding RNAs in gynecologic cancers. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 107, 2017.

HONEGGER, A. et al. Silencing of human papillomavirus (HPV) E6/E7 oncogene expression affects both the contents and the amounts of extracellular microvesicles released from HPV-positive cancer cells. **International journal of cancer**, v. 133, n. 7, p. 1631-1642, 2013.

HUNDLEY, H. A.; BASS, B. L. ADAR editing in doublestranded UTRs and other noncoding RNA sequences. **Trends Biochem. Sci.** v.35, p.377–383, 2010.

JACOBSON, D. L. et al. Cervical ectopy and the transformation zone measured by computerized planimetry in adolescents. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 66, n. 1, p. 7-17, 1999.

JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. History, discovery, and classification of lncRNAs. In: **Long Non Coding RNA Biology**. Springer, Singapore, p. 1-46, 2017.

JEON, Y.; LEE, J.T. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. **Cell**. V.146, p.119–133, 2011.

JOHNSSON, P., et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. V.1840, n.3, p.1063-1071, 2014.

JOHNSSON, P., et al. A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. **Nat. Struct. Mol. Biol.** V.20, n.4, p. 440-446, 2013.

JONES, D. L.; ALANI, R. M.; MUNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes Dev**, v.11, p.2101–2111, 1997.

KATZMANN, D. J., STEFAN, C. J., BABST, M.; EMR, S. D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. **The Journal of Cell Biology**. V.162, p.413–423, 2003.

KADAJA, M. et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000397, 2009.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 393-407, 2018.

KIM, H.J., et al. Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. **Int J Oncol**, v. 46, n.2, p.521-530, 2015.

KUGEL, J. F.; GOODRICH, J. A. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. **Trends Biochem. Sci.** V.37, p.144–151, 2012.

KUMAR, S.; MOHAN, A.; GULERIA, R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. **Biomarkers**, v.11, n.5, p.385-405, 2006.

LAI, F. et al. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. **Nature**. V.494, p.497–501, 2013.

LAULAGNIER, K., MOTTA, C., HAMDY, S., ROY, S., FAUVELLE, F., PAGEAUX, J. F., RECORD, M. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. **The Biochemical Journal**. v.380, p.161–171, 2004.

LAZARCZYK, M. et al. Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. **J Exp Med**, v. 205, p.35–42, 2008.

LIU, J. et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 1, p. 758-773, 2014.

LIU, M. et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes cervical cancer progression through regulating BCL2 via targeting miR-143-3p. **Cancer biology & therapy**, v. 19, n. 5, p. 391-399, 2018.

LIU, S.; ZHANG, M.; QU, P. Expression level and clinical significance of HOX transcript antisense intergenic RNA in cervical cancer: a meta-analysis. **Scientific reports**, v. 6, p. 38047, 2016.

LIU, S., et al. MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 1, p.633-640, 2015.

LIU, S., et al. MiR-375 is epigenetically downregulated by HPV-16 E6 mediated DNMT1 upregulation and modulates EMT of cervical cancer cells by suppressing lncRNA MALAT1. **PloS one**, v. 11, n. 9, e0163460, 2016.

LI, Q. et al. HOTAIR contributes to cell proliferation and metastasis of cervical cancer via targeting miR-23b/MAPK1 axis. **Bioscience reports**, 2018.

LI, Y., SYED, J.; SUGIYAMA, H. RNA-DNA triplex formation by long noncoding RNAs. **Cell Chem. Biol.** V.23, p.1325–1333, 2016.

LIU, Q., ROJAS-CANALES, D. M., DIVITO, S. J., SHUFESKY, W. J., STOLZ, D. B., ERDOS, G., ...MORELLI, A.E. Donor dendritic cell-derived exosomes promote allograft-targeting immune response. **The Journal of Clinical Investigation**. V.126, p.2805–2820, 2016.

LLORENTE, A., SKOTLAND, T., SYLVANNE, T., KAUFMAN, D., ROG, T., ORLOWSKI, A., ...SANDVIG, K. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1831, p.1302–1309, 2013.

LÖTVALL, J., HILL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DI VIZIO, D., GARDINER, C., ...& SAHOO, S. 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. 1, p. 1–6, 2014.

MARCILLA, A., TRELIS, M., CORTÉS, A. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. **PLoS One**. V.7, n.9, e.45974, 2012.

MAASS, P.G. et al. Long non-coding RNA in health and disease. **J. Mol. Med.** V.92, p.337–346, 2014.

MARQUES, A. C.; PONTING, C. P. Intergenic lncRNAs and the evolution of gene expression. **Current opinion in genetics & development**, v. 27, p. 48-53, 2014.

MBOUMBA BOUASSA, R.-S. et al. Cervical cancer in sub-Saharan Africa: a preventable noncommunicable disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 6, p. 613-627, 2017.

MCCULLOUGH, J., FISHER, R.D., WHITBY, F.G., et al. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v.105, p.7687–7691, 2008.

MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. **Nature Structural and Molecular Biology**. V.20, n.3, p.300, 2013.

MOODY, C.A., LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. **PLoS Pathog** , v. 5, e1000605, 2009.

MOODY, C.A.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550, 2010.

MORELLI, A. E., LARREGINA, A. T., SHUFESKY, W. J., SULLIVAN, M. L., STOLZ, D. B., PAPWORTH, G.D., ... THOMSON, A. W. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**. V.104, p.3257–3266, 2004.

NAKAYAMA, M. Antigen presentation by MHC-dressed cells. **Frontiers in Immunology**. V. 5, p.672, 2015.

NGUYEN, H. P.; RAMÍREZ-FORT, M. K.; RADY, P. L. The biology of human papillomaviruses. In: **Human Papillomavirus**. Karger Publishers, p. 19-32, 2014.

OUYANG, J.; HU, J.; CHEN, J-L. lncRNAs regulate the innate immune response to viral infection. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 1, p. 129-143, 2016.

OSTÖR, A. G. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **International journal of gynecological pathology**: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists, v. 12, n. 2, p. 186-192, 1993.

ØROM, U. A. et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. **Cell**.V.143, p.46–58, 2010.

ORUMAA, M., LEINONEN, M.K., CAMPBELL, S., MØLLER, B., MYKLEBUST, T.A., NYGÅRD, M. Recent increase in incidence of cervical precancerous lesions in Norway: nationwide study from 1992 to 2016. **Internacional Journal of Cancer**, 2019.

PANT, S., HILTON, H., BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochemical Pharmacology**. V.83, p.1484–1494, 2012.

PFISTER, H.; FUCHS, P. G. Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins. In: **Papillomaviruses and human disease**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-18, 1987.

POLISENO, L.; SALMENA, L.; ZHANG, J.; CARVER, B.; HAVEMAN, W.J.; PANDOLFI, P.P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature**. v.465, p.1033–1038, 2010.

QIN, S. et al. Identifying Molecular Markers of Cervical Cancer Based on Competing Endogenous RNA Network Analysis. **Gynecologic and obstetric investigation**, p.1-10, 2019.

QIU, J.-J., et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 134, n. 1, p.121–128, 2014.

QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 47, 2016.

RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, 7237, p. 445-52, 2009.

RAPOSO, G., STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**.v.200, n.4, p.373–383, 2013.

REGEV-RUDZKI, N., et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**, v. 153, n. 5, p. 1120-1133, 2013.

REVENFELD, A. L., BAEK, R., NIELSEN, M. H., STENSALLE, A., VARMING, K., JORGENSEN, M. Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in

peripheral blood.
Clinical Therapeutics. V.36, p.830–846, 2014.

RICHART, R. M. An assessment of the biology of cervical intraepithelial neoplasia. In: **7th Int. Cancer Conf. Proc.**, Philadelphia, Lippincott, p. 219-222, 1972.

ROBBINS, P. D.; DORRONSORO, A.; BOOKER, C. N. Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. **The Journal of clinical investigation**. V.126, n.4, p.1173-1180, 2016.

RINN, J. L. et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1311-1323, 2007.

SALMENA, L.; POLISENO, L.; TAY, Y.; KATS, L.; PANDOLFI, P.P. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? **Cell**. v.146, p.353–358, 2011.

SALVIANO-SILVA, A., et al. Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. **Non-coding RNA**, v. 4, n. 1, p. 3, 2018.

SASAKI, Y. T. F., IDEUE, T., SANO, M., MITUYAMA, T.; HIROSE, T. MEN ϵ / β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.106, p.2525–2530, 2009.

SHARMA, S. et al. Bridging links between long noncoding RNA HOTAIR and HPV oncoprotein E7 in cervical cancer pathogenesis. **Scientific reports**, v. 5, p. 11724, 2015.

SHEN, C.-J.; CHENG, Y.-M.; WANG, C.-L. LncRNA PVT1 epigenetically silences miR-195 and modulates EMT and chemoresistance in cervical cancer cells. **Journal of drug targeting**, v. 25, n. 7, p. 637-644, 2017.

SHENG, X., et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. **Oncol Rep.**, v. 32, n. 1, p. 277–285, 2014.

SHIN, M. K.; BALSITIS, S., BRAKE, T.; LAMBERT, P. F. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 69, p. 5656–5663, 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. **Current Opinion in Cell Biology**. V.21, p.575–581, 2009.

SMITH, J.S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **Int J Cancer**, v.121, p.621–32, 2007.

SPITALE, R. C., TSAI, M.-C.;CHANG, H. Y. RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. **Epigenetics**. V.6, p.539–543, 2011.

SUN, N.-X., et al. Long noncoding RNA-EBIC promotes tumor cell invasion by binding to EZH2 and repressing E-cadherin in cervical cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 7, e100340, 2014.

SUNWOO, H. et al. MEN ϵ/β nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. **Genome Res**. V.19, p.347–359, 2009.

STEINBECK, R. G. Proliferation and DNA aneuploidy in mild dysplasia imply early steps of cervical carcinogenesis. **Acta oncologica**, v. 36, n. 1, p. 3-12, 1997.

THÉRY, C., ZITVOGEL, L., AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol**. V.2, p.569–579, 2002.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TYLER, K. N.; NATHANSON, N. Pathogenesis of viral infections. **Fields virology**, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa, p. 199-244, 2001.

WANG, K. C. et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. **Nature**, v. 472, n. 7341, p. 120, 2011.

WANG, J. et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. **Nucleic Acids Res**. V.38, p.5366–5383, 2010.

WANG, J. et al. Combined detection of serum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma. **Medical oncology**, v. 31, n.9, p.148, 2014.

WANG, M. et al. The functional roles of exosomal long non-coding RNAs in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-18, 2019.

WANG, X. et al. LncRNA PVT1 promotes the growth of HPV positive and negative cervical squamous cell carcinoma by inhibiting TGF- β 1. **Cancer cell international**, v. 18, n. 1, p. 70, 2018.

WANG, C. et al. Long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 gene promotes the development of cervical cancer via the NF- κ B pathway. **Molecular medicine reports**, v. 20, n.3, p. 2433-2440, 2019.

WHO, Cervical Cancer, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis/screening/cervical-cancer/en/>>. Acessado em: 11 de out de 2019.

WIGHT, M.; WERNER, A. The functions of natural antisense transcripts. **Essays in biochemistry**. V.54, p.91-101, 2013.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n. 1, p.11, 2007.

WUTZ, A., RASMUSSEN, T.P.; JAENISCH, R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. **Nat. Genet.** V.30, p.167–174, 2002.

YANG, J. P. et al. Long noncoding RNA PVT1 as a novel serum biomarker for detection of cervical cancer. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 19, p. 3980-3986, 2016.

YIN, Q.-F. et al. Long noncoding RNAs with snoRNA ends. **Mol. Cell**. V.48, p.219–230, 2012.

YU, X.; RILEY, T.; LEVINE, A.J. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. **FEBS J**, v. 276, n. 8, p. 2201-12, 2009.

ZHANG, B; CHEN, W; ROMAN, A. The E7 proteins of low-and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 2, p. 437-442, 2006.

ZHANG, J. et al. Exosomal Long Noncoding RNA s are Differentially Expressed in the Cervicovaginal Lavage Samples of Cervical Cancer Patients. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 30, n. 6, p. 1116-1121, 2016.

ZHANG, S.; ZHANG, G.; LIU, J. Long noncoding RNA PVT1 promotes cervical cancer progression through epigenetically silencing miR-200b. **Apmis**, v. 124, n. 8, p. 649-658, 2016.

ZHANG, Y. et al. Long non-coding RNA HOTAIR and STAT3 synergistically regulate the cervical cancer cell migration and invasion. **Chemico-biological interactions**, v. 286, p. 106-110, 2018.

ANEXO 1- ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA

O kit *Exosome Isolation Reagent from plasma* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) foi utilizado segundo o protocolo:

- 1- As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 a 20 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo de 1,5 ml.
- 2- Foram adicionados 0,5 do volume de PBS 1x (a fim de compensar as diferenças de densidade do plasma) e o conteúdo homogeneizado.
- 3- As amostras foram tratadas com 0,05 do volume do plasma de proteinase K, seguido de incubação a 37°C por 10 minutos.
- 4- Após a incubação, foram adicionados 0,2 volumes de reagente de precipitação, considerando o plasma em conjunto com o PBS como volume final. Após centrifugação rápida, as amostras foram deixadas overnight na geladeira, de 2°C a 8°C.

ANEXO 2- EXTRAÇÃO DE RNA VESICULAR

O kit *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion, Austin, EUA) e fenol:clorofórmio foram utilizados segundo o protocolo:

- 1- Primeiramente foi adicionado as amostras 300uL de Lysis/Binding Buffer e a solução foi homogeneizada até dissolver o pellet de vesículas completamente.
- 2- Depois, foram adicionados 0,75 µl do *spike in* da Qiagen cel-miR-39, um RNA sintético que atua como controle exógeno da reação de PCR para averiguação da qualidade de extração de RNA vesicular.
- 3- Foram acrescentados 30 µl de miRNA Homogenate Additive em cada amostra e as mesmas homogeneizadas e incubadas em gelo por 10 minutos.
- 4- Posteriormente foi adicionado 600 µl de Ácido-Fenol: Clorofórmio, agente químico que auxilia na inativação de proteínas e na precipitação de moléculas orgânicas em geral, seguido de homogeneização até dissolução dos precipitados e centrifugação de 5 minutos a 10.000 x g para separação de fases orgânica e aquosa.
- 5- A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nestes são acrescentados 1/3 do volume de etanol 100% e a solução é homogeneizada antes de ser transferida para um novo tubo com coluna com filtro.
- 6- Após uma centrifugação de 15 segundos a 1 minuto a 10.000 x g, o RNA longo fica retido na coluna com filtro coletor e os pequenos RNAs se misturam a algum volume de etanol no filtrado.
- 7- Ao volume de pequenos RNAs é adicionado mais 2/3 de volume de etanol 100% e a solução foi transferida para outro tubo coletor com coluna e após uma centrifugação de 15 segundos a 1 minuto a 10.000 x g, o RNA curto fica retido no filtro da coluna.
- 8- Nas duas colunas foram adicionados 300 µl de miRNA Wash Solution 1 e foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 segundos a 1 minuto seguida de descarte do filtrado, logo depois foram adicionados 400 µl de miRNA Wash Solution 2/3 e foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 segundos a 1 minuto seguida de descarte do filtrado e por fim foram adicionados mais 400 µl de miRNA Wash Solution 2/3 na coluna e foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 15 segundos a 1 minuto também seguida de descarte do filtrado. Uma última centrifugação de 1 minuto foi realizada a fim de secar o remanescente do etanol e das soluções de lavagem.
- 9- Na etapa de eluição, as colunas são transferidas para novos tubos identificados e são adicionados 50 µl de solução de eluição previamente aquecida a 95°C seguida de centrifugação de 30 segundos, sendo que este procedimento é repetido duas vezes.
- 10- O RNA isolado foi acondicionado no freezer -80°C.

ANEXO 3- PREPARAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

- 1- Foi realizado o isolamento de vesículas extracelulares das amostras de plasma conforme o protocolo definido previamente para o kit *Exosome Isolation Reagent from plasma* (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA).
- 2- O pellet de vesículas isoladas foi ressuspendido em 10 μ l de PBS.
- 3- Posteriormente, 4 μ l das vesículas ressuspendidas são adicionados a 22,5 μ l de paraformaldeído 4%.
- 4- Depois 8 μ l dessa solução foram transferidos para o lado brilhante da micrograde circular;
- 5- Após 2 minutos de espera, o remanescente do líquido foi removido encostando a grade suavemente em papel filtro.
- 6- A fim de fixar o material na grade, foram adicionados 8 μ l de acetato de uracila 2% no lado brilhante da mesma;
- 7- Após 1 minuto de espera, o remanescente do fixador foi removido encostando a grade suavemente em papel filtro;
- 8- Posteriormente, a fim de realizar uma última lavagem antes da visualização da grade, foi colocado 200 μ l de água destilada sobre um pedaço de parafilme e a grade foi posicionada com o lado não brilhante voltado sobre a gota de água formada, depois de 1 minuto foi retirado o restante do líquido encostando a micrograde suavemente em papel filtro;
- 9- Por fim, a grade foi armazenada para visualização ao microscópio em local seco e previamente identificado.

ANEXO 4- PREPARAÇÃO PARA WESTERN BLOOT

- 1- As amostras de vesículas isoladas foram centrifugadas para separação das vesículas e do plasma depletado e acondicionamento em microtubos separados;
- 2- Em ambos foi adicionada solução de lise celular composta de 50mM de tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% triton X 100, pH 7,4 e inibidores de proteases como 1mM PMSF, 1mM fenantrolina, 1mM N-etilmaleimida (NEM) e 5mM EDTA e os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g para separação do sobrenadante com proteínas vesiculares as quais tiveram suas concentrações mensuradas por coloração de Bradford.
- 3- 80 microgramas de proteínas de cada microtubo foram misturadas com tampão de amostra 2,5 x e as soluções foram inseridas individualmente em poços de um gel de acrilamida SDS- PAGE 12% e foi realizada uma corrida eletroforética com miliamperagem em torno de 15-25 mA e voltagem em torno de 150V a fim de separar as proteínas por tamanho e criar uma superfície de transferência.
- 4- A transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose foi realizada colocando-se o gel de poliácridamida em contato com a membrana, sendo tudo cercado por gelo e tampão de transferência gelado composto de 48 mM de trisbase; 39 mM de glicina; 0,037% (p/v) de SDS; 20% de metanol (v/v) em pH 8,3 e sob condições de agitação eletromagnética a 100 volts e miliamperagem de até 220mA durante 1 hora.
- 5- A presença de proteínas na membrana foi verificada com o corante Ponceau 0,2% (p/v) e posteriormente a mesma foi lavada com solução de tampão salino TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) 0,05% (v/v).
- 6- A membrana foi bloqueada, a fim de impedir a perda das proteínas durante as etapas posteriores, durante 1 hora utilizando-se um preparado de leite Molico em pó solubilizado com TBST 0,05% (v/v).
- 7- A membrana foi incubada overnight com anticorpos primários anti-CD63 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), anti-TSG101 (Thermo Scientific, EUA), anti-CD9 e anti-AGO2 (Biolegend, San Diego, EUA) diluídos de 1 para 4000 com leite Molico em pó solubilizado com TBST 0,05% (v/v).
- 8- Depois a membrana foi incubada durante uma hora com anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha), diluído de 1 para 5000.
- 9- A etapa de revelação prosseguiu em uma sala escura para que o reagente quimioluminescente do kit West Pico (Thermo Scientific, EUA) pudesse ser adicionado sob a membrana e esta exposta a um filme de auto-radiograma Carestream Medical X-ray Green/MXG Film (Carestream Health, EUA) durante tempos limitados até que as

bandas de interesse pudessem ser visualizadas e depois o filme foi lavado e fixado para melhorar a definição de visualização.