



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

Análise proteômica e identificação de RNAs longos não codificantes em exossomos de plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Pizzatti

**RIO JANEIRO
2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

Análise proteômica e identificação de RNAs longos não codificantes em exossomos de plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Pizzatti

**RIO DE JANEIRO
2015**

R114a Ribeiro, Priscila Rafaela.

Análise proteômica e identificação de RNAs longos não codificantes em exossomos de plasma de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica / Priscila Rafaela Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2015.
115 f. il.: color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

Orientador: Dra. Luciana Pizzatti.

1. Exossomos. 2. Proteômica. 3. Leucemia Mielogênica Crônica. 4. Transdução de Sinal. 5. RNA Longo Não Codificante. I. Pizzatti, Luciana. (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99419



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PRISCILA RAFAELA RIBEIRO

**ANÁLISE PROTEÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DE RNAS LONGOS NÃO
CODIFICANTES EM EXOSSOMOS DE PLASMA DE MEDULA ÓSSEA DE
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Luciana Pizzatti

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino- **Presidente**
Prof. Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan
Prof. Dr. Anderson Pinheiro
Prof. Dra. Teresa Fernandez– Suplente I
Prof. Dr. André Mencalha – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2015**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

ANÁLISE PROTEÔMICA E IDENTIFICAÇÃO DE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES EM EXOSSOMOS DE PLASMA DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

RESUMO

Priscila Rafaela Ribeiro

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa ocasionada pela translocação recíproca entre o oncogene ABL 1, localizado no cromossomo 9, com o gene BCR, localizado no cromossomo 22 [t(9;22)], originando um novo cromossomo, denominado Philadelphia. A proteína quimérica da translocação BCR-ABL possui atividade tirosino-quinase aumentada e anormal. Apesar da contribuição indubitável da proteína BCR-ABL, alguns estudos já evidenciaram que as células-tronco leucêmicas podem ser independente de BCR-ABL para sobreviver, indicando que alguns fatores presentes no microambiente tumoral, como as microvesículas e exossomos, podem sustentar as células-tronco leucêmicas (LSCs). Os exossomos, também denominados de nanovesículas, possuem de 40 a 100nm de diâmetro, são responsáveis pela comunicação intercelular e tem ganhado atenção nos últimos anos, devido a grande quantidade de moléculas e substâncias que podem transportar de uma célula a outra, ativando importantes vias de sinalização. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi purificar os exossomos do plasma de medula óssea de pacientes com LMC em fase crônica da doença ao diagnóstico, caracterizar o perfil imunofenotípico, realizar uma análise proteômica *Label Free* para identificar o perfil proteômico e identificar os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) presente no interior destes exossomos. Foram identificadas 341 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com LMC e doadores, e a proteína BOC, receptor da via de Hedgehog (Hh), estava aumentada na amostra dos pacientes. O perfil imunofenotípico revelou que os exossomos foram purificados com sucesso e que, provavelmente, estavam sendo secretados pelas células mesenquimais, megacariócitos e granulócitos no microambiente da medula, uma vez que houve aumento da diferença de média de intensidade de fluorescência (dMIF) para as tetraspaninas consideradas marcadoras destas populações celulares, respectivamente (CD105, CD61 e CD65). Em relação ao lncRNAs, ANTINOS2A, RoR, SFMBT2 e VLDLR apresentaram reprodutibilidade dos dados em amostras dos doadores, estando ausentes nos pacientes. Neste grupo somente o lncRNA HOTAIR apresentou-se diferencialmente expresso com um *fold-change* de 13,24. Nossos dados permitem inferir que os exossomos presentes no plasma de pacientes com LMC são capazes de carrear conteúdo molecular, de ativar a via de Hh e, assim, favorecer a leucemogênese no início da LMC.

Palavras chaves: exossomos, análise proteômica, leucemia mielóide crônica, vias de sinalização, RNAs longos não codificantes.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**PROTEOMIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF LONG NONCODING RNAs
IN BONE MARROWS' PLASMA EXOSOMES OF PATIENTS WITH CHRONIC
MYELOID LEUKEMIA**

ABSTRACT

Priscila Rafaela Ribeiro

The Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease caused by the reciprocal translocation between the ABL oncogene 1, located in chromosome 9, with the BCR gene, located in chromosome 22 [t(9;22)], creating a new chromosome called Philadelphia. The chimeric protein of BCR-ABL translocation has tyrosine-kinase activity increased and abnormal. Despite the undoubted contribution of the BCR-ABL protein, some studies already showed how leukemic stem cells can be BCR-ABL independent survive for indicating that some factors in the tumor microenvironment, as microvesicles and exosomes, can sustain the leukemic stem cells (LSC). Exosomes also called nanovesicles, have 40-100 nm diameter, are responsible for intercellular communication and it gained attention in recent years, due to the large amount of molecules and substances that may transport in cell to cell, activating important signaling pathways. Thus, the aim of this study was to purify exosomes of bone marrows' plasma of patients with CML in chronic disease stage at diagnosis, characterize the profile immunophenotypic, perform a proteomic analysis Label free to identify the profile proteomic and identify the long noncoding RNA's present within these exosomes. We identified 341 differentially expressed proteins between donors and patients with CML, and BOC protein receptor of the Hedgehog pathway (Hh) was increased in the sample patients. Profile Immunophenotypic revealed that exosomes were purified with success, and were probably being secreted for mesenchymal cells, megakaryocytes and granulocytes in the bone marrow microenvironment, since there was increased difference of mean intensity fluorescence (dMIF) for the considered tetraspanins these markers cells populations, respectively (CD105, CD61 and CD65). lncRNAs, ANTI-OS2A, RoR, SFMBT2 and VLDLR showed reproducibility of data in donor samples and for the other hand, it was absent in patients samples. In this group only lncRNA HOTAIR shows differential expression with 13.24 fold-change. Our data allows inferring that these exosomes of patients's plasma with CML are capable of carrying molecular content, enabling a way of Hh and thus favoring leukemogenesis in the beginning of CML.

Key words: exosomes, proteomic analyses, chronic myeloid leukemia, signaling pathways, long noncoding RNA's

AGRADECIMENTOS

Apesar de ter consciência de que este é, ao mesmo tempo, um pequeno-grande passo, e que ainda há muito pela frente, não poderia deixar de agradecer a tudo e todos que me ajudaram de certa forma a chegar até aqui.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Dra. Eliana Abdelhay pela oportunidade de ingressar no Instituto Nacional de Câncer. De fato, estar aqui era um sonho que se tornou realidade, e eu agradeço a ela por ter me dado a chance de começar a carreira na pesquisa oncológica aqui. Muito obrigada!

A minha orientadora, Dra. Luciana Pizzatti, por ter passado parte de sua experiência em proteômica e por tudo que me passou quando o pôde fazer. Obrigada.

A Dra Luíze Lima, que me acompanhou durante o aperfeiçoamento I, e sempre se colocou disposta a transmitir seus conhecimentos. Obrigada pela disponibilidade e por tudo!

A MSc. Gabriela Lemos, por toda ajuda e transmissão de conhecimentos também durante o AP I. Não poderia esquecer dela; muito obrigada Gabi!

A toda a equipe do laboratório de células tronco do Centro de transplante de medula óssea (CEMO) do INCA, pelo apoio enquanto o puderam fazer, principalmente na fase final do projeto. Em especial, agradeço ao Gerson, ao Bruno e a Sthephany; obrigada!

A Dra. Ilana e Dra. Rocio, chefes dos os laboratórios de Biologia Molecular e de Oncovirologia do CEMO. Obrigada por terem permitido que utilizássemos parte da infraestrutura de vocês, foi de grande valia! Em especial, agradeço a Simone e a Vanessa, vocês foram demais!

Ao Dr. Jose Morgado e a equipe de seu laboratório de Biologia Celular e estrutural, pela colaboração no projeto. Em especial, gostaria de agradecer a Priscila, que foi super solícita e me ajudou muito nesta etapa do trabalho.

Aos demais professores e pesquisadores, Dras. Beatriz de Camargo, Sheila Coelho e Mariana Emerenciano, que me ajudaram e contribuíram com seus conhecimentos, principalmente nesta reta final: Muito obrigada pela disponibilidade dedicada!

Por fim, e com toda certeza, não menos importante, gostaria de agradecer àqueles que sempre me cercaram de carinho, força e amor. Aos que sempre me apoiaram e que dão mais sentido a toda a minha vida pessoal e profissional:

- meus pais Eva e Ilário, por **todo** amor, dedicação, ligações, orações e apoio. Eu tenho orgulho infinito de ser membro da família que vocês começaram. Amo vocês incondicionalmente;

- meus irmãos Fabíola, Raquel e Crhistian, por existirem! Por me dar a graça de lembrar de vocês, das bobearias, e com esse amor verdadeiro ter forças para seguir em frente. Vocês são meus lindinhos, amo muito! Obrigada;

- meus tios, em especial Tia Leninha e Tio Carlinhos, por vibrarem com cada conquista, com uma simples ida a algum congresso (rsrs), por tornarem minhas pequenas vitórias mais valiosas pra mim do que pareceriam anteriormente. Obrigada por serem tão parceiros, amo vocês;

- aos meus amigos de infância, da vida, de sempre! Layla, Juninho, Bárbara, Nonô, Navarro, Michelle, Nathália, Dani e tantos outros que sempre, sempre me fazem rir sozinha só de lembrar de vocês e da gente. Vocês contrariam o dito que o essencial é invisível aos olhos. Amo vocês;

- aos amigos maravilhosos e fantásticos que Deus me deu no Rio de Janeiro; a todos que conheci no alojamento, em especial Ana Laura, Dani Cardoso, Adriana, Mariana, Lauana, Neze, Laís, Renato, por todos os momentos de conversa, risadas, companhia...por serem ora amigos, ora psicólogos, RS, e aos atuais moradores- todos demais-, principalmente minhas amigas de quarto, Rute, Ariane e Janaína, por alegrarem meus dias, por serem seres humanos incríveis e sensíveis, por serem amigas e irmãs, obrigada por todo carinho e companheirismo! Ah, não poderia deixar de agradecer aos queridos da pescoshow: Bruno, Brisson, Julio e Ingrid, pelos momentos de muitas risadas que, novamente, nos lembram que nem sempre o essencial é invisível. Obrigada galera!

-àquele que foi amigo, companheiro, orientador, co- orientador , psicólogo, animador de festa, vendedor de pão de queijo e namorado. Obrigada meu lindo por ser um ser humano lindo!

A DEUS: aquele que me ama incondicionalmente, que não me deixa vê- lo mas me da a graça de senti-lo por perto e com os olhos em mim. Pela proteção, ouvidos de amigo, abraço de pai, por abrir portas que ninguém fecha e fechar aquelas que ninguém abre. Senhor, obrigada por ter sonhado este sonho antes de mim e junto comigo. Que eu seja digna de ter sua companhia em todos os sonhos e realizações futuras. O Senhor é o meu amor maior. Eu te amo! Muito obrigada, por tudo e por todos, meu pai perfeito!

Epígrafe

“O sucesso demora, dói e dá trabalho. Por outro lado, dói menos e demora menos do que não ter sucesso, do que desistir, do que não ter planos nem sonhos. Por isso, só vence quem não esmorece, quem persevera e não desiste. Quando o caminho é difícil, a perseverança vale mais que a inteligência”.
(As 25 leis bíblicas do sucesso)

“Coisas que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem a mente humana jamais imaginou, tais são as coisas que Deus tem preparado para aqueles que o amam”.
(1Cor, 2-9).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Alix	<i>Alix/Aip1 protein</i>
Alox5	Araquidonato 5- lipoxigenase
ANCR	<i>Apis noncoding RNA-1</i>
ANTI NOS2A	RNA longo não codificante anti-NOS2A
Bax	<i>Apoptosis regulator BAX</i>
BCR	<i>Break point Cluster Region</i>
BMO	Biópsia de medula óssea
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
Bcl-2	<i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>
BM- MSCs	Células- tronco mesenquimais da medula óssea
CB	Crise blástica
CCM	Complexa matriz extracelular
CDEs	<i>Cancer derived exosomes</i>
CDON	<i>Cell adhesion molecule/down-regulated by oncogenes</i>
CEMO	Centro de transplante de medula óssea
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CXCL12	CX ligante 12 de quimiocina
CXCR4	CXC receptor do tipo 4 de quimiocina
DKK1	Dickkopf1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERK	Proteínas quinases reguladas por sinal extracelular
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
GAS1	<i>Growth arrest-specific protein 1</i>
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
Gli 1	Zinc Finger Protein 1
Gli 2	Zinc Finger Protein 2
HES1	Transcription factor HES-1
HSCs	Células tronco hematopoiéticas
HPCs	Células progenitoras hematopoiéticas
HSPS	<i>Heat shock 70 kDa protein</i>
HSP90	Hsp90 co-chaperone Cdc37
HCV	Vírus causador de Hepatite C
HOTAIR	<i>Hox antisense intergenic RNA</i>
HOXC	<i>Homeobox protein Hox</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>

INCA	Instituto Nacional de Câncer
LC	Liquid cromatography
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
lncRNA	Long noncoding RNA
LSC	Células tronco leucêmicas
MD1	<i>Lymphocyte antigen 86</i>
mRNA	RNA mensageiro
microRNA	micro RNA
MS	Mass spectrometry
MSR1	Macrophage scavenger receptor types I and II
MSC	Células tronco mesenquimais
M-bcr	Major Breakpoint cluster region protein
m-bcr	minor Breakpoint cluster region protein
mtRNA	RNA mitochondrial
MMP	Metaloproteinases
MMP 2	Matrix metaloproteinase-2
MT1-MMP	Membrana tipo I - metaloproteinase de matriz
NANOG	<i>Homeobox protein NANOG</i>
NEAT1	<i>Nuclear enriched abundant transcript 1</i>
ncRNA	RNA não codificante
Notch	Neurogenic locus notch homolog protein 1
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PC	Fosfadilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
Ph	Cromossomo Philadelphia
PI	Fosfatidilinositol
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
PS	Fosfadilserina
PTCH1	Patched 1
p21Cip1	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
Rab	Rab GTPase-activating protein catalytic subunit
RNA	Ácido desoxirribonucléico
rRNA	RNA ribossômico
RoR	<i>lincRNA-Regulator of Reprogramming</i>
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por RT
SDF1	Fator 1 derivado do estroma
SFMBT2	<i>lincRNA-SFMBT2</i>
SHh	Sonic Hedgehog

siRNA	Small interfering RNA
SMO	Smoothened
snRNA	RNA pequeno nucleares
snoRNA	RNA pequeno nucleolar
Sox2	<i>Sex Determining Region Y)-Box 2</i>
STAT5	Sinal de Transdução e Ativação da Transcrição 5
TGF- β	Fator de crescimento transformante
TINCR	<i>Tissue Differentiation-Inducing Non-Protein Coding RNA</i>
TKI	Inibidor de tirosina- quinase
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDLR	<i>Very-low-density-lipoprotein receptor</i>
Wnt	<i>Wingless</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Possíveis alvos em vias de sinalização relacionadas as LSC.....	11
Tabela 2. RNAs longos não codificantes identificados por RT-qPCR array	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos utilizados para a marcação das subpopulações celulares que podem secretar exossomos majoritariamente.....	31
Quadro 2. Proteínas aumentadas identificadas em exossomos enriquecidos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.....	76
Quadro 3. Proteínas diminuídas identificadas em exossomos enriquecidos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxas brutas de incidência de leucemias, entre 100.000 mulheres e homens.....	1
Figura 1.2. Fases de evolução da Leucemia Mielóide Crônica..	2
Figura 1.3. Desenho esquemático do cromossomo Philadelphia	5
Figura 1.4. Vias de sinalização entre as células tronco leucêmicas e hematopoiéticas normais.	7
Figura 1.6. Representação esquemática das interações moleculares entre as células tronco hematopoiéticas e seus nichos na medula óssea.....	12
Figura 1.7. Esquema da comunicação através de ligante-receptor e por secreção de fatores entre células do estroma da medula (mesenquimais) e a célula tronco hematopoiética.....	14
Figura 1.8. Possíveis funções exercidas pelos lncRNAs.	15
Figura 1.9. Esquema de formação de exossomos no compartimento endossomal.....	18
Figura 1.9.1. Representação de um exossomo de tamanho intermediário	19
Figura 1.9.2. Conteúdo dos exossomos.	20
Figura 1.9.3. Constituintes dos exossomos e possíveis modulações nas células-alvo.	21
Figura 1.9.4. Esquema de secreção de moléculas através dos exossomos.	21
Figura 1.10. Fenômenos e processos induzidos pela secreção dos exossomos.....	22
Figura 4. Esquema representativo de beads conjugadas a anticorpos anti-CD63.....	30
Figura 4.1. Esquema da digestão triptica das proteínas dos exossomos.....	34
Figura 4.2. Desenho esquemático da placa LncProfilers™ qPCR Array Kits.....	37
Figura 4.3. Fluorograma do projeto.....	38
Figura 5. Análise por citometria de fluxo dos marcadores anti-CD9 e anti-CD 81 em exossomos CD63+.	39
Figura 5.1. Microscopia eletrônica de transmissão.	40
Figura 5.1.2. Análise da proteína CD81 por western blot em amostras de exossomos enriquecidos de plasma de doadores e pacientes com LMC.	41
Figura 5.2. Análise dos marcadores anti-CD45 e anti-CD34 em exossomos CD63+.....	42
Figura 5.2.1. Análise dos marcadores anti-CD90 e anti-CD105 em exossomos CD63+.....	43
Figura 5.2.2. Análise dos marcadores anti-CD61 e anti-CD65 em exossomos CD63+.....	44
Figura 22 Figura 5.3. Cromatograma bidimensional representativa de triplicatas experimentais de peptídeos tripticos de exossomos enriquecidos de doadores.	46

Figura 5.3.1. Cromatograma bidimensional representativo de triplicatas experimentais de peptídeos trípticos de exossomos enriquecidos de pacientes com LMC ao diagnóstico.....	46
Figura 5.3.2. Análise proteômica <i>label-free</i>	48
Figura 5.3.3. Proteínas diferencialmente expressas em exossomos enriquecidos de pacientes com LMC.....	49
Figura 5.3.4. Diagrama de Veihn ilustrando as proteínas diferencialmente expressas entre pacientes e doadores.	50
Figura 5.4. Distribuição comparativa das proteínas identificadas em amostras de doadores com a base de dados Exocarta. Foram comparadas as proteínas presentes unicamente em amostras de doadores.....	51
Figura 5.4.1. Distribuição comparativa das proteínas identificadas em amostras de LMC com a base de dados Exocarta. Foram comparadas as proteínas presentes unicamente em amostras de LMC.....	51
Figura 5.4.2. Distribuição funcional das proteínas diferencialmente expressas aumentadas em LMC.	52
Figura 5.4.3: Distribuição dos principais domínios estatisticamente relevantes presentes nas proteínas com expressão aumentada e diminuída.....	53
Figura 5.5. Distribuição de glicosilação putativa nas proteínas diferencialmente expressas em pacientes.	54
Figura 5.5.1. Distribuição do tipo de glicosilação putativa nas proteínas diferencialmente expressas em pacientes.	54
Figura 5.6. Processos biológicos estatisticamente relevantes e majoritariamente representados pelas proteínas com expressão aumentada e diminuída.	55
Figura 5.6.1. Principais redes de sinalização diferencialmente expressas.....	56
Figura 5.6.2. Via de sinalização Sonic Hedgehog.	57
Figura 5.6.3. Guias de referência dos dados obtidos através do software Metacore.....	94
Figura 5.6.4. Via de regulação da transcrição de granulócitos.....	95
Figura 5.6.5. Via de indução da diferenciação mielóide mediada por G-CSF.....	95
Figura 5.6.6. Via de sinalização TGF, WNT e de remodelamento do citoesqueleto	96
Figura 5.6.7. Via de c-kit durante a hematopoiese	96
Figura 5.6.8. Via de contato de células endoteliais por mecanismos não juncionais.....	97

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leucemias	1
1.2. Leucemia Mielóide Crônica	2
1.3. O Cromossomo Philadelphia (Ph)	4
1.4. Células tronco leucêmicas	5
1.5. Resistência aos inibidores de tirosina-quinases (TKI) e vias de Sonic Hedgehog e Wnt	9
1.6. Nicho Hematopoiético das Células Tronco	11
1.6.1. Nicho Osteoblástico e Nicho Vascular	11
1.7. Estroma da Medula Óssea	12
1.7.1. Células-Tronco Mesenquimais e cross talk no microambiente da medula óssea	13
1.8. RNAs longos não codificantes (<i>Long nonCoding RNAs</i>)	14
1.9. Exossomos	18
1.10. Exossomos e câncer	22
1.11. Análise proteômica	24
II. JUSTIFICATIVA	25
III. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção das amostras	27
4.2. Enriquecimento dos exossomos em plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e doadores de medula.	27
4.3. Extração de proteínas dos exossomos enriquecidos	28
4.3.1. Quantificação dos extratos protéicos dos exossomos enriquecidos	29
4.4. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo dos exossomos	29
4.4.1 Caracterização imunofenotípica das subpopulações de células secretoras de exossomos presentes nas amostras de medula óssea de pacientes com LMC	31

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão	32
4.6. Western blot	32
4.7. Análise proteômica	33
4.8. Quantificação de proteínas diferencialmente expressas e análise funcional <i>In Silico</i>	34
4.9. Análise de expressão dos lncRNAs	35
4.9.1. Purificação de RNAs longos não codificantes de exossomos de plasma de medula óssea	35
4.9.2. Síntese do cDNA do RNA extraído	36
4.9.3. RT-qPCR array dos lncRNAs	36
4.10. Análise estatística	37
V. RESULTADOS	38
5.1. Caracterização dos exossomos enriquecidos do plasma de pacientes com LMC e doadores de medula.	38
5.1.2. Identificação imunofenotípica de exossomos por citometria de fluxo	38
5.1.3. Microscopia eletrônica de exossomos enriquecidos de plasma de medula óssea	40
5.1.4. Western Blot para o marcador CD81	40
5.2. Caracterização imunofenotípica das subpopulações de exossomos enriquecidos em pacientes com LMC	41
5.3. Análise proteômica quantitativa <i>label-free</i> dos exossomos enriquecidos	45
5.4. Análise <i>In Silico</i> descritiva das proteínas diferencialmente expressas identificadas por proteômica quantitativa <i>label-free</i>	50
5.5. Provável assinatura (<i>In Silico</i>) de glicosilação identificada nas proteínas diferencialmente expressas	53
5.6. Análise <i>In Silico</i> de processos biológicos e vias de sinalizações alteradas nas proteínas diferencialmente expressas	54
5.7. Identificação e quantificação por RT-qPCR array de RNAs longos não codificantes em amostras de exossomos de doadores e pacientes de LMC	57
VI. DISCUSSÃO	58
VII. CONCLUSÃO	66
VIII. REFERÊNCIAS	66
ANEXO I	79
ANEXO II	94

I. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemias

De acordo com as Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o Brasil, no ano de 2014, estimam-se 5.050 casos novos de leucemia entre os homens e 4.320 entre as mulheres. As taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes foram 5,20 e 4,24 para homens e mulheres, respectivamente. (**Fig. 1**). Já em relação à distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma, as leucemias representam o 9º tipo de câncer mais incidente entre os homens, e ocupam a 10ª posição entre as mulheres.

Pesquisas no campo da hematologia permitem inferir que muitas, se não todas as leucemias crônicas e agudas, se originam a partir de células pré- leucêmicas latentes, determinando a chamada fase pré- leucêmica, caracterizada pela expansão clonal de células tronco hematopoiéticas normais e de progenitores hematopoiéticos, contendo mutações relacionadas ao respectivo tipo específico de leucemia (subtipos de leucemia aguda e a leucemia mielóide crônica). Dessa forma, as leucemias podem surgir a partir de uma célula tronco precursora comum, mas que apresentam níveis de maturação e diferenciação diferentes, com respectivas mutações e/ou translocações diferentes, sendo consideradas agudas ou crônicas de acordo com a etapa de maturação em que ocorre o desvio clonal (SHLUSH, MINDEN, 2015).

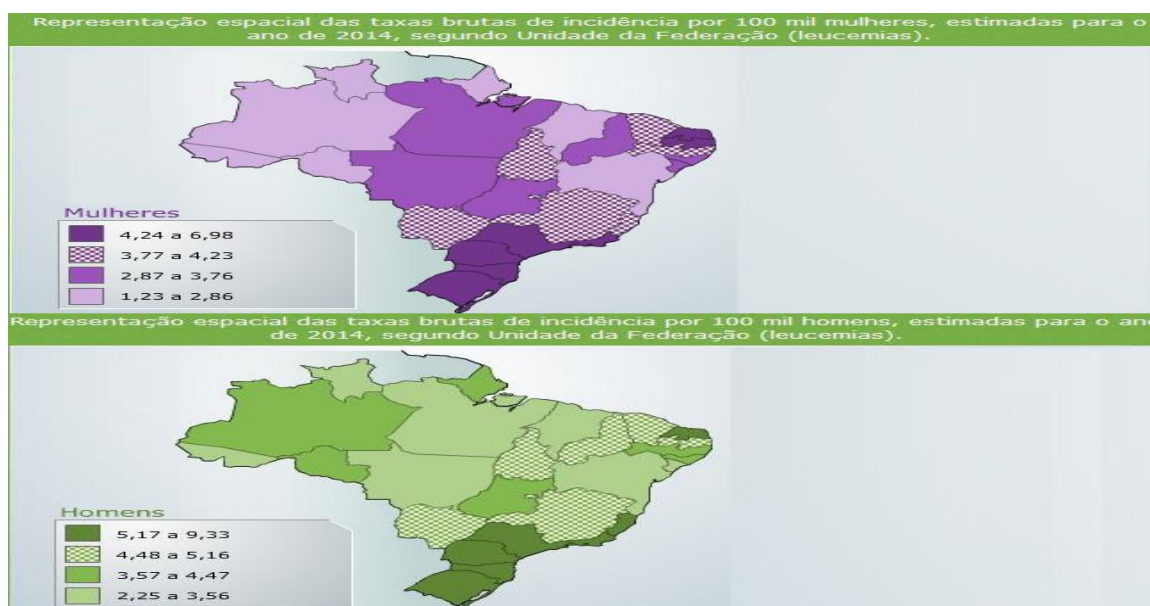


Figura 1. Taxas brutas de incidência de leucemias, entre 100.000 mulheres e homens, respectivamente. Pode- se observar que as maiores taxas de incidência, para homens e mulheres, encontram- se majoritariamente na região Sul e parte da Sudeste. (Fonte: INCA 2014).

1.2. Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) se caracteriza clinicamente por duas ou três fases: a primeira é a fase crônica (FC), que pode ser seguida ou não pela fase acelerada (FA) e a última, a fase aguda ou crise blástica (CB) (**Fig. 1.2**). A evolução da LMC ocorre em média, em quatro anos após a FC para a CB, ou em até em aproximadamente cinco anos após o diagnóstico, na ausência ou falha ao tratamento (REA *et al.*, 2012).

A FC é normalmente caracterizada por um início silencioso, onde os principais sinais clínicos são esplenomegalia, fadiga e perda de peso. Em termos laboratoriais, uma leucocitose proeminente é observada, onde a contagem de blastos representa menos de 2% dos leucócitos totais (PERROTTI *et al.*, 2010; ERNST & HOCHAUS, 2012).

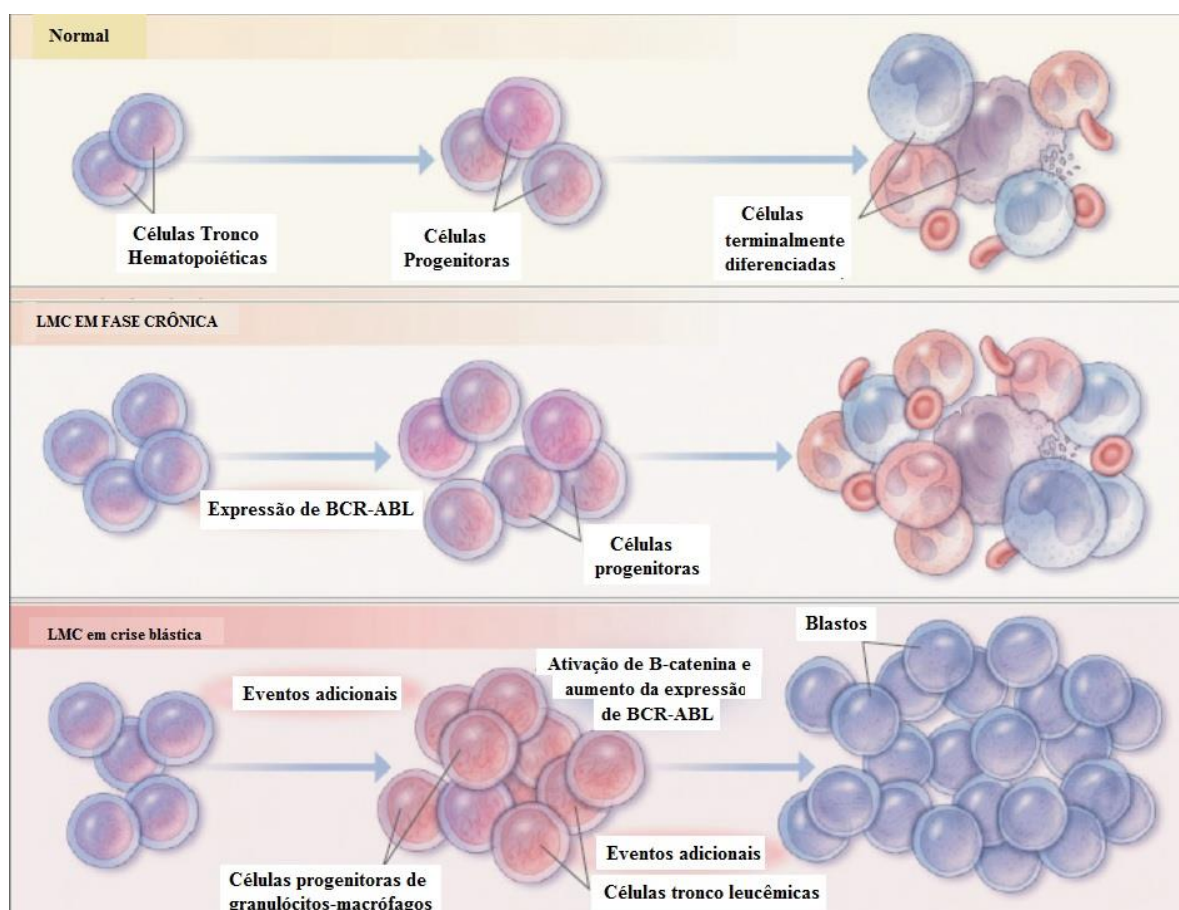


Figura 1.2. Fases de evolução da Leucemia Mielóide Crônica. Da produção de células hematopoiéticas normais a fase crônica e evolução para crise blástica. Na fase crônica, a expressão de BCR-ABL bloqueia parcialmente a diferenciação das células, gerando tanto células diferenciadas quanto indiferenciadas. Na crise blástica, eventos adicionais como alterações em processos de adesão celular bloqueiam totalmente a diferenciação celular, formando blastos imaturos na medula óssea e no sangue periférico. (Adaptado de Jamieson *et al.*, 2004).

Tanto a FA quanto a CB são caracterizadas por uma redução da diferenciação celular, com a substituição de células maduras por blastos imaturos (mielóides, linfóides ou indiferenciados) no sangue periférico. Os critérios clínicos para definição da FA incluem basofilia e aumento das contagens de blastos e promielócitos no sangue periférico, sendo caracterizada por uma esplenomegalia e aumento da contagem de leucócitos totais, com 15 a 30% de blastos presentes e contagem de plaquetas entre $<100.000/\mu\text{L}$ ou $>1.000.000/\mu\text{L}$ (BACCARANI *et al.*, 2006). De maneira geral, a evolução para a CB é de 6 a 9 meses após a FA, podendo levar ao óbito em 3-6 meses. Os pacientes na CB apresentam sintomas mais severos, como trombocitopenia, anemia, esplenomegalia e contagem de blastos no sangue periférico e na medula óssea superior a 30%, além de apresentarem, em geral, febre, dor óssea, sangramento e sudorese. Contudo, além da esplenomegalia, o aspecto mais marcante da LMC é a leucocitose com desvio a esquerda. Alguns pacientes podem evoluir da FC diretamente para a CB, sem percorrer a fase intermediária da doença (ERNST & HOCHAUS, 2012). Os mecanismos moleculares associados à transição da FC para CB são muito complexos e parecem envolver a ativação de fatores oncogênicos, a inativação de supressores tumorais, instabilidade genômica, aberrações cromossômicas e mutações (SKORSKI *et al.*, 2012). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento da LMC conhecidos são as altas doses de radiação ionizante e exposição ocupacional ao benzeno (REDAELLI *et al.*, 2004). O diagnóstico da LMC pode ser feito através de vários procedimentos e testes, tais como:

A Biópsia de medula óssea (BMO): este procedimento geralmente evidencia uma medula hipercelular devido à proliferação de neutrófilos e seus precursores. Os megacariócitos são tipicamente menores que o normal e com núcleos hipolobulados e cerca de 40% dos pacientes apresentam aumento das fibras de reticulina. Na FA pode-se observar proeminente proliferação de megacariócitos pequenos e displásicos juntamente com aumento das fibras de reticulina, enquanto que, na CB, há extensos focos de blastos (SWERDLOW, *et al.*, 2008).

A análise do cariótipo do paciente também é um dos possíveis e mais essenciais exames solicitados para a confirmação de uma suspeita de LMC, uma vez que, através do estudo do cariótipo do paciente, a presença do cromossomo Philadelphia (Ph) pode ser identificada, sendo este um fator diagnóstico chave para a confirmação da LMC. O cromossomo Ph está presente em 90-95% dos pacientes com critérios compatíveis com LMC. Em menos de 5% dos casos pode-se observar alterações variantes que envolvem dois ou mais

cromossomos além de 9 e 22. Tais situações já foram anteriormente detalhadas (CHAUFFAILLE, 2008). Em outros casos, podem ser observadas alterações cromossômicas adicionais, como duplo Ph, i(17q), trissomia do 8 e trissomia do 21, dentre outras, que caracterizam evolução clonal.

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) pode ser usada para detectar o rearranjo BCR-ABL (*Break point cluster region/Abelson murine leukemia oncogene homolog*), ao diagnóstico e tem sido preconizada para as situações nas quais não se tem metáfases para análise ou com ausência de Ph no cariótipo (CHAUFFAILLE, 2008). Cerca de 9-33% dos casos de LMC têm deleção em (9q), fato que confere sobrevida mais curta à estes pacientes quando comparado àqueles sem tal deleção.

A procura pelo transcrito BCR-ABL por reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) está indicada, ao diagnóstico, para menos de 5% dos casos em que não se detecta o Ph no cariótipo (OU, VERGILIO, BAGG, 2008).

1.3. O Cromossomo Philadelphia (Ph)

A LMC é uma doença mieloproliferativa que resulta da translocação recíproca entre o oncogene ABL, localizado no cromossomo 9, com o gene BCR, localizado no cromossomo 22 [t(9;22)], levando a formação da oncoproteína BCR-ABL. O "novo" cromossomo 22 formado por esta translocação recebe o nome de cromossomo Philadelphia (Ph), devido à cidade na qual foi descoberto por Nowell e Hungerford (NOWELL; HUNGERFORD, 1960), e é considerado até hoje a anormalidade causadora da LMC (**Fig. 1.3**).

O local de quebra no cromossomo 22 é variável, porém a maior parte ocorre em posição mais central entre os éxons 12 e 16, em uma região denominada como região *major* de quebra (M-bcr - "*Major breakpoint cluster region*"). Em um pequeno número de pacientes a quebra pode ocorrer em posição mais distal (entre os éxons 19 e 20), dando origem a uma quebra do tipo minor (m-bcr). As diferentes posições de quebra envolvendo éxons diferentes dão origem, após o evento de *splicing* alternativo, a 3 proteínas Bcr-Abl, com tamanhos variáveis (190, 210 e 230 kDa). A proteína menor (p190 Bcr-Abl) contém menor parte de Bcr que as maiores p210^{Bcr-Abl} e p230^{Bcr-Abl}. Como todas possuem a mesma quantidade de ABL, é a partir dessa variação na contribuição do gene BCR em cada proteína quimérica que diferentes efeitos biológicos são obtidos, podendo ser cruciais para o fenótipo da doença (KURZROCK *et al.*, 2003). Cerca de 95% dos casos de LMC apresentam o Ph e os demais,

Ph e BCR-ABL1 negativos, são classificados como entidade à parte, a LMC atípica (SWERDLOW, *et al.*, 2008).

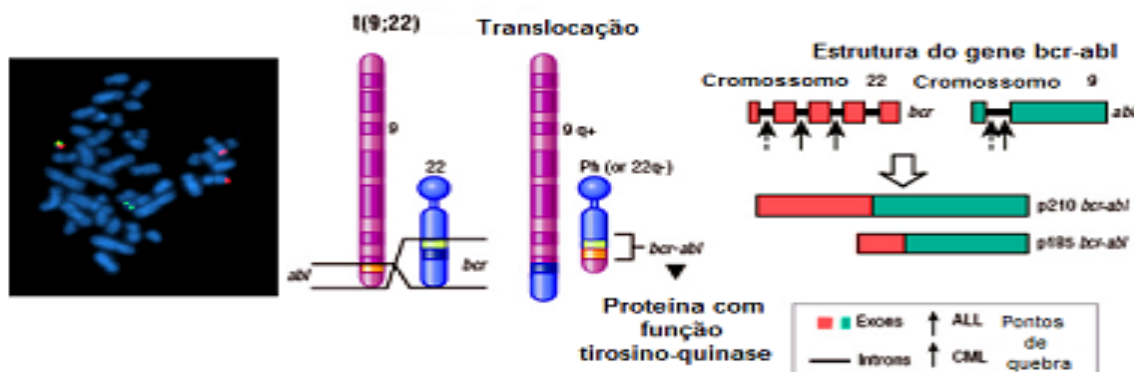


Figura 1.3. Desenho esquemático do cromossomo Philadelphia. O cromossomo é originado a partir de translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, com a fusão entre os genes BCR e ABL1. A depender do ponto de q uebra exato em que ocorre nos íntrons dos genes BCR e ABL, a proteína Bcr-Abl pode apresentar 210 ou 185k, sendo a primeira mais comumente observada nos pacientes. (Adaptado de DEININGER, *et al.*, 2000).

A proteína Abl funciona como uma enzima tirosina-quinase que participa na sinalização e remodelamento do citoesqueleto, bem como pode participar da regulação do ciclo celular. A fosforilação normal de Abl é controlada fisiologicamente e provavelmente por modificações na cauda N-terminal da proteína. A perda dessa região, durante a formação da quimera BCR-ABL, resulta em alta atividade tirosina-quinase constitutiva intensa, um dos principais fatores no potencial oncogênico da transformação de proteínas Abl (KURZROCK *et al.*, 2003).

A alta atividade tirosina-quinase da proteína p210^{Bcr-Abl} nas células da LMC resulta no aumento da instabilidade genômica, inibição dos genes supressores tumorais, ativação das vias que bloqueiam a diferenciação da linhagem mielóide (MELO, BARNES, 2007; PERROTI *et al.*, 2010), escape da apoptose e transformação celular independente de citocinas. Sua localização predominantemente citoplasmática permite a formação de complexos multiprotéicos fosforilados, que disparam diversas vias de sinalização intracelular e promovem proliferação e instabilidade genética enquanto suprimem a apoptose e diminuem a adesão celular (SAWYERS, 1995).

1.4. Células tronco leucêmicas

Um conceito emergente na biologia do câncer é de que existe uma população rara de células tronco no heterogêneo microambiente tumoral (WITTERS *et al.*, 2007). Este conceito também se aplica a LMC. As funções das células tronco normais e leucêmicas são definidas por um subgrupo comum de genes *stemness*, que regulam a auto-renovação (BONNET, 2005). Células tronco hematopoiéticas (HSCs) e células tronco leucêmicas (LSCs) compartilham características comuns, incluindo auto-renovação, resistência, apoptose e aumento de proliferação (BONNET, 2005).

A respeito destas similaridades, alguns fatores *stemness*, como Noth (*Neurogenic locus notch homolog protein*, BM-1 e Wnt (*Wingless*)) mostram ativação diferencial entre HSCs e LSCs e, por isso, tem-se proposto que estas diferenças poderão ser exploradas terapeuticamente (HUNTLY, 2005). BCR-ABL atua promovendo aumento da proliferação celular, instabilidade genômica e na ativação de vias que conduzem para um bloco na diferenciação mielóide, além de facilitar a aquisição da capacidade de auto-renovação e a inibição de supressores tumorais com funções reguladoras celulares ampla. (Fig. 1.4). A via Wnt / β -catenina é necessária para a sobrevivência a longo prazo e renovação das células estaminais na LMC (ZHAO, *et al.*, 2007; HU, *et al.*, 2009). Na fase blástica da doença, tem sido sugerido que progenitores hematopoiéticos poderiam re-adquirir algumas propriedades *stemness* (por exemplo, auto-renovação) através de uma ativação de β -catenina (JAMIESON, *et al.*, 2004).

No nicho hematopoiético, sinais críticos bidirecionais aumentam a regulação do número de HSCs e sua manutenção de quiescência a longo prazo. Células reticulares advenciais, as quais são de origem mesenquimal, tem sido mostradas com capacidade de alterar as funções das células-tronco. Estas células expressam altos níveis do ligante 12 de quimiocina (CXCL12), também denominado SDF-1. Ao se ligarem ao seu receptor CXCR4, promove sobrevivência das células progenitoras leucêmicas quiescentes (JIN *et al.*, 2008).

A deleção de CXCR4, ligante de CXCL 12, leva a uma severa redução do número das HSCs e aumento de sua quimiosensibilidade (SUGIYAMA *et al.*, 2006). Interações entre CXCR4 e CXCL12 são importantes para a localização e retenção da HSC e das células progenitoras contidas no nicho.

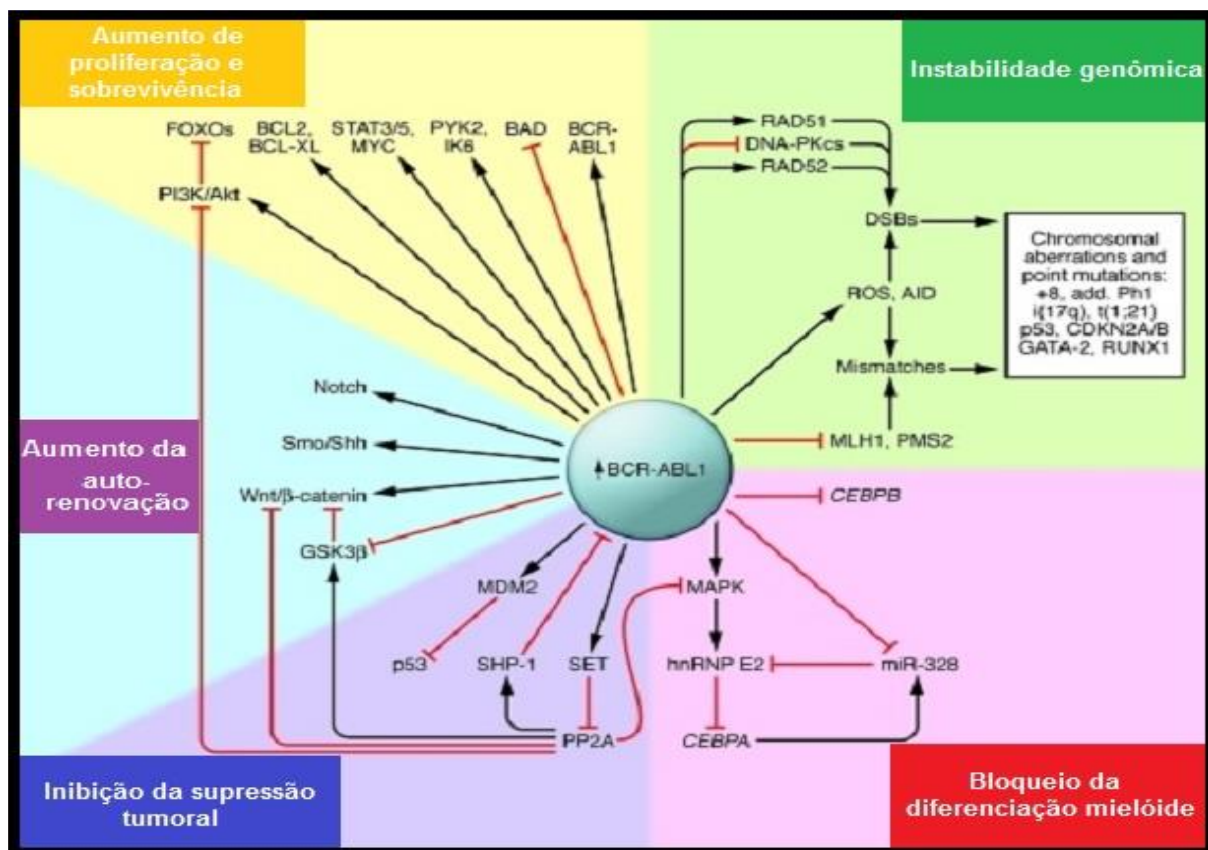


Figura 1.4. Vias de sinalização entre as células tronco leucêmicas e hematopoiéticas normais. (BCR-ABL ativa vias de sinalização como Notch, Shh, Wnt/β catenina e GSK-3, relacionadas ao aumento da auto-renovação das células leucêmicas. (Fonte: PERROTI *et al.*, 2010).

Além disso, CXCR4 e CXCL12 desempenham um papel crítico na colonização da medula óssea pelas HSCs durante o desenvolvimento embrionário, como revelado pela observação que embriões deficientes de CXCL12 apresentaram severa redução do número e queda nas funções das HSC (ARA *et al.*, 2003). Obter CXCR4 como alvo, em associação com outros componentes químicos, podem representar outra estratégia benéfica contra os alvos leucêmicos (ZENG *et al.*, 2009).

Para adquirir uma erradicação seletiva de LSCs, uma terapia nicho-alvo irá requerer um alto padrão de seletividade para a interação aberrante entre o clone e o microambiente (ADAMS *et al.*, 2008). Isto pode incluir as vias de auto-renovação, como Notch e Wnt/β-catenina, mecanismos do próprio hospedeiro, e moléculas de adesão celular. Dados publicados revelaram que a via de Notch está relacionada com a manutenção das células tronco leucêmicas e a via de Wnt/β-catenina sustenta as células tronco na crise blástica da LMC (JAMIESON *et al.*, 2004). Sendo assim, evidências indicam que ambas as vias regulam parcialmente o nicho.

As vias de Wnt e Hh (Hedgehog) são upreguladas na LMC e são evolutivamente conservadas e diretamente associadas aos processos de desenvolvimento embrionário. Estas vias são hermeticamente controladas e geralmente inativas nos tecidos adultos; contudo, desempenham um importante papel nas células-tronco adultas normais. Nos dias atuais, sabe-se que estas e outras vias estão aberrantemente ativadas em uma ampla gama de neoplasias humanas (SU *et al.*, 2012).

A família de proteínas Wnt é composta de pelo menos 19 isoformas, que são ativadas para as duas vias de sinalização de Wnt/ β -catenina: uma não-canônica, que envolve um mecanismo independente de β -catenina, que influencia o processo de polaridade celular, assimetria durante a divisão celular e migração das células durante o desenvolvimento (WITTERS, *et al.*, 2007), e outra via denominada canônica, dependente de β -catenina para atuar na formação de padrões durante o desenvolvimento. A via de sinalização Wnt/ β -catenina tem sido extensivamente estudada em tumorigênese e progressão do câncer (REYA, CLEVERS, 2005). Estudos de microarray de genes desta via indicaram que a desregulação da via Wnt/ β -catenina ocorre durante a progressão da LMC da fase crônica à acelerada, chegando a crise blástica (RADICH *et al.*, 2006).

Além da via de Wnt/ β -catenina, a via de sinalização denominada Sonic Hedgehog (Shh) é outro regulador crucial da embriogênese e que atua como morfógeno no desenvolvimento, com atividade tanto no desenvolvimento de células tronco no feto quanto no adulto. Estudos prévios mostraram sinalizações aberrantes de Shh em um número de tumores sólidos, bem como em outras malignidades hematológicas (RADICH, 2006; DIERKS *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Na LMC, a sinalização Hh é vital para a manutenção da LSC através da ativação mediada por GLI1 (*Zinc Finger Protein 1*) Smoothened (SMO), mas em humanos, os níveis de Gli2 (*Zinc Finger Protein 2*) aumentam com a transformação blástica (RADICH *et al.*, 2006). Curiosamente, a perda de expressão de SMO por nocaute ou inibição farmacológica reduziu significativamente o percentual de LSC e atrasou o desenvolvimento de LMC (DIERKS *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009).

Estudos de microarranjos tem revelado que componentes da via de Hh, como *Sonic Hedgehog* (Shh), *Desert Hedgehog* (Dhh) e *Indian Hedgehog* (Ihh), estão com expressão aumentada e que este fato se correlaciona com alta expressão de CD34 na LMC. Isto sugere que a via de Shh é estimulada nas células leucêmicas durante a LMC e ha evidências de que a ativação de Shh parece aumentar com a progressão da doença da fase crônica para a de crise blástica (RADICH *et al.*, 2006). Outro alvo específico em potencial nas LSC na LMC é o

gene araquidonato 5-lipoxigenase (ALOX5), que foi identificado como um regulador crítico das LSC (CHEN *et al.*, 2009).

1.5. Resistência aos inibidores de tirosina-quinases (TKI) e vias de Sonic Hedgehog e Wnt

A resistência que algumas células tronco hematopoiéticas (HSC) desenvolveram aos inibidores de tirosina-quinase-do inglês, *tirosino kinase inhibitors* (TKIs) mais comumente usados pode se desenvolver a partir de três causas principais: a quiescência das células (GRAHAM, *et al.*, 2002), altos níveis de expressão de BCR-ABL (MODI, *et al.*, 2007) ou sua independência de oncogene (CORBIN, *et al.*, 2011). A resistência ao tratamento com Imatinibe é atribuída à presença de células leucêmicas quiescentes, sendo estas capazes de se comunicar com as células do seu estroma, uma vez que este sustenta a leucemogênese (SEKE, VECCHIO, NWAB, 2012). Dados recentes mostraram um relapso na maioria dos pacientes após a descontinuação de Imatinibe (MAHON, 2010), o que pode sugerir uma persistência *in vivo* das células tronco leucêmicas.

Recentemente, foi mostrado que HES1(*Transcription factor HES-1*) (fator de transcrição alvo Notch) consegue manter a auto-renovação de células estaminais na LMC e promover a transformação blástica (NAKAHARA, *et al.*, 2010). A importância da via de Sonic Hedgehog também foi demonstrada na renovação de células tronco leucêmicas (LSC) e durante a progressão da LMC.

Cea, *et al.*, (2013) fizeram uma análise da expressão do mRNA de duas moléculas da via de Shh: Smoothened (SMO) e Patched-1 (PTCH1), com a cinética da atividade da via de Hh durante a história médica individual correlacionada com o nível de mRNA de BCR-ABL com o surgimento de relapso molecular da doença. Ao diagnóstico, pacientes com risco Sokal alto (n=12) mostraram níveis de SMO e PATCHED1 alto e baixo, respectivamente (p=0,0132), comparado com pacientes com Sokal diferente (p=0,0316 para grupo de risco intermediário e p=0,0340 para baixo risco). Estes dados sugerem que a via de Shh estava mais funcionalmente ativa no grupo de risco no momento do diagnóstico.

Boyda, *et al.*, em 2013, usando modelo de leucemia mielóide aguda (LMA), observou que o receptor de membrana de Hh, SMO, foi encontrada raro em amostras de células hematopoiéticas. Contudo, abundante expressão de SMO foi encontrada na fração de células não hematopoiéticas de medula óssea de murinos e humanos, sugerindo que a inibição da via

de Shh deva ser reavaliada no modelo de LMA, para responder a regulação do nicho da medula óssea que pode ser seletivamente responsiva a Hh.

O grupo de Fleming *et al.*, em 2008, usando um promotor específico para osteoblastos para dirigir a expressão de um pan-inibidor da sinalização canônica de Wnt, Dickkopf1 (Dkk1), observaram mudanças no osso trabecular e nas células tronco hematopoiéticas. A sinalização de Wnt foi inibida nas HSC e as células exibiram redução da expressão de p21Cip1, aumento de ciclo celular e declínio progressivo na função regenerativa após o transplante. Este efeito foi determinado pelo microambiente, mas foi irreversível se as células foram transferidas para um hospedeiro normal. A ativação da via de Wnt no nicho é requerida para preservar a reconstituição da função endógena das células tronco hematopoiéticas.

Os trabalhos recentes de PIZZATTI, *et al.*, (2010) e PIZZATTI, *et al.*, (2012), apontaram as vias Wnt e Hh como potenciais alvos alterados na LMC. Essas vias seriam responsáveis por induzir a proliferação e promover o escape de apoptose do clone leucêmico, com uma importância ainda maior do que a proteína BCR-ABL, principalmente com relação ao estroma da medula óssea. Trabalhos recentes propõem que as células-tronco leucêmicas poderão ser consideradas alvos para a inibição dos componentes das vias de sinalização envolvidas. (**Tabela 1**).

Tabela 1: Possíveis alvos em vias de sinalização relacionadas as LSC

	Via de sinalização	Alvo	Inibidor	Uso Clínico
Comuns a todas as células tronco hematopoiéticas	Wnt/β-catenina	CK1 (caseína kinase 1a)	Pyvinium	Infecção por helmintos
	Hedgehog	SMO (Smoothened)	Ciclopamina, BMS-833923	-
			RO4929097, BMS-906024, PF-03084014	-
	Notch	Notch		-
Relativamente específicas para as células tronco leucêmicas	PML	PML	Trióxido de Arsênio	Leucemia promielocítica
	Alox5	Alox5	Zileuton	Asma
	Hsp90	Hsp90	Geldanamycin	-
	STAT5	STAT5	Pimozide	Psicotrópico

Adaptado de Chomel and Turhan, 2011

1.6. Nicho Hematopoiético das Células Tronco

A medula óssea é um órgão hematopoiético, no qual ocorre a produção de células tronco que posteriormente se diferenciam em todos os tipos celulares presentes no sangue periférico. Em adultos, 4,6% do peso corporal se deve à medula óssea, que está localizada no interior das vértebras, costelas, pélvis, crânio e extremidades proximais dos ossos longos (LORD *et al.*, 1975). A função primária da medula óssea consiste em manter o nível adequado e constante do número de células diferenciadas no sangue periférico ao longo da vida do ser humano.

Os componentes celulares da medula óssea podem ser divididos em células hematopoiéticas e mesenquimais. As células mesenquimais, juntamente com macrófagos e a matriz extracelular, formam o estroma da medula. Já as células hematopoiéticas da medula óssea são divididas em: células-tronco hematopoiéticas (HSCs- "*Hematopoietic Stem Cells*"), células hematopoiéticas progenitoras (HPCs- "*Hematopoietic progenitors cells*") e células maduras do plasma.

Em condições estáveis, a maioria das HSCs reside na medula óssea em quantidade maior do que no sangue periférico (ABKOWITZ *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2001), fato este que levou Schofield a propor que as HSCs necessitam estar localizadas em um nicho particular na medula óssea, a fim de manter sua capacidade de auto-renovação (SCHOFIELD, 1970; SCHOFIELD, 1978). Uma gama de evidências que sugere que as HSCs estão localizadas de maneira não aleatória na medula óssea, sendo uma porção localizada na interface osso-medula, região denominada nicho osteoblástico e outra porção em torno dos vasos sanguíneos, no chamado nicho vascular. Em contraste, os progenitores comprometidos se acumulam na porção central da medula óssea.

1.6.1. Nicho Osteoblástico e Nicho Vascular

A maioria das HSCs do endósteo-fina camada de tecido conjuntivo que reveste a superfície do tecido ósseo, formador da camada medular dos ossos longos, estão em contato direto com os osteoblastos e há uma evidência genética de que o aumento da formação dos ossos leva a um aumento do número de HSCs na medula óssea (ARAI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003).

As HSCs do nicho vascular são isentas de N-caderinas e são especificamente localizadas adjacente às células que expressam altos níveis de CXCL 12 (molécula direcionadora de células hematopoiéticas e envolvida na formação de vasos sanguíneos). A

importância da interação entre CXCL-12 e CXCR4 (*CXC chemokine receptor type 4*) na manutenção do nicho vascular foi demonstrado através da depleção do CXCR4, que levou a redução do pool de HSCs (SUGIYAMA *et al.*, 2006). Uma das maiores diferenças fisiológicas entre os dois nichos é o alto nível de oxigênio no nicho vascular, comparado com a condição próxima a hipóxia presente no nicho osteoblástico (PARMAR *et al.*, 2007). (**Fig. 1.6**).

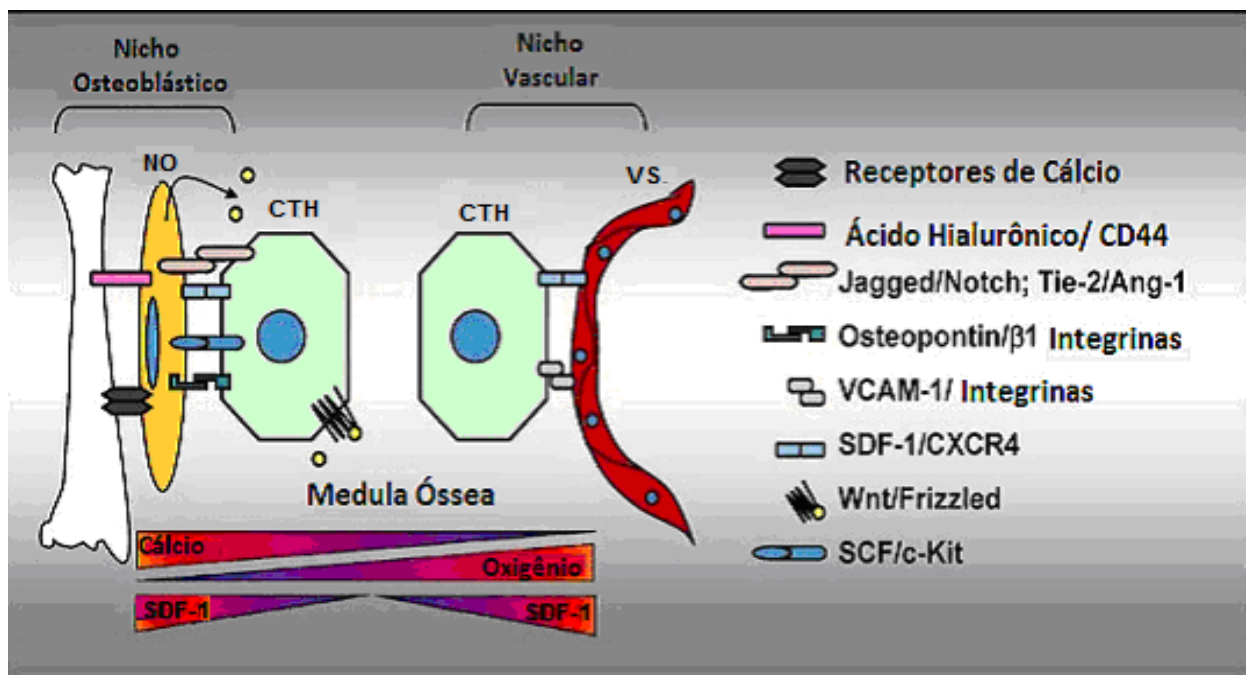


Figura 1.6. Representação esquemática das interações moleculares entre as células tronco hematopoiéticas e seus nichos na medula óssea. Em condições fisiológicas normais, as células tronco hematopoiéticas (CTHs) residem tanto próximas ao endosteo, alojadas no nicho osteoblástico (NO), quanto próximas aos vasos sanguíneos (VS) (Nicho vascular). O nicho osteoblástico fornece um microambiente favorável à manutenção das HSC, devido ao alto suprimento de íons Ca^{++} , enquanto que o nicho vascular fornece o microambiente apropriado a proliferação e diferenciação das células, devido ao suprimento de O_2 .

1.7. Estroma da Medula Óssea

O estroma da medula óssea é uma população heterogênea de células que inclui adipócitos, células reticulares, endoteliais, musculares lisas e "*mesenquimal stem cells*" (MSCs, ou células mesenquimais do estroma), além de macrófagos (CLARK *et al.*, 1995). Esta complexa população de células não é responsável somente pela produção e deposição da complexa matriz extracelular (*ECM-extracellular complex matrix*), como também pela produção e concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. As células hematopoiéticas interagem com o estroma através de receptores de membrana específicos, secretados por fatores de crescimento e com ligantes presentes nas ECM das células

estromais. Assim, o estroma da medula óssea cria um ambiente propício aos processos de mielopoiese, linfopoiese e imunoregulação, permitindo que os mesmos ocorram concomitantemente (VERFAILLIE *et al.*, 1994).

1.7.1. Células-Tronco Mesenquimais e *cross talk* no microambiente da medula óssea

As MSCs ou células tronco mesenquimais, são importantes componentes do estroma da medula óssea e representam 0,0001-0,001% das células nucleadas da medula óssea de adultos humanos (DAZZI *et al.*, 2006). Estas células foram primeiramente identificadas por Friedenstein *et al.*, que as descreveram como células indiferenciadas da medula óssea, com capacidade de se diferenciarem *in vitro* em colônias semelhantes a cartilagem de osso (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974).

Posteriormente, outros estudos mostraram que as MSCs eram capazes de se diferenciarem em vários outros tipos celulares, como osteoblastos, condroblastos, adipócitos, astrócitos, miócitos, neurônios, células endoteliais e epiteliais de pulmão. Devido sua plasticidade, elas são frequentemente reconhecidas como células-tronco mesenquimais. As MSCs são caracterizadas pela expressão de um grande número de moléculas de adesão e marcadores de células estromais, como CD73, CD105, CD44, CD45, CD29, CD90 (KEMP *et al.*, 2005; ROORDA *et al.*, 2009).

Uma das muitas funções das MSCs é propiciar, no interior da medula óssea, um microambiente que favoreça a hematopoiese. Isto é feito não somente pela diferenciação de vários tipos celulares que compõem o estroma da medula óssea, como também por atuarem como "pontes" para a interação célula-célula e por secreção de citocinas e fatores de crescimento (**Fig. 1.7**). De qualquer forma, a comunicação entre as células mesenquimais do estroma e a célula tronco hematopoiética pode ocorrer diretamente através de complexos ligante-receptores, através da secreção de fatores, secreção de moléculas mediada por exossomos e microvesículas, além da regulação de fatores de crescimento, diferenciação e renovação celular por RNAs longos não codificantes.

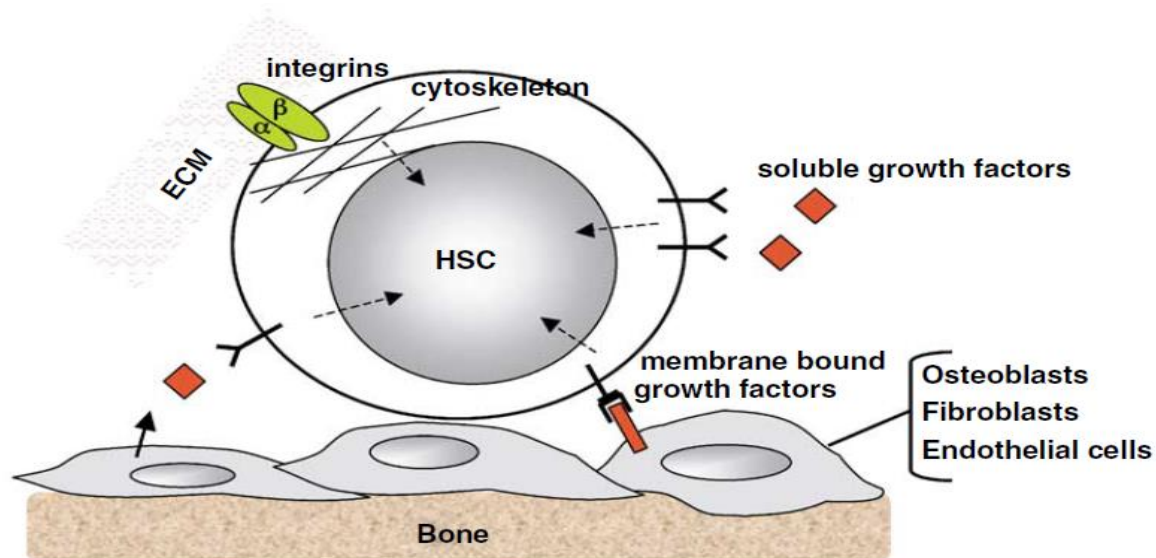


Figura 1.7. Esquema da comunicação através de ligante-receptor e por secreção de fatores entre células do estroma da medula (mesenquimais) e a célula tronco hematopoiética. As células do estroma (mesenquimais) podem se diferenciar principalmente em osteoblastos, fibroblasts e células endoteliais. Estas células podem se comunicar com as células tronco hematopoiéticas através de ligantes-receptores, ou através da secreção de fatores solúveis, como os exossomos, que podem ser secretados por ambas as populações celulares.

1.8. RNAs longos não codificantes (*Long nonCoding RNAs*)

Durante os últimos anos, uma das principais descobertas feitas através de estudos de sequenciamento total do genoma foi que os éxons que possuem capacidade para codificar proteínas correspondem a menos de 2% do DNA de mamíferos (LANDER *et al*, 2001). Outros estudos de transcriptoma em larga escala mostraram que até dois terços do genoma são transcritos em ácido ribonucleico (RNA) (CARNINCI *et al.*, 2005), e que estas regiões, anteriormente chamadas de “DNA lixo”, são agora conhecidas por serem ricas em gerar transcritos que codificam uma grande e diversa população de RNAs que, por sua vez, não possuem potencial de codificar proteínas, referindo-se aos RNAs não codificantes (ncRNA).

Os ncRNA mais precocemente identificados foram os RNAs ribossomal e de transferência (rRNA e tRNA), correspondendo, juntos, a 95% do conteúdo celular de RNA. Os demais RNAs são classificados com base no comprimento: os ncRNA são considerados curtos quando possuem menos de 200 nucleotídeos, incluindo microRNAs, RNA nucleolar pequeno, entre outros. Já os RNAs longos não codificantes (lncRNA), por definição arbitrária, possuem mais de 200 nucleotídeos e representam um diverso grupo com variadas funções. Esta classe de RNAs foi alvo de estudos no início do século XXI e agora volta a ganhar atenção devido à sua provável função proeminente na regulação gênica, uma vez que atuam como promotores de modificações epigenéticas nos genes e células alvo.

Os lncRNAs podem ser poliadenilados ou não, localizam-se tanto no núcleo quanto no citoplasma e estão presentes em menor quantidade quando comparados com RNA mensageiro (mRNA), que possui capacidade de codificar proteínas. Alguns se originam de *enhancers*, estima-se que centenas destas moléculas são codificadas no genoma humano e são expressas em padrões específicos, de acordo com cada tecido (KIM, *et al.*, 2010).

Nos últimos anos os lncRNAs têm sido vistos regulando uma grande variedade de funções como sinalização celular, inibição molecular (*decoys*), guias de ribonucleoproteínas para sítios específicos em regiões da cromatina e também participando como suportes na formação de complexos envolvendo DNA, RNA e proteínas, reforçando a importância potencial que estas moléculas exercem durante a regulação epigenética (WANG; CHANG, 2011). (Fig. 1.8).

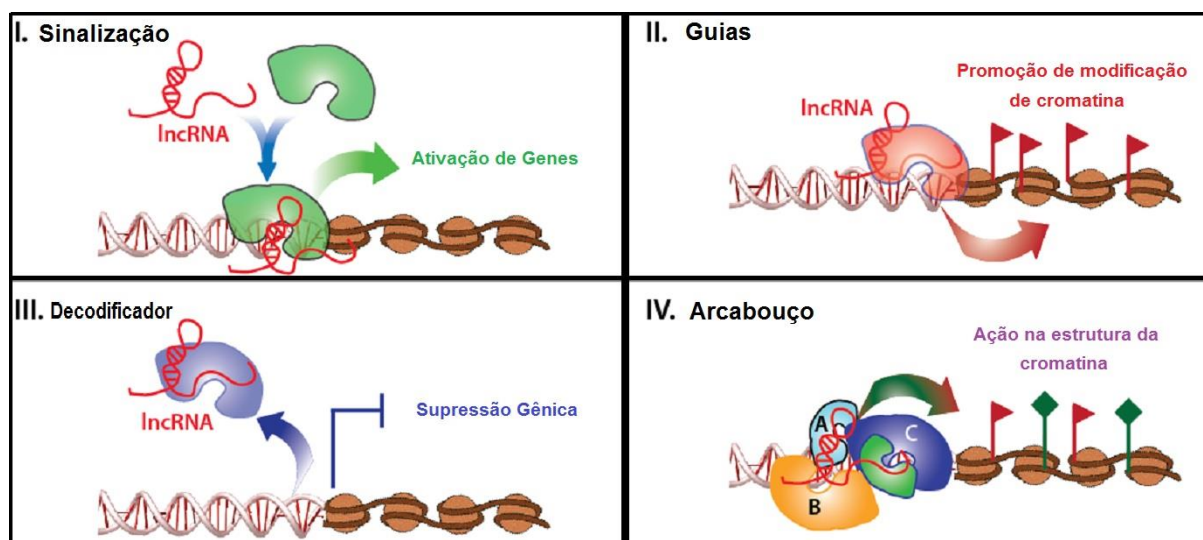


Figura 1.8. Possíveis funções exercidas pelos lncRNAs. Os lncRNAs podem atuar recrutando outras proteínas para induzir sinalização, bem como atuar como RNAs guias, decodificadores e formando arcabouços moleculares que, modificando a estrutura da cromatina, podem inibir ou ativar a transcrição de genes alvo.

Os lncRNAs são moléculas versáteis que podem interagir funcional e fisicamente com DNA e RNAs tanto por pareamento de bases (as vezes, sendo necessária uma única interação base-base), quanto por formação de domínios estruturais gerados pelo dobramento da molécula de RNA, permitindo que as mesmas também se liguem a proteínas. Esta capacidade de dobra da molécula de RNA permite que a mesma forme estruturas tridimensionais que originam superfícies complexas de reconhecimento, de forma que esta estrutura expande a larga variedade de moléculas alvo às quais o RNA pode se ligar com alta capacidade e especificidade. Além disso, o RNA também pode exercer funções em genes

adjacentes e, com isso, tal característica fez com que o papel mais bem caracterizado dos lncRNAs, até o momento, fosse no campo da regulação epigenética (HEARD, *et al.*, 2006).

lncRNAs também podem interferir nas ligações entre o DNA e proteínas (KINO, *et al.*, 2010), na organização da arquitetura nuclear (MAO, *et al.*, 2011) e na regulação da estabilidade do mRNA durante sua tradução (GONG, *et al.*, 2011). Além disso, podem também modular os níveis de mRNA por competir com estes por ligações aos microRNAs necessários ao início do processo de tradução (CESANA, *et al.*, 2011), atuar no *splicing* e na degradação de outros RNAs, além de serem extremamente importantes para o controle da diferenciação tecidual e celular. (KRETZ, 2013; KRETZ, 2012; CESANA, 2011; NG, 2011). Não obstante, os lncRNAs podem alterar diretamente a função de determinada proteína (WILLINGHAM, *et al.*, 2005).

O lncRNA HOTAIR, por exemplo, é transcrito do locus HOXC e silencia o locus HOXD através do recrutamento de complexos repressivos da cromatina, como os complexos Polycomb (PRC2) e LSD1. O primeiro complexo é responsável pela modificação da cromatina através da trimetilação do resíduo 27 de lisina, presente na histona 3, enquanto que o complexo LSD1 atua demetilando o resíduo 4 de lisina, também na histona 3. Dessa forma, ambos os complexos atuando modificando a cromatina, impedindo então que genes relacionados a supressão tumoral sejam traduzidos (KOZIOL, RINN, 2010).

.Em 2010, Pizzatti *et al* observaram o gene de uma das subunidades constituintes do complexo PRC2 (Suz12) com expressão aumentada em amostras de pacientes com LMC. MOHAMMADREZA *et al* (2015) observou que HOTAIR é um inibidor de Wif-1, sendo este um regulador negativo da via de Wnt/ β -catenina que, quando ativada, contribui para a evolução da LMC, como descrito anteriormente. Sendo assim, pode-se inferir que os lncRNAs, como HOTAIR, podem exercer funções-chaves na regulação gênica durante vários tipos de câncer, incluindo a leucemia mieloide crônica. Assim, os lncRNAs podem atingir múltiplos níveis na hierarquia da expressão gênica, e sua aberrante expressão e/ou mutações tem sido relacionadas a diversas doenças humanas, como as cardiovasculares, Alzheimer's e câncer. (HUARTE, 2010; ESTELLER, 2011; SUI W, 2012). Zuo, *et al.*(2013) observou em seu estudo que lncRNAs, como MD1, TINCR e ANCR, estavam diferencialmente expressos quando associados a BMP-2 no processo de indução a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, revelando o quão versáteis podem ser as funções exercidas pelos lncRNAs em diversos modelos, tecidos e processos celulares.

O grupo de Bai, *et al.* (2014) identificou dois principais lncRNAs (NR_045623 e NR_028291) envolvidos na resposta imune, hematopoiese, via de sinalização de receptores de células B e na Leucemia Mielóide Crônica, sugerindo assim que estes dois lncRNAs podem ser genes chaves na hematotoxicidade causada por exposição ao benzeno.

Vários grupos têm visto que alguns pacientes com LMC desenvolvem resistência ao tratamento com os inibidores de tirosina-quinase (TKIs) de primeira geração (Imatinibe) e são submetidos ao tratamento com TKIs de segunda geração, como Dasatinibe. Contudo, a resistência também pode ser observada nestes últimos pacientes, de forma que, através de um estudo de perfil de expressão gênica em larga escala (Microarray), utilizando células mononucleares de pacientes resistentes ao imatinibe, um ano antes e depois do tratamento com Dasatinibe, revelou que, além de determinados genes com potencial codificante, alguns lncRNAs estavam diferencialmente expressos, revelando novos potenciais elementos envolvidos na resistência ao Dasatinibe na LMC (SILVEIRA *et al.*, 2014).

De posse destes dados e sabendo que estudos recentes sugerem que LSCs não são completamente dependentes de BCR-ABL para sobreviver, fica clara a importância de investigar as vias de sinalização ativas na medula óssea e no seu microambiente (HU *et al.*, 2006). Estudos recentes tem demonstrado que várias células secretam microvesículas no microambiente tumoral e que estas contêm moléculas (DNA, mRNA, miRNA, RNAs longos) e substâncias características das células de origem que podem modular respostas nas células alvo. Dentre estas microvesículas, o subgrupo dos exossomos serão objeto de estudo do presente trabalho.

1.9. Exossomos

Exossomos são pequenas vesículas de 40-100 nm de diâmetro (Nanovesículas) (**Fig. 1.9**), envoltas por uma bicamada lipídica, que podem conter ácidos nucléicos e proteínas específicas de acordo com o tipo de célula e mecanismo de biogênese (VLASSOV, *et al.*, 2012). São inicialmente formadas no compartimento endossomal e secretadas quando os corpos multivesiculares se fundem com a membrana plasmática da célula receptora (SCHOREY, *et al.*, 2008) (**Fig. 1.9.1**). Essas vesículas são liberadas por diversos tipos celulares, incluindo células neoplásicas, e são consideradas mensageiras da comunicação intercelular, podendo ser identificadas em vários fluidos biológicos como sangue, urina e líquido ascítico (CAMUSSI, *et al.*, 2010).

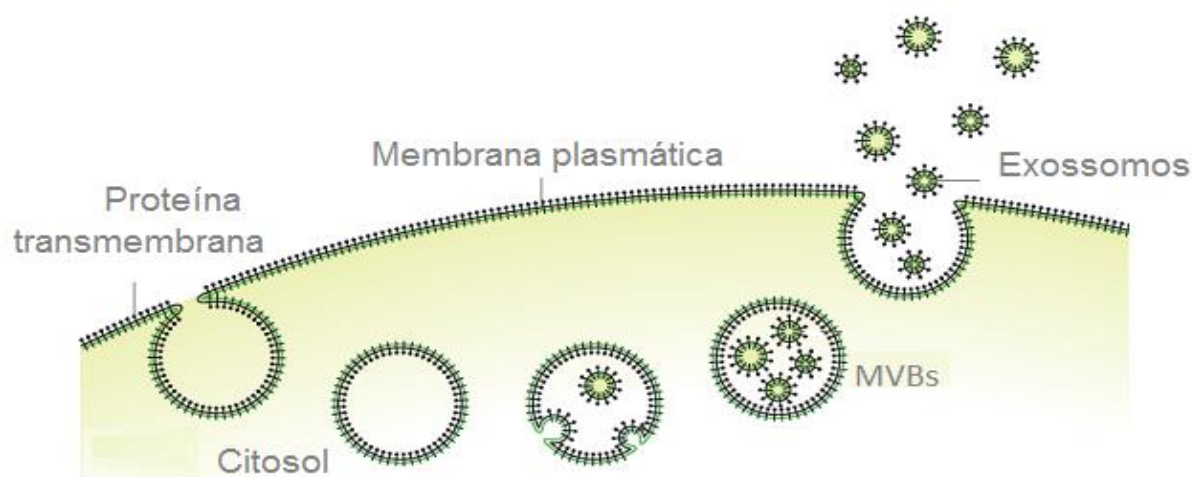


Figura 1.9. Esquema de formação de exossomos no compartimento endossomal. . Os corpos multivesiculares são formados no interior do compartimento endossomal da célula secretora. Posteriormente, os exossomos são liberados por exocitose, carregando consigo parte do conteúdo molecular da célula de origem (Adaptado de Raposo e Stoorvogel, 2013).

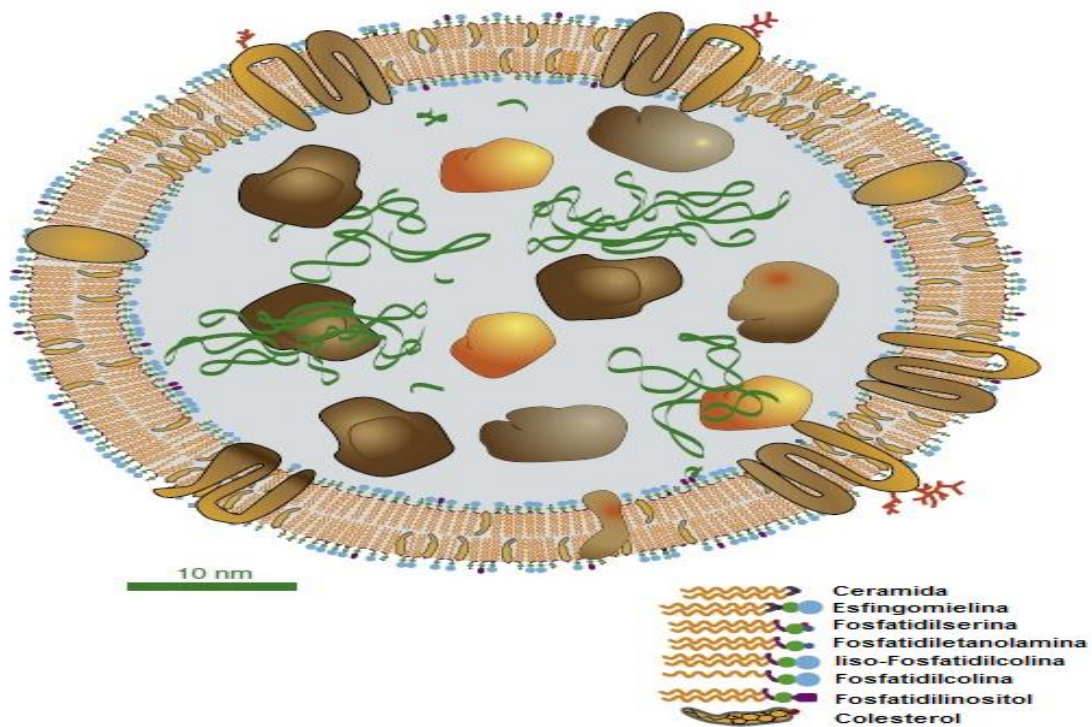


Figura 1.9.1. Representação de um exossomo de tamanho intermediário (60 nm). Proteínas (marrom) e RNAs (verde) estão esquematizados no interior. Os lipídeos na membrana estão nas proporções em que se apresentam na maioria dos exossomos derivados de células. As ramificações representam as cadeias de polissacarídeos e as quantidades estão demonstradas de forma especulativa. (Adaptado de VLASSOV *et al.*, 2012).

A biogênese dos exossomos é um processo altamente regulado por várias moléculas sinalizadoras e começa com a ativação da célula receptora, que é única para cada tipo de célula (KELLER *et al.*, 2006).

Devido à sua origem celular, os exossomos possuem em sua membrana proteínas específicas da via endosomal que atuam como seus marcadores em amostras enriquecidas e purificadas, quando comparadas a amostras não purificadas. Dentre estes, pode-se citar as tetrapaninas-proteínas que constituem uma superfamília que se organiza na forma de microdomínios na membrana plasmática, formando *clusters* e interagindo com uma grande variedade de proteínas de sinalização transmembranas e/ou citosólicas- CD63, CD9 e CD81, proteínas heat shock (HSP70) e proteínas da família Rab, como Tsg101 e Alix (BORBRIE *et al.*, 2011; van der pol, *et al.*, 2012). Em relação aos exossomos, análises de lipidoma e proteômica- contidos no banco de dados Exocarta - (SIMPSON *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013) tem mostrado que estas nanovesículas possuem um certo padrão na composição lipídica e protéica.

Inicialmente, foi proposto que os exossomos eram responsáveis apenas pela remoção de moléculas desnecessárias que não haviam sido degradadas devidamente pelo sistema lisossomal (SCHOREY ,BHATNAGAR, 2008). De forma geral, as células se comunicam ou por vias de contato direto, através de uma sinalização justácrina, ou via mediadores solúveis, por meio de sinalizações autócrinas, parácrinas e/ou endócrinas (THERY *et al.*, 2002; SIMPSON, *et al.*, 2008). No entanto, com o avanço das pesquisas, as funções destas nanovesículas se mostraram mais complexas. Um recente estudo foi realizado com o objetivo de entender melhor o papel dos exossomos e observou-se que estas nanovesículas atuam em complexos mecanismos relacionados à comunicação célula-célula, da célula com seu meio extracelular e da mesma com sítios mais distantes (El, *et al.*, 2013). Além disso, outros estudos mostraram que os exossomos podem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento de doenças, tais como o câncer (SCHOREY, BHATNAGAR, 2008; VLASSOV, *et al.*, 2012).

Sendo assim, verificou-se que muitos tipos de proteínas, RNAs (incluindo microRNAs, lncRNAs) (VINCIGUERRA, STUTZ, 2004), produtos de vias de sinalização, vírus, dentre outros, podem ser transportados através dos exossomos (FEVRIER, *et al.*, 2005). (Figuras 1.9.2 , 1.9.3 e 1.9.4).

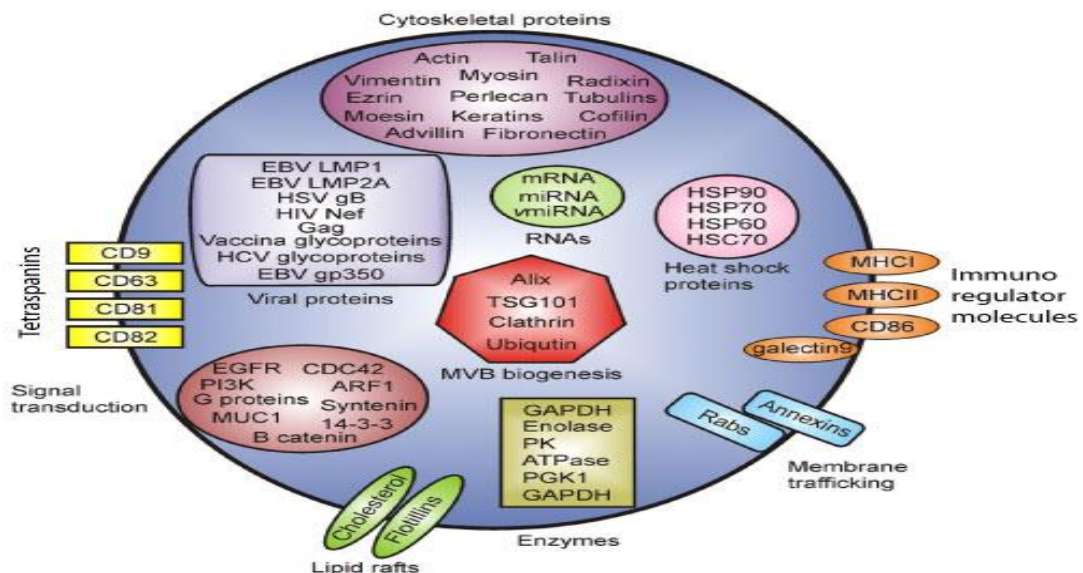


Figura 1.9.2. Conteúdo dos exossomos. Os exossomos possuem em sua membrana proteínas específicas das células de origem, bem como as chamadas tetraspaninas CD9,CD63,CD81 e CD82, que são consideradas marcadoras de exossomos em amostras purificadas. Estas nanovesículas também podem conter micro RNAs (miRNA), *Epstein Bar Vírus* (EBV), proteínas *Heat Shock*, RNAs longos não codificantes (lncRNAs), dentre outras moléculas. (Adaptado de Meckes and Traub, 2011).

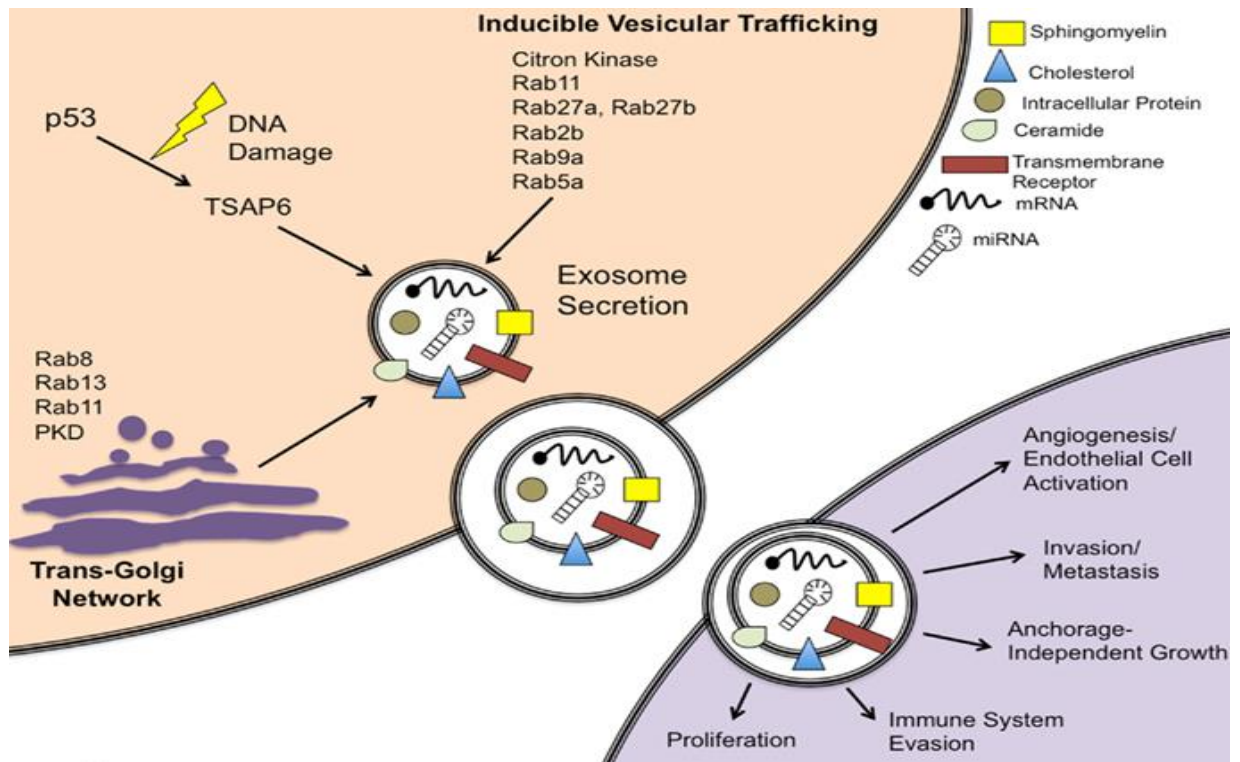


Figura 1.9.3. Constituintes dos exossomos e possíveis modulações nas células-alvo. Constituintes dos exossomos e possíveis modulações nas células-alvo. Os exossomos podem induzir angiogênese, metástase, crescimento independente de ancoragem, evasão do sistema imune e proliferação nas células receptoras. (Adaptado de Henderson and Azorsa, 2012).

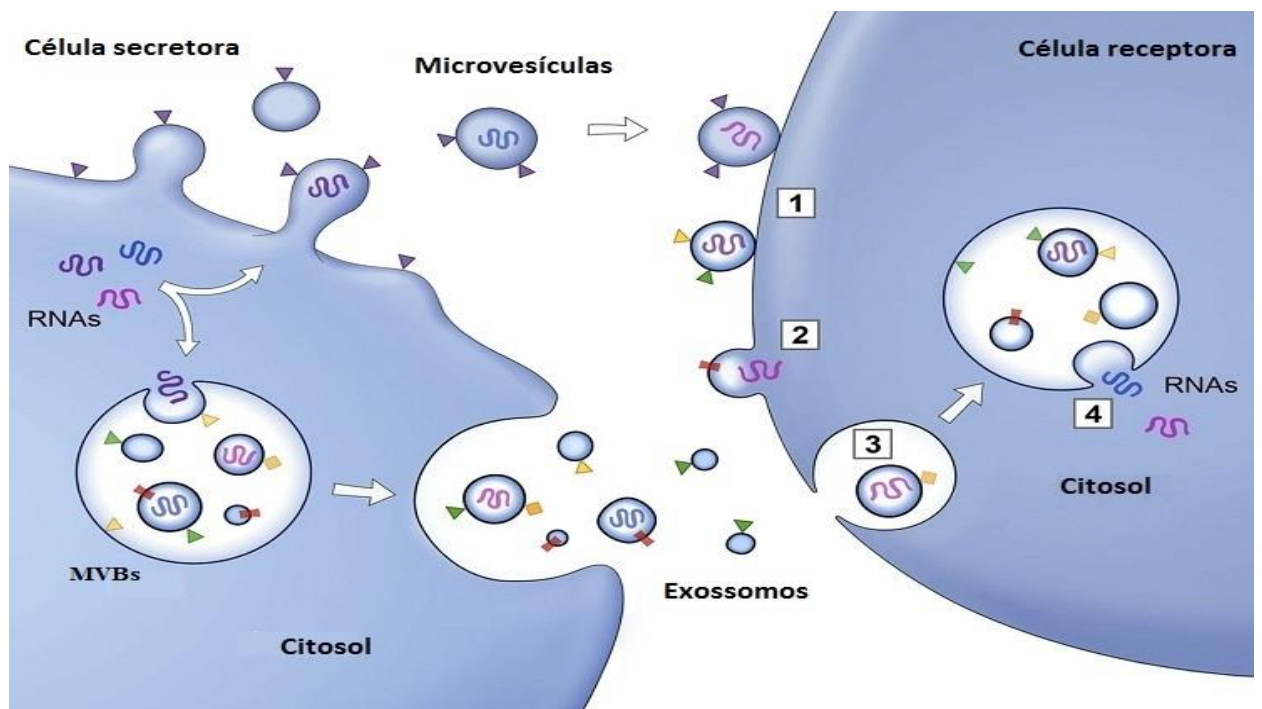


Figura 1.9.4. Esquema de secreção de moléculas através dos exossomos. Os corpos multivesiculares são formados no interior do compartimento endossomal da célula secretora. Após fusão dos MVBs na membrana plasmática, os exossomos são liberados por exocitose, carregando consigo parte do conteúdo molecular da célula de origem. A célula receptora recebe estas nanovesículas, e pode assim, ter sua expressão gênica modulada. (Adaptado de Raposo e Stoorvogel, 2013).

1.10. Exossomos e câncer

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplas etapas, nas quais os exossomos desempenham papéis importantes, principalmente relacionados ao transporte de moléculas bioativas entre as células. Exossomos derivados de câncer (*câncer derived exosomes- CDEs*) desempenham um papel importante na formação do microambiente do tumor por permitir a fuga de células tumorais para o sistema imunológico e ajudando no início do processo da resposta inflamatória; atuando em fibroblastos e na diferenciação de células mesenquimais em miofibroblastos; no início do processo angiogênico e no aumento da evolução do tumor metastático, promovendo transição epitélio- mesênquima e por promover preparação de novos nichos leucêmicos em novas localizações anatômicas (**Fig. 1.10**). Desde a descoberta de que os exossomos trazem consigo o perfil de conteúdo de

adequados para o diagnóstico do câncer. Exossomos podem ser adquiridos através de procedimentos não invasivos, abrindo assim novas possibilidades terapêuticas, tais como a utilização de vetores para entrega de drogas específicas (RODRIGUES, *et al.*, 2014).

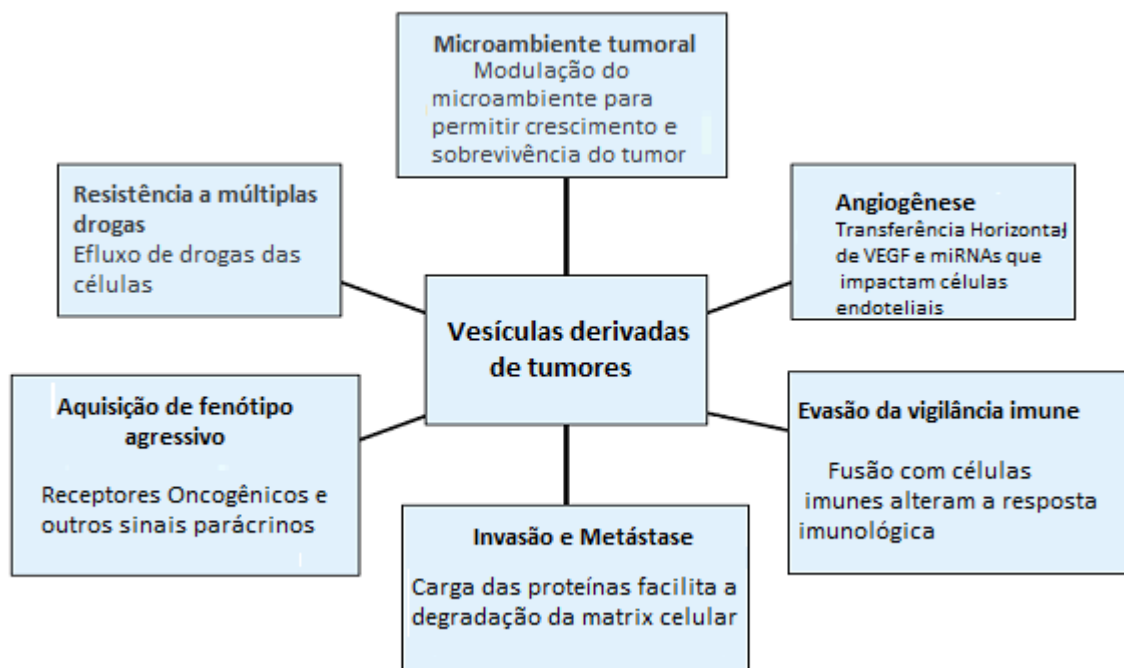


Figura 1.10. Fenômenos e processos induzidos pela secreção dos exossomos. Os exossomos, carregando consigo o conteúdo molecular da célula de origem, ao atingir a célula-alvo, pode induzir evasão da vigilância

imune, metástase, resistência a múltiplas drogas, modulação do microambiente e promover processos, como a angiogênese. (Adaptado de Muralidharan *et al.*, 2010).

Recente estudo mostrou que os exossomos derivados de células neoplásicas podem alterar a matrix extracelular através da secreção de metaloproteinases (MMPs) ou por ativadores de metaloproteinases, como HSPs e MMP, que são as endopeptidases de membrana de plasma dependentes de zinco que podem degradar as proteínas da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos, fibronectinas e lamininas (HANNAFON e DING, 2013). Hakulinen *et al.*, (2008) mostraram que exossomos derivados de fibrosarcoma e melanoma podem secretar MT1-MMP hábeis para ativar pró-MMP2 e degradar colágeno e gelatina. Outro estudo demonstrou que Hsp90 é também secretado via exossomos e pode ativar MMP2 para aumentar a invasão de células cancerosas (MCCREADY *et al.*, 2010).

O lúmen exossomal é envolto por uma bicamada lipídica enriquecida em lipídeos associados como o colesterol, diglicerídeos, esfingolipídeos-como a esfingomielina e ceramida-, fosfolipídeos, glicerofosfolipídeos, como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e poliglicerolfosfolipídeo (RECORD, *et al.*, 2014).

Em geral, esta composição confere rigidez para a vesícula, a qual confere estabilidade dos exossomos nos fluidos biológicos e meios de cultura de células (RECORD, *et al.*, 2014). A presença de PS na membrana externa dos exossomos pode funcionar no reconhecimento dos exossomos e internalização pelas células receptoras (ZAKHAROVA, *et al.*, 2007).

Um das características marcantes dos exossomos é o fato de que eles carregam consigo quantidades significantes de ácidos nucleicos, incluindo miRNAs e mRNA, bem como DNA mitocondrial (mtDNA), long non coding RNAs (lncRNAs), RNA ribossomal (rRNAs), RNAs pequenos nucleares (snRNAs), RNAs pequenos nucleolares (snoRNAs) e RNA de transferência (tRNA) (GAJOS-MICHNIEWICZ, *et al.*, 2014).

Propostas recentes em leucemias indicam que o microambiente tumoral da medula óssea pode promover a liberação de exossomos com conteúdo protéico e molecular capaz de modular a expressão gênica de células alvo. Estudos em leucemia mielóide crônica (LMC) demonstraram que diversas moléculas secretadas por exossomos, contribuem para a angiogênese (TAVERNA, *et al.*, 2012). Cai, *et al.*, (2014), demonstraram que o gene híbrido BCR-ABL pode ser transferido a partir de células K562 para neutrófilos e diminuir a sua atividade fagocítica *in vitro*. O grupo injetou os exossomos na veia da cauda de ratos Sprague-Dawley (SD), e estes desenvolveram algumas características da LMC, como fraqueza, febre,

emagrecimento, esplenomegalia e neutrófilos com reduzida atividade fagocítica. A importância fisiopatológica da transferência de genes tumorais através de vesículas extracelulares *in vivo* pode representar um mecanismo importante para tumorigenese, para a progressão do tumor e metástase.

Correntes de pesquisas atuais acreditam que as células-tronco leucêmicas, resistentes ao tratamento principal, não são completamente dependentes de BCR-ABL para sobreviver, demonstrando a importância da investigação de novos processos que promovam a regulação do nicho/microambiente da medula óssea de pacientes. Dentro desta perspectiva, os estudos em larga escala fornecem uma maior gama de dados proteômicos e de expressão gênica, nos fornecendo possíveis candidatos e vias de sinalização específicas alteradas em processos neoplásicos. Neste estudo, foi utilizado a análise proteômica quantitativa como estratégia principal de identificação do perfil de expressão protéica diferencial entre pacientes com LMC em fase crônica e doadores de medula óssea.

1.11. Análise proteômica

O termo "proteômica" foi primeiramente introduzido por Marc Wilkins (DOMON e AEBERSOLD, 2006), com o objetivo de caracterizar globalmente todos os componentes em um proteoma e analisar as funções, modificações e interações entre as proteínas. Sendo assim, é a ciência que estuda de forma global o perfil de expressão protéica presente em células, tecidos e fluidos biológicos.

Em 1973, Baldwin e McLafferty descreveram a associação entre a cromatografia líquida (*LC-liquid chromatography*) e a espectrometria de massas (*MS-mass spectrometry*) (LC-MS), o que representou um avanço significativo da técnica para a realização do proteoma. Outra melhoria relevante feita no campo de LC-MS foi a capacidade adicional de separação e aquisição com MS em tandem (MS/MS), uma vez que dois espectrômetros de massa em série aumentam significativamente o poder da MS, especialmente na elucidação de estruturas moleculares e análise de moléculas específicas e seletivas, fazendo com que a técnica se tornasse mais atrativa nas aplicações biomédicas (HOFFMAN, 1996).

LC-MS/MS é atualmente uma técnica amplamente aceita para mensurar quantitativamente os metabólitos endógenos pequenos de fluidos biológicos, como urina, sangue, extratos de tecidos e plasma. Além de fornecer resultados com alta especificidade

analítica, sensibilidade e agilidade, permite a análise de muitas amostras em um único ensaio (BOŽOVIĆ e KULASINGAM, 2013).

As estratégias quantitativas em espectrometria de massas são classificadas em duas categorias: ligadas a isótopos estáveis e *label-free*. A teoria de um isótopo estável como ligante parte do pressuposto que um peptídeo ligado a um isótopo estável é quase quimicamente idêntico ao seu correspondente nativo, permitindo que dois peptídeos possam se comportar de forma idêntica durante análise cromatográfica e de espectrometria de massas, exceto por suas diferenças de carga e massa (relação m/z), a qual pode ser detectada pelo MS. A quantificação relativa é adquirida por comparação de suas respectivas características abundantes, como intensidade de íons detectados pelo MS (WOLF-YADLIN, *et al.*, 2007).

Recentemente, métodos proteômicos quantitativos que não requerem nenhuma marcação química adicional, denominadas *label-free*, se tornaram populares devido seu baixo custo de materiais e dispensa dos procedimentos relacionados a ligação de reagentes, além da capacidade de quantificar amostras se livrando de possíveis problemas que podem surgir quando há baixa eficiência de ligação (VOGESER, 2003). Esta modalidade de análise quantitativa está se tornando mais popular e extremamente robusta quando aliada a cromatografia líquida bidimensional em nano escala, seguida da espectrometria de massas (Nano LC- MS/MS). Essas duas estratégias associadas permitem a quantificação de proteínas e metabólitos com excelente especificidade, permitindo a identificação de vias de sinalização alteradas entre as condições patológicas comparadas.

Uma vez que o conteúdo protéico de exossomos de plasma de pacientes com LMC em fase crônica ainda não foi realizado, um dos objetivos principais deste trabalho foi identificar as proteínas diferencialmente expressas entre estes pacientes e doadores saudáveis de medula óssea, além de identificar os lncRNAs envolvidos na possível sinalização entre as células-tronco hematopoiéticas e leucêmicas com seus respectivos nichos hematopoiéticos, através de técnicas e estratégias de análise em larga escala (*high throughput*).

II. JUSTIFICATIVA

As evidências descritas estimulam estudos mais detalhados a respeito do conteúdo molecular existente dentro de exossomos purificados do plasma de medula óssea de pacientes com LMC ao diagnóstico. Estudos anteriormente realizados pelo grupo com plasma de

pacientes com LMC tratados com TKIs já foram descritos, sugerindo a participação de exossomos nesta doença (PIZZATTI *et al.*, 2012).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter uma fração de exossomos enriquecidos do plasma de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica- em fase crônica- e de doadores de medula óssea e realizar análise proteômica e identificação dos RNAs longos não codificantes no interior destes exossomos.

3.2. Objetivos específicos

- Enriquecer os exossomos de plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica e de indivíduos saudáveis (doadores);
- Caracterizar por citometria de fluxo e microscopia eletrônica os exossomos de plasma de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica e de indivíduos saudáveis (doadores);
- Caracterizar, por citometria de fluxo, as populações celulares que podem secretar majoritariamente os exossomos no plasma da medula óssea;
- Identificar a expressão protéica dos exossomos de plasma de pacientes e doadores saudáveis por análise proteômica quantitativa *label-free*.
- Identificar os RNAs longos não codificantes presentes nos exossomos de pacientes e doadores através de RT-qPCR Array.

- Realizar análise *in silico* das vias de sinalização alteradas nas análises em larga escala.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Câncer (INCA) com o número 114/04 e no CONEP com número 813/2006 e todo material foi utilizado após assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos doadores de medula óssea e dos pacientes. As amostras de medula óssea de pacientes com LMC e de doadores foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA). O diagnóstico clínico da LMC foi confirmado em laboratório, por meio de análises citogenéticas e moleculares.

Para o estudo uma coorte de plasma de medula óssea de treze pacientes em fase crônica da doença (ao diagnóstico) e outro pool de quatorze doadores foram utilizados para a realização do trabalho. Estas amostras foram obtidas no banco de doadores de medula óssea do Centro de Transplante de Medula Óssea- CEMO, do INCA.

Apesar do viés que uma amostra em *pool* pode causar, uma vez que pode apresentar moléculas e/ou substâncias de apenas um integrante das amostras, pode-se minimizar este efeito através da escolha de critérios que estejam presentes em todas as amostras. Para minimizar a heterogeneidade dos resultados, possibilitar a realização das análises em *pool* e uniformizar a interpretação dos dados, durante a seleção dos pacientes, alguns fatores foram levados em consideração. Sendo assim, a presença do cromossomo Ph (Ph⁺) em mais de 90% das células na medula, a ausência de tratamento (pacientes diagnosticados sem uso de qualquer medicamento), fase crônica da doença e rearranjo molecular (BCR-ABL) presente, foram os critérios de inclusão para a formação do *pool* de amostras dos pacientes.

4.2. Obtenção de uma fração de exossomos enriquecimento do plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e doadores de medula.

Para a purificação dos exossomos do plasma de medula óssea de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica e de doadores, a amostra de sangue de medula óssea foi centrifugada em tubo Falcon de 15 mL por 15 minutos a 1500 rpm em centrífuga clínica. Após a centrifugação, o plasma foi retirado e armazenado em eppendorfs de 1,5 mL com 1 μ L de Inibidor de protease (GE) e armazenado a -20°C até sua utilização.

Para o enriquecimento dos exossomos do plasma de medula óssea foi utilizado o kit ExoQuick (System Biosciences Inc.), segundo instruções do fabricante. O reagente Exoquick contém um polímero de fórmula não revelada pelo fabricante que precipita vesículas que contenham de 40-100nm. Assim, 250 μ L de ExoQuick foram adicionados ao total de 1 mL de amostra do pool de plasma de medula óssea dos pacientes e doadores separadamente. As soluções foram homogeneizadas por inversão, e armazenadas em tubos Falcon de 15 mL. As amostras foram então incubadas a 4°C por 30 minutos e posteriormente centrifugadas a 1500 g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram novamente centrifugados a 1500 g por 5 minutos e novamente os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, os pellets foram lavados duas vezes com 1 mL de água destilada em tubos Falcon. Posteriormente, as amostras foram divididas em duas alíquotas de 500 μ L em eppendorfs diferentes. Uma alíquota foi submetida à citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão e a outra à análise de proteínas tanto para os pacientes quanto para os doadores.

4.3. Extração de proteínas dos exossomos enriquecidos

Para a extração de proteínas, foi acrescentado ao pellet, tampão de extração de proteínas (Hepes 100mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 5 mM, 0,5 mM EDTA, Glicerol 35%, β -Glicerolfosfato 0,1 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, DTT 0,1 mM) e novamente o inibidor de proteases. Para cada 100 μ L de tampão de extração de proteínas, foi utilizado 1 μ L de solução de inibidor de protease. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, submetidas a congelamento em nitrogênio líquido, seguida de descongelamento manual. Posteriormente foram centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em novos eppendorfs identificados e foram armazenados até sua utilização em freezer -70°C.

4.3.1. Quantificação dos extratos protéicos dos exossomos enriquecidos

Os extratos protéicos foram quantificados de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração dos extratos foi determinada de acordo com uma curva padrão, estabelecida pela medida de densidade ótica de diluições pré-estabelecidas de albumina sérica bovina (BSA), adicionadas ao reagente de Bradford (Coomassie Brilliant G-250 0,001%, Etanol 4,75% e Ácido Fosfórico 8,5%). A leitura foi realizada a 595 nm.

4.4. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo dos exossomos

As análises de citometria de fluxo foram realizadas com a supervisão do Dra Luíze Lima funcionária do Laboratório de Imunologia do CEMO, INCA, seguindo o protocolo abaixo.

Tetraspaninas tais como CD63, CD9 e CD81 encontram-se normalmente expressas na superfície de exossomos e por isso, têm sido utilizadas como marcadores para confirmação de enriquecimentos de exossomos em diferentes estudos (ESCOLA *et al.*, 1998, CLAYTON *et al.*, 2001, CABY *et al.*, 2005).

Portanto, para a caracterização dos exossomos por citometria de fluxo, estes foram primeiramente capturados por anticorpos monoclonais anti-CD63 (**Fig. 4.1**), conjugado a AlexaFluor 647, (BD Biosciences), adsorvidos em beads de látex de 4 µm de diâmetro (Aldehyde/sulfate, 4% m/v, Invitrogen). Brevemente, 10 µL de beads ($2,4 \times 10^7$) foram diluídas em 40 µL de tampão MOPS 25 mM e centrifugados a $3.000 \times g$ por 20 min. O pellet foi lavado em 100 µL de tampão MOPS e, após nova centrifugação, diluído em 20 µL de tampão MOPS. As beads foram então incubadas com 5 µg de anticorpo anti-CD63 por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de tampão MOPS à amostra, a qual foi incubada overnight à temperatura ambiente e centrifugada novamente a $3.000 g$ por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido lavado duas vezes em 100 µL de PBS. O precipitado final foi então ressuspensionado em 10 µL de PBS/BSA 1% e dividido em duas alíquotas de 5 µL.

Para a captura dos exossomos nas beads conjugadas a anti-CD63, uma alíquota foi incubada com volume de amostra de exossomos (purificados através do reagente ExoQuick, como já mencionado) correspondente a 40 µg de proteínas totais e diluída em PBS de modo a obter-se concentração final de BSA 0,1%. Uma alíquota controle foi incubada apenas com

PBS (sem exossomos). As amostras foram então mantidas à temperatura ambiente por duas horas, centrifugadas a 3.000 *g* por 20 min e lavadas duas vezes em 500 µL de PBS/BSA 0,5%. O pellet final foi então ressuspensionado em 250 µL de PBS/BSA 0,5%, de modo a obter-se a concentração de 10⁶ beads/20 µL.

Para análise no citômetro de fluxo, 20 µL de beads conjugadas a anticorpo multi-clonal anti-CD63 (BD Biosciences), conjugado ao fluorocromo AlexaFluor 647 (BD Biosciences), incubadas ou não com exossomos, foram marcadas com anticorpos anti-CD9 (BD Biosciences)- conjugado a PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) e anti-CD 81 (BD Biosciences), conjugado a PE (BD Biosciences), em volume final de 100 µL de PBS/BSA 0,5% por 30 min a 4°C. Após a incubação, foram acrescentados 300 µL de PBS a cada tubo, e estes foram centrifugados a 3.000 *g* por 20 min. O pellet obtido foi lavado em 300 µL de PBS, e ressuspensionado em 200 µL desse mesmo tampão. Após esta etapa, as amostras foram transferidas para tubos de citometria para aquisição em citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosciences) posterior análise através do programa Summit (Cytognos S.L.). Os resultados foram obtidos em porcentagem de beads conjugadas a anticorpos anti-CD63⁺-para a captura dos exossomos- e de diferença de média de intensidade de fluorescência (dMIF), correspondente ao número relativo de exossomos capturados pelas beads conjugadas aos anticorpos anti-CD63⁺.

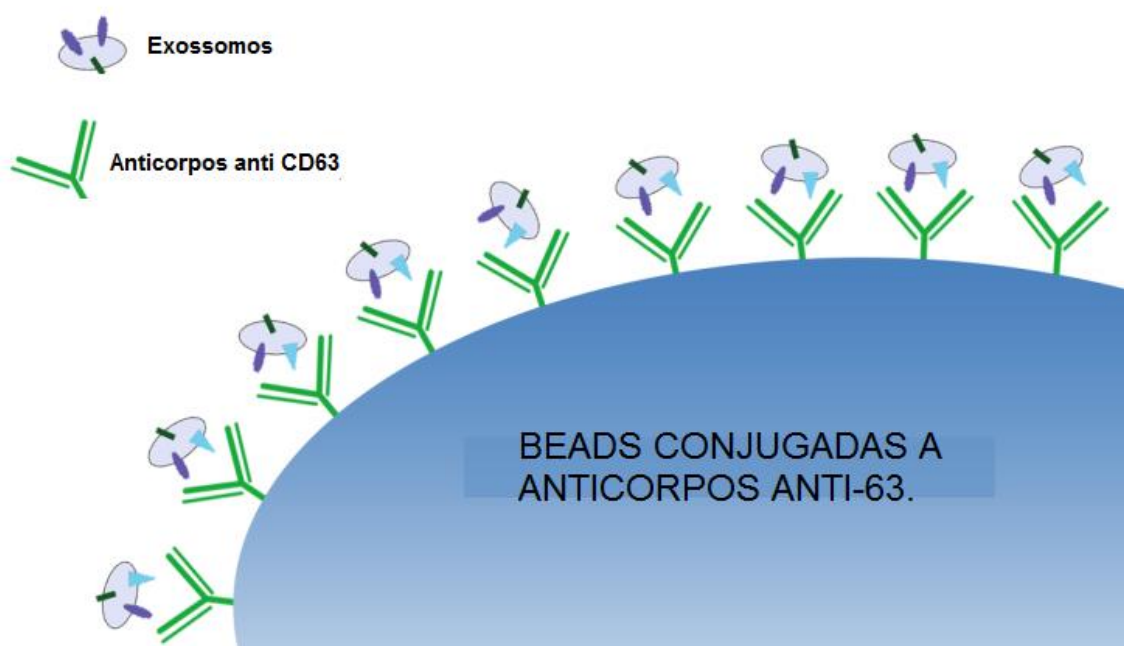


Figura 4. Esquema representativo de beads conjugadas a anticorpos anti-CD63. Beads são conjugadas primeiramente a anticorpos anti-CD63 para posterior captura de unidades variáveis de exossomos CD63⁺.

4.4.1 Caracterização imunofenotípica das subpopulações de células secretoras de exossomos presentes nas amostras de medula óssea de pacientes com LMC

A fim de inferir quais populações de células da medula óssea contribuem para a secreção de exossomos na medula óssea, a técnica de citometria de fluxo foi mais uma vez utilizada. Anticorpos anti-CD63 adsorvidos a beads para a captura dos exossomos foram utilizados. Dessa forma, utilizou-se os seguintes anticorpos: anti- CD90 conjugado ao fluorocromo FITC-5E10 (BD), anti-CD105 conjugado a PE-SN6 (Ebioscience), anti-CD45 conjugado a PercP-2D1 (BD) e anti-CD34 conjugado a PE-8G12 (BD). Os anticorpos anti-CD90 e anti-CD105 foram utilizados por estarem presentes em células-tronco mesenquimais, enquanto que os anticorpos anti-CD45 e anti-CD34, foram utilizados por estarem enriquecidos em células-tronco hematopoiéticas. Além destes, o anticorpo anti-CD61 (marcador de megacariócitos), conjugado ao fluorocromo FITC-RUU-PL7F12 (BD) e anti-CD65 (marcador de linhagem mielóide), conjugado a FITC-88H7 (Beckam Coulter) também foram utilizados para melhor entendimento das características das populações de exossomos presentes na medula óssea dos pacientes. Os dados referentes aos anticorpos e respectivos fluorocromos utilizados podem ser vistos resumidamente no **Quadro 1**.

Quadro 1. Anticorpos e respectivos clones e fluorocromos utilizados para a marcação das subpopulações celulares que podem secretar exossomos majoritariamente.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Marca	Nº catálogo	Concen- tração utilizada
CD45	PercP	2D1	BD	#347464	1:20 (1,25 ug/mL)
CD34	PE	8G12	BD	#348057	1:20 (1,25 ug/mL)
CD105	PE	SN6	eBIOSCIENCE	#12-1057-42	1:20 (10 ug/mL)
CD90	FITC	5E10	BD	#555595	1:20 (25 ug/mL)
CD61	FITC	RUU-PL7F12	BD	#348093	1:20 (0,625 ug/mL)
CD65	FITC	88H7	Beckam	#IM1654U	1:20

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com a supervisão do Dr José Morgado no Instituto Nacional de Câncer seguindo o protocolo abaixo.

Os exossomos concentrados em pellet foram lavados três vezes com tampão PBS e fixadas com o fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 1%, sacarose 0,2 M, CaCl_2 2 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M), por 1h. Posteriormente, foram lavadas com cacodilato 0,1M e pós-fixadas por 1h em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% na proporção 1:1. As amostras foram lavadas novamente em tampão cacodilato 0,1 M, desidratadas em soluções crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos cada e incluídas em resina epon, seguindo para polimerização em estufa a 60°C por 48h. Após esse período, os blocos com o material foram cortados em espessura ultrafina (70nm) em ultramicrotomo Reichert e contrastados com acetato de uranila 5% por 45 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900. Imagens foram feitas utilizando camera digital Megaview^{G2} (Olympus) e a captação e tratamento das imagens foram realizadas através do software ACT-1 (Nikon Corporation).

4.6. Western blot

A expressão da tetrapanina CD81 foi analisada por western blot nas amostras enriquecidas de exossomos como um controle adicional do enriquecimento realizado. Trinta microgramas de proteínas foram utilizadas para separação por eletroforese em gel de acrilamida a 10% e transferido para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em 5% de leite desnatado e incubadas *overnight* com o anticorpo primário. O anticorpo primário anti-CD81 (BD Biosciences) foi utilizado na diluição.

Na sequência, as membranas foram lavadas em PBS-*Tween* 0.1% por 30 minutos e incubadas com anticorpo secundário específico para o anticorpo primário na diluição 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology) 2 horas à temperatura ambiente. A detecção foi realizada através do kit ECL Plus (GE).

4.7. Análise proteômica

Para realizar a análise proteômica do extrato protéico enriquecido de exossomos de doadores e de pacientes com LMC, as amostras foram concentradas em coluna Amicon 3K (miliopore, USA), que equilibradas com tampão bicarbonato de amônio (50mM) através de centrifugação a 4.000 g, por 15 minutos a 16°C. As amostras foram centrifugadas por 1 hora, a 4.000 g e 16°C. O extrato proteico concentrado e já em tampão de digestão enzimática foi novamente quantificado de acordo com o método de Bradford.

Após a quantificação, 200 µg de cada amostra foram submetidas à digestão enzimática para análise proteômica. As amostras foram desnaturadas com 25 µL de RapiGest SF (Waters) por 15 minutos a 80 °C, reduzidas com 2,5 µL de Dietiltritol (DTT, 100 mM) e alquiladas com 2,5 µL de Iodo Acetamida (IAA, 200 mM). A digestão triptica ocorreu overnight a 37°C na razão 1:20 da enzima tripsina para espectrometria de massas (trypsin sequencing grade, Promega) em 50mM de NH₄CO₃. A digestão foi terminada com 10 µL de ácido trifluoro acético (TFA, 5%). Após a digestão as amostras foram centrifugadas a 16.000 g a 6 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em *eppendorfs* diferentes, aos quais foram adicionados 25fmol de Álcool Desidrogenase de levedura digerida (ADH yeast, Waters) e 5% Formiato de Amônio (Fluca) em Acetonitrila (ACN, Tedia). As alíquotas foram então levadas ao Espectrômetro de Massas SYNAPT HDMSE (Waters), acoplado ao Cromatógrafo Líquido NanoAcquity (Waters) para análise proteômica. As proteínas foram identificadas utilizando o programa Protein Lynks 5.0 (Waters) com a ferramenta Expression E e com o banco de dados humano Uniprot (www.uniprot.org), após a digestão das proteínas e passagem pelo espectrômetro de massas, como mostra o esquema do desenho do estudo (Fig.4.2).

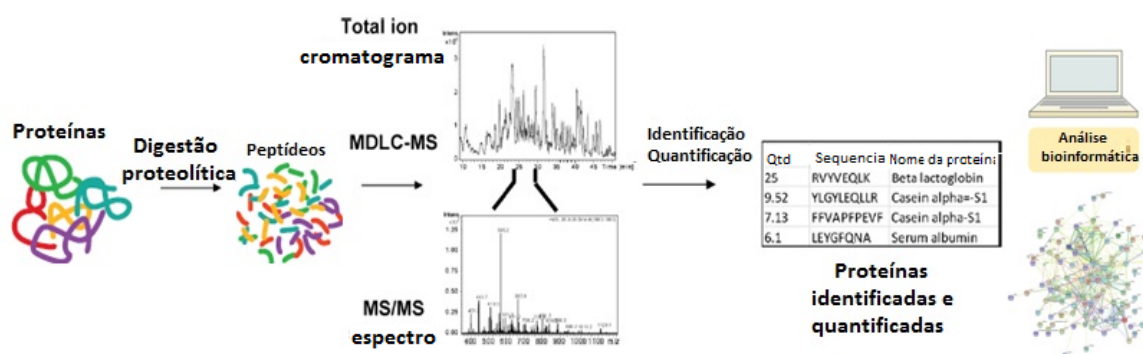


Figura 4.1. Esquema da digestão triptica das proteínas dos exossomos. Os peptídeos foram obtidos após digestão triptica e, assim, separados por cromatografia líquida bidimensional- troca iônica forte e fase reversa. Em seguida, foram analisados pelo espectrômetro de massas e, através do software ProteinLinks, as proteínas foram identificadas e quantificadas, sendo submetidas posteriormente para análises *in silico*.

4.8. Quantificação de proteínas diferencialmente expressas e análise funcional *In Silico*

A identificação e quantificação das proteínas foi realizada no programa ProteinLynx Global Server v2.5.2 (PLGS-Waters) com a ferramenta Expression 2.5.2 (Waters). A quantificação foi baseada em curva padrão (interno) de digestos da proteína Álcool desidrogenase de levedura (ADH yeast, Waters) injetados em conjunto com as amostras analisadas. As amostras inicialmente foram injetadas em volumes distintos e tiveram as contagens iônicas detectadas para cada volume. Com isso foi feita a normalização de injeção para cada amostra que seria comparada. Após a normalização do volume de injeção para que fosse obtida a mesma contagem iônica absoluta, as amostras foram então injetadas em triplicatas experimentais. Os peptídeos digeridos foram separados por cromatografia líquida bidimensional com duas colunas cromatográficas distintas de forma diretamente ligada ao espectrometro de massas. As corridas foram realizadas em 58 minutos cada.

Após a comparação com o banco de dados humano UniprotKB instalado no software PLGS (Waters), somente as proteínas que estavam presentes em todas as réplicas experimentais de cada amostra, foram enviadas automaticamente para a ferramenta de quantificação ExpressionE (Waters) para serem quantificadas individualmente e posteriormente comparadas. As quantificações obtidas em logE foram expressas em razão entre as amostras (pacientes/doadores) por algoritmos que descrevem o software (SILVA et al., 2005; PIZZATTI et al., 2012; SILVA et al., 2006). Após a identificação de cinco fragmentos de ao menos dois peptídeos de cada proteína, as proteínas que possuíam tal reprodutibilidade foram consideradas presentes na amostra e, portanto, estavam presentes na lista final de proteínas. Tal identificação é feita com base no genoma humano traduzido em informação protéica, correspondente ao banco de Dados UniprotKB. A taxa de proteínas falso-positivas é calculada de acordo com outra lista de proteínas, com sequências falsas de peptídeos. A similaridade das proteínas encontradas nas amostras pode ser de até 4% em relação a esta lista *fake*, nos fornecendo então o que é denominado false discovery ratio (FDR). Os valores de FDR de até 4% foram considerados. As proteínas diferencialmente expressas obtidas foram organizadas pela ferramenta ExpressionE de forma estatisticamente significativa entre os grupos com p valor menor que 0.05.

As proteínas identificadas, quantificadas e comparadas nas duas condições foram analisadas em programas de bioinformática com enfoque em biologia de sistemas. O objetivo

dessas análises foi identificar as vias de sinalizações relevantes presentes no interior dos exossomos purificados. As interações das proteínas foram analisadas utilizando o software Metacore GeneGO (GeneGO, Encinitas, CA), FunRich (Functional Enrichment Analysis Tool, versão 2.1.1), iPath 2 (Interactive Pathway Explorer 2 – módulo metabólico) e a base de dados KEGG.

O banco de dados Exocarta (Exosome protein, RNA e lipid database), que contém informações acerca de todas as moléculas já identificadas dentro de exossomos e, disponibilizadas em estudos de vários organismos foi utilizado. Foram feitas comparações das identificações do presente estudo com este banco para obtermos a porcentagem de proteínas inéditas descritas em plasma de medula óssea.

4.9. Análise de expressão dos lncRNAs

4.9.1. Purificação de RNAs longos não codificantes de exossomos de plasma de medula óssea

Para a realização da purificação de exossomos, lise, purificação de RNA e eluição dos mesmos, foi utilizado o kit SeraMir™ Exosome RNA Amplification (System Bioscience). Inicialmente, 500 µL de plasma de pacientes com LMC e outros 500 µL de plasma de doadores foram incubados por 30 minutos a 4°C com 120 µL de ExoQuick cada. Após centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e, aos pellets, foram adicionados 350 µL de LYSIS Buffer.

Após 5 minutos e homogeneização das amostras, 200 µL de Etanol 100% foram adicionados a cada uma das mesmas. Em paralelo, as colunas de centrifugação foram acopladas aos tubos coletores, e as amostras foram transferidas para as colunas de spin. Uma nova centrifugação a 13.000 g por 1 minuto, foi realizada em cada amostra, e o líquido presente no tubo coletor foi descartado. Às colunas de centrifugação, foram adicionados 400 µL de WASH tampão de lavagem, e novamente as amostras foram centrifugadas a 13.000 g, por 1 minuto, este procedimento foi repetido duas vezes e os RNAs presentes nas colunas foram eluídos com 30 µL de ELUTION Buffer e quantificados utilizando NanoDrop.

4.9.2. Síntese do cDNA do RNA extraído

Para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA), o kit Human and Mouse LncProfilers™ qPCR Array Kits (System Bioscience) foi utilizado. Alguns lncRNAs possuem caudas poliadeniladas dessa forma, para aumentar a performance do ensaio de qPCR antes da conversão em cDNA, o kit de síntese de cDNA inclui reagentes com o objetivo de poliadenilar todos os lncRNAs antes da conversão em cDNA. Para a reação de poliadelilação dos RNAs, à 5 µL do RNA total (1 a 2 µg) purificado, foram adicionados 2µL de Buffer 5X PolyA, 1 µL de MnCl₂ 25Mm, 1.5µL de ATP 5Mm e 0.5 µL de PolyA Polymerase, totalizando 10 µL de solução, que foi incubada por 30 minutos a 37°C, utilizando My Cyclor™ thermal cycler (BIO-RAD).

Posteriormente, foram adicionados 0.5 µL de Adaptador Oligo dT à solução de poliadenilação e a solução final foi aquecida por 5 minutos a 60°C no Thermobloco AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet). Ao término do tempo, a solução permaneceu em temperatura ambiente por 2 minutos. Para a síntese do cDNA, foram adicionados à reação anterior 4µL de Buffer RT 5X, 2 µL dNTPd mix, 1.5 µL de DTT 0.1M, 1.5 µL de Random Primer mix e 1 µL de Transcriptase Reversa. A síntese ocorreu a 42°C durante 60 minutos com inativação da enzima a 95°C por 10 minutos, utilizando Thermociclador My Cyclor™ thermal cycler (BIO-RAD).

4.9.3. RT-qPCR array dos lncRNAs

Para determinar o perfil de expressão de lncRNAs o kit LncProfilers™ qPCR Array Kits (System Bioscience) foi utilizado de acordo com instruções do fabricante. As réplicas experimentais foram realizadas em placas de 96 poços distintas (3 placas para cada pool de amostras) contendo 1.750 µL de Buffer 2X SYBER Green qPCR Mastermix, 20 µL de lncRNA cDNA de cada amostra e 1.730 µL de água RNase free, totalizando 3.500 µL de Mastermix. A cada poço da placa de qPCR, foram adicionados 28 µL do mix. A placa do qPCR array contém, liofilizado, um par de primers de lncRNAs em cada poço, totalizando 90 pares, além de cinco pares de RNAs endógenos como normalizadores.

A placa de primers estoques foi ressuspensa com 44 µL de água RNase free por poço. Após a ressuspensão, 2 µL de cada poço com cada par de primers foram adicionado no poço correspondente na placa contendo o mix descrito anteriormente.

O ensaio de qPCR foi realizado no ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies), seguindo o protocolo padrão sugerido pelo fabricante do kit, composto de quatro etapas: um ciclo de 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto final, a 60°C, para leitura dos dados. Para a análise dos dados, o método $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante em planilha de Excel fornecida no kit.

Human LncProfiler qPCR Array

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	21A	7SK	7SL	Air	AK023948	Alpha 280	Alpha 250	ANRIL	anti-NOS2A	antiPeg11	BACE1AS	BC200
B	CAR Intergenic	DHFR upstream	Dio3os	DISC2	DLG2AS	E2F4 antisense	EgoA	EGO B	Emx2os	Evf1 and EVF2	GASS	Gomafu
C	H19	H19 antisense	H19 upstream	HAR1A	HAR1B	HOTAIR	HOTAIRM1	HOTTIP	Hoxa11as	HOXA3as	HOXA6as	HULC
D	IGF2AS	IPW	Jpx	Kcnq1ot1	KRAS P1	L1PA16	p21	RoR	SFMBT2	VLDLR	LOC 285194	LUST
E	Malat1	masrRNA	MEG3	MEG9	MER11C	ncR-uPAR	NDM29	NEAT1	Nespas	NRON	NTT	p53 mRNA
F	PCGEM1	PR antisense	PRINS	PSF Inhibiting	PTENP1	RNCR3	SAF	SCA8	snaR	SNHG1	SNHG3	SNHG4
G	SNHG5	SNHG6	Sox2ot	SRA	STOT	TEA ncRNAs	Tmevpg1	TncRNA	Tsix	TUG1	UCA1	UM9-5
H	WT1-AS	Xist	Y RNA-1	Zeb2NAT	Zfas1	Zfx2as	18S rRNA	RNU43	GAPDH	LAMIN A/C	U6	No assay control

Figura 4.2. Desenho esquemático da placa LncProfilers™ qPCR Array Kits. (System Bioscience) utilizada no ensaio de RT-qPCR. A placa contém 96 poços, sendo que 90 correspondem a 90 pares de primers específicos para determinado lncRNA considerado potencialmente alterado segundo dados da literatura, em vários modelos de doenças. Os poços H7 a H11 contém pares de primers de genes de referência; o poço H12 corresponde o controle negativo do ensaio.

4.10. Análise estatística

Todas as análises estatísticas da análise proteômica foram realizadas com algoritmos específicos dos softwares utilizados. Foi aceito um FDR (false Discovery ratio) de até 4%, proteínas identificadas com no mínimo 2 peptídeos adquiridos com 5 fragmentos e cobertura de no mínimo 50%. Nas análises quantitativas, as diferenças de expressão foram aceitas para proteínas com um p valor menor que 0.005. Para as análises de RT-qPCR foram utilizadas as análises estatísticas contidas na planilha de excel do fabricante do kit. O fluxograma de toda a execução do trabalho pode ser observado na **figura 4.3**.

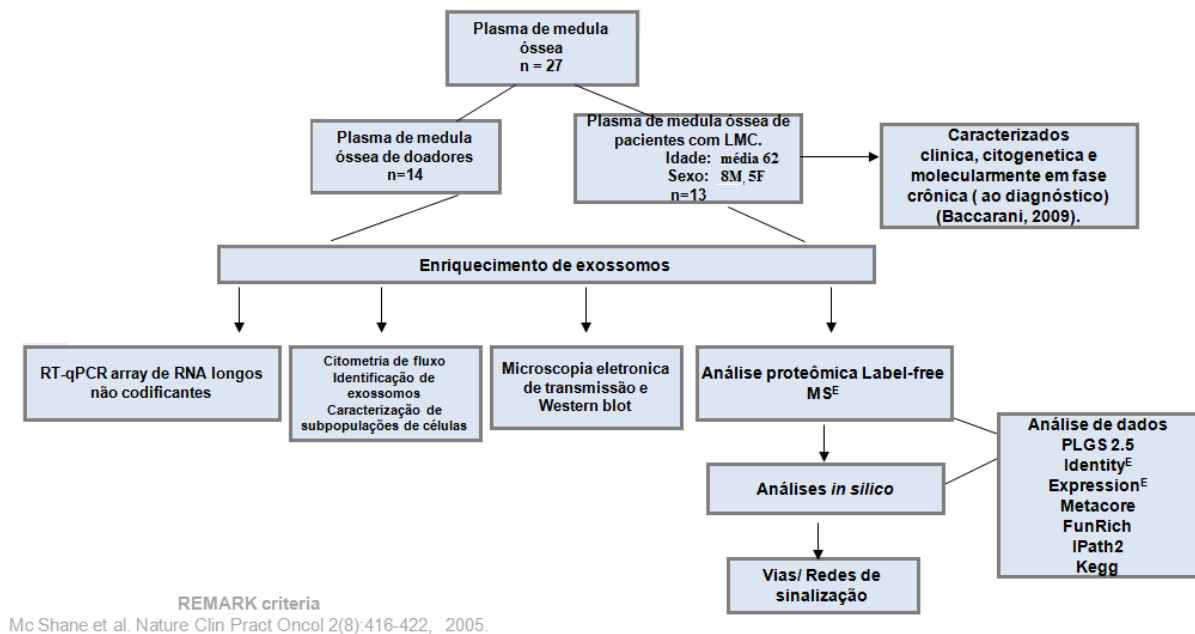


Figura 4.3. Fluorograma do projeto. Após obtenção do plasma de 14 doadores e de 13 pacientes, os exossomos foram purificados e alíquotas do mesmo pool de amostra foram separadas para a realização do RT-qPCR Array, caracterização imunofenotípica, microscopia eletrônica e western blot, além da análise proteômica seguida das análises *in silico*.

V. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos exossomos enriquecidos do plasma de pacientes com LMC e doadores de medula.

5.1.2. Identificação imunofenotípica de exossomos por citometria de fluxo

Os exossomos purificados a partir do plasma da medula óssea de pacientes com LMC-fase crônica e de doadores foram analisados quanto à presença dos marcadores tetraspaninas CD81 e CD9, através da técnica de citometria de fluxo (**Fig. 5, a-f**). Esta abordagem é tradicionalmente realizada em estudos de validação do enriquecimento de exossomos.

Em *a* e *b*, beads conjugadas a anticorpos monoclonais anti-CD63 foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD9 e anti-CD81, podendo-se observar a ausência de marcação positiva, validando o controle. Em *c* e *d*, uma marcação positiva (CD9 36%, CD81 43%) pôde ser observada nos exossomos de doadores (exo MO CTL), que foram previamente capturados em beads conjugadas a anticorpos monoclonais anti-CD63. Em *e* e *f*, observamos que exossomos de pacientes com LMC (exo MO LMC) também foram marcados

positivamente quando incubados com os anticorpos anti-CD9 e anti-CD81 (CD9 35% e CD81 29%).

Em resumo, esse resultado mostra que exossomos contendo as moléculas tetraspaninas CD63, CD9 e CD81 estão presentes nos exossomos enriquecidos do plasma de medula óssea tanto de indivíduos saudáveis, quanto de pacientes com LMC-fase crônica (exo MO LMC). Entretanto, este resultado é qualitativo, uma vez que a fluorescência detectada pelo FACS corresponde à emissão de fluorescência dos fluorocromos conjugados às beads que, por sua vez, estavam acopladas a anticorpos anti-CD63, nas quais os exossomos foram capturados posteriormente.

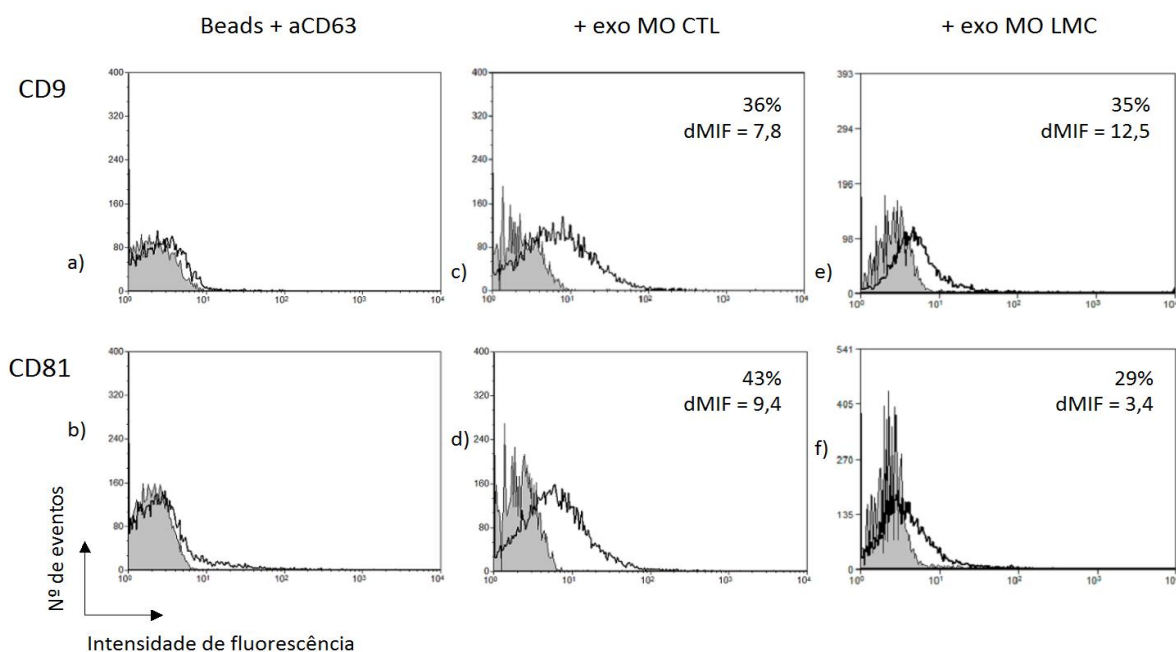


Figura 5. Análise por citometria de fluxo dos marcadores anti-CD9 e anti-CD 81 em exossomos CD63+.

Em a e b, beads conjugadas a anticorpos monoclonais anti-CD63 e incubadas com f anticorpos monoclonais anti-CD9 e anti-CD81, respectivamente. Em c e d, a mesma marcação com exossomos de doadores (exo MO CTL). Em e e f exossomos de pacientes com LMC (exo MO LMC).

5.1.3. Microscopia eletrônica de exossomos enriquecidos de plasma de medula óssea

Exossomos foram isolados, enriquecidos e processados como descrito no item 4.5 para serem submetidos à análise por microscopia eletrônica de transmissão. Na **Figura 5.1**, pode-se observar a presença de exossomos, em escala de 500µm, tanto em amostras frescas (**Fig. 5.1.A**), quanto congeladas (**Fig.5.1.B**). Na primeira, observa-se exossomos com significativo conteúdo em seu interior, enquanto que, na figura **5.1.B**, pode-se inferir que estes encontram-

se relativamente vazios. A microscopia eletrônica de transmissão permitiu validar a presença dos exossomos nas amostras enriquecidas de pacientes com LMC e doadores, conferindo mais robustez quanto à presença dos exossomos nas amostras de doadores de medula e pacientes com LMC.

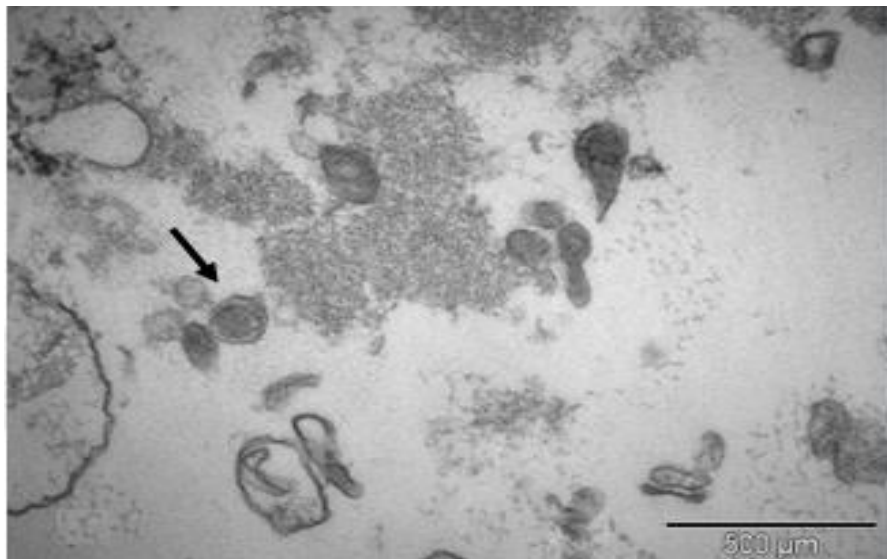


Figura 5.1. Microscopia eletrônica de transmissão. Exossomos mostrados em escala de 500 μ m foram obtidos de amostra de plasma de medula óssea de pacientes com LMC. A seta indica uma dessas nanovesículas. (1 μ m = 1000 nm).

5.1.4. Western Blot para o marcador CD81

As amostras enriquecidas de exossomos foram analisadas por western blot para o marcador CD81, uma tetrapanina sabidamente marcadora para esse tipo de preparação. Na figura **Figura 5.1.2** é possível observar a presença da proteína em extratos proteicos de exossomos enriquecidos de doadores de medula óssea e pacientes com LMC.



Figura 5.1.2. Análise da proteína CD81 em amostras de exossomos purificados a partir do plasma de doadores e pacientes com LMC. Western blot qualitativo, evidenciando apenas a presença, tanto em doadores, quanto em pacientes, de exossomos com tetraspaninas CD81 em sua membrana.

5.2. Caracterização imunofenotípica das subpopulações de exossomos enriquecidos em pacientes com LMC

Após a determinação da presença de exossomos (por citometria de fluxo, microscopia eletrônica e western blot) e consequentemente o sucesso do enriquecimento, a amostra de exossomos enriquecidos, em pacientes, foi analisada com uma série de anticorpos a fim de inferir qual população celular secretou a maior parte dos exossomos presentes no plasma da medula óssea de pacientes com LMC.

Os anticorpos considerados marcadores para células-tronco mesenquimais- como anti-CD90 e anti-CD105- e de células-tronco hematopoiéticas- como anti-CD45 e anti-CD34 (COVAS *et al.*, 2005; HOPPER *et al.*, 2015), foram também incubados aos exossomos conjugados a beads adsorvidas com anticorpos anti-CD63.

Na **Figura 5.2**, na qual pode- se observar que a diferença da média de intensidade de fluorescência (dMIF) foi de **14** para anti-CD45 e **5,7** para anti-CD34. Na **figura 5.2.1.**, pode- se observar graficamente a dMIF para doadores e pacientes, em relação as marcações feitas com anticorpos ani-CD45 e anti-CD34. Numa escala de dMIF com valor máximo de 14, é possível concluir que ha uma possível maior secreção de exossomos CD45⁺ nos pacientes, em relação aos doadores.

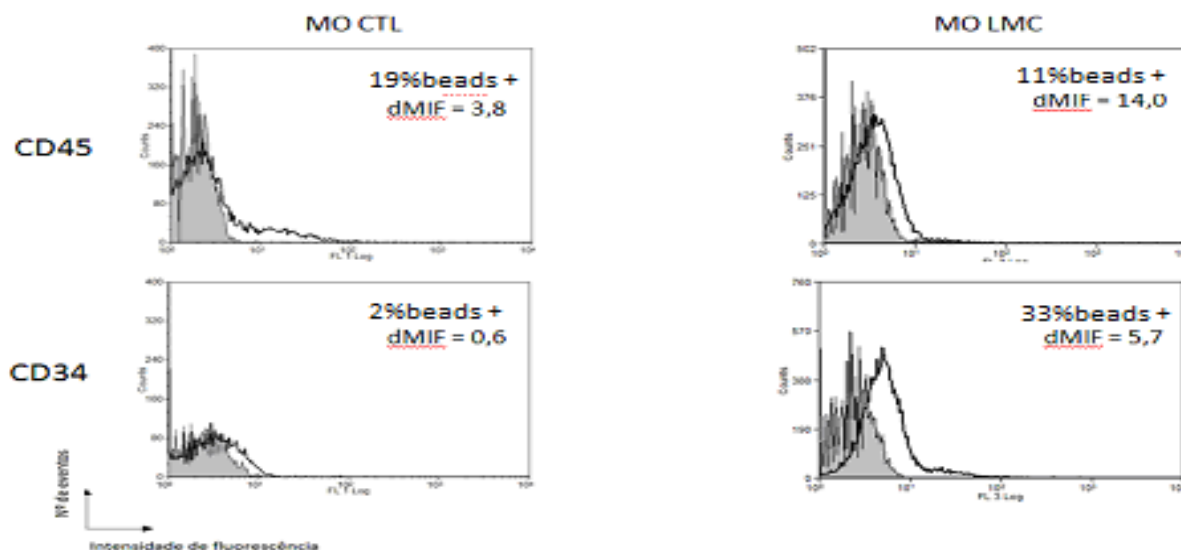


Figura 5.2. Análise dos marcadores anti-CD45 e anti-CD34 em exossomos CD63+. Porcentagem de beads marcadas e de diferença de média de intensidade defluorescência (dMIF), correspondente à quantidade relativa de exossomos capturados pelas beads.

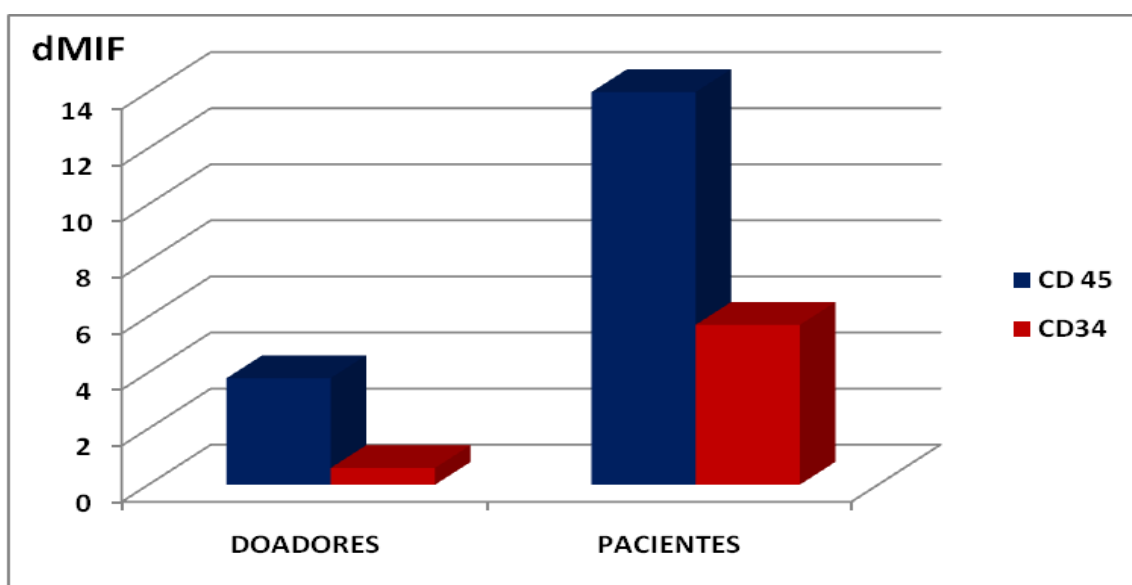


Figura 5.2.1. Visualização gráfica da presença de tetraspaninas CD 45 e CD 34 em exossomos de plasma de medula óssea. Pode-se observar que ambas as tetraspaninas foram observadas com Dmif maior para CD45,nos pacientes, sugerindo maior secreção de exossomos por parte destas células. A secreção de exossomos por células CD 34+ também foi maior entre pacientes em relação a doadores.

Em relação à marcação feita para identificar as tetraspaninas consideradas marcadoras de células tronco mesenquimais (CD90 e CD105) nos exossomos, pode- se observar que a dMIF foi de **44,8** e **37,2**, respectivamente (**Fig. 5.2.2**). Logo abaixo, na **figura 5.2.3**, é possível observar a mesma dMIF graficamente, através da qual podemos inferir que a secreção de exossomos contendo marcadores das células tronco mesenquimais, nos pacientes,

apresenta dMIF de valor próximo a 50, maior que o observado para os marcadores de células progenitoras hematopoiéticas (CD34 e CD45).

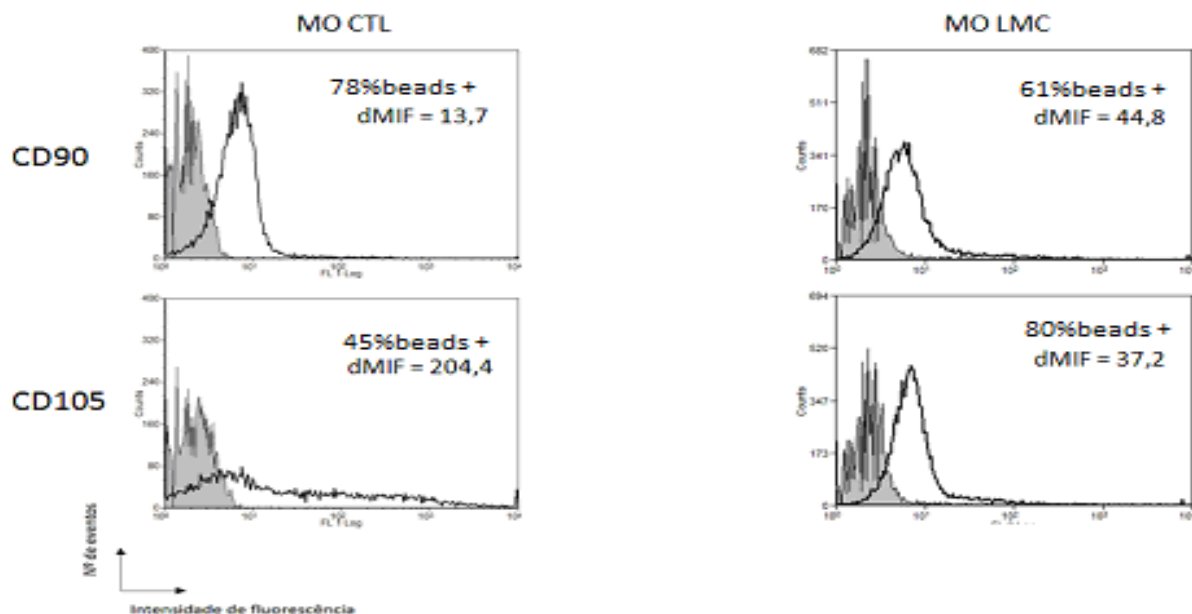


Figura 5.2.2. Análise dos marcadores anti-CD90 e anti-CD105 em exossomos CD63+. Porcentagem de beads marcadas e de diferença de média de intensidade defluorescência (dMIF), correspondente à quantidade relativa de exossomos capturados pelas beads.

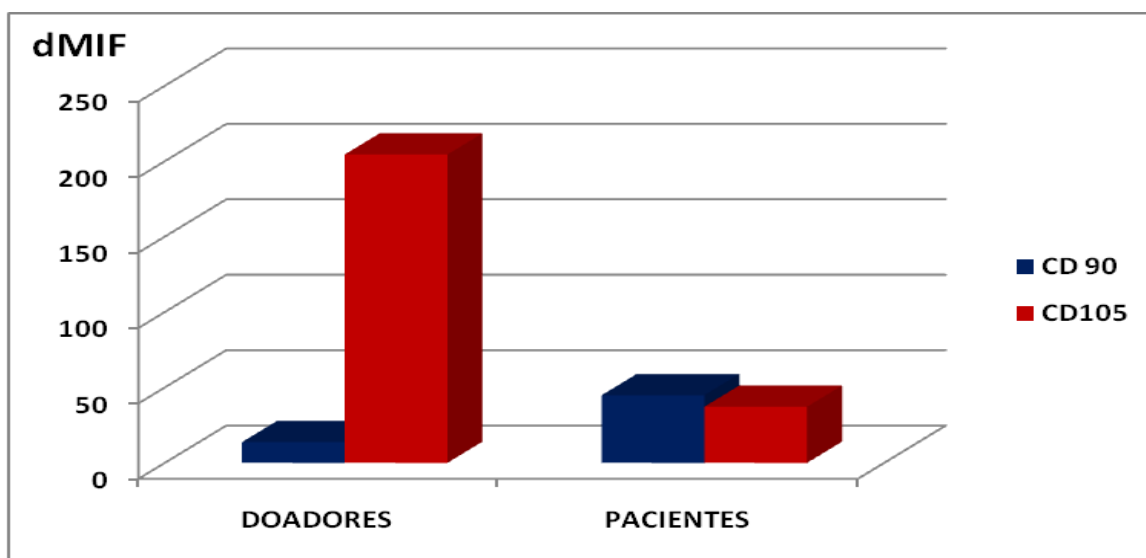


Figura 5.2.3. Visualização gráfica da presença de tetraspaninas CD 90 e CD 105 em exossomos de plasma de medula óssea. Pode-se observar que ambas as tetraspaninas foram observadas com Dmif semelhante entre pacientes, enquanto que nos doadores, houve maior secreção por parte de células CD105⁺. Contudo, a secreção de exossomos pelas células progenitoras hematopoiéticas pode ser considerada menor quando se compara com a Dmif observada nas células mesenquimais (CD 90⁺ e CD 105⁺).

Por fim, foram também incubados aos exossomos conjugados a beads adsorvidas com anticorpos anti-CD63 os anticorpos anti-CD61 e anti-CD65 (enriquecidos em toda a linhagem mielóide, mais especificamente em granulócitos), uma vez que estes são considerados, respectivamente, marcadores de megacariócitos e células mielóides (SCHUMACHER, 2015; UniprotKB). Dessa forma, pode-se observar, na **Fig. 5.2.4**, que a dMIF para pacientes com LMC foi de, respectivamente, **80,93** e **65,45**. Dessa forma, baseado no valor da dMIF de quase 80 para estes marcadores (CD 61 e CD65) (**Fig. 5.2.5**), pode-se inferir que ha uma possível maior secreção de exossomos por parte das células mesenquimais e dos megacariócitos e granulócitos, em relação às células progenitoras hematopoiéticas (marcadores CD 34 e CD45).

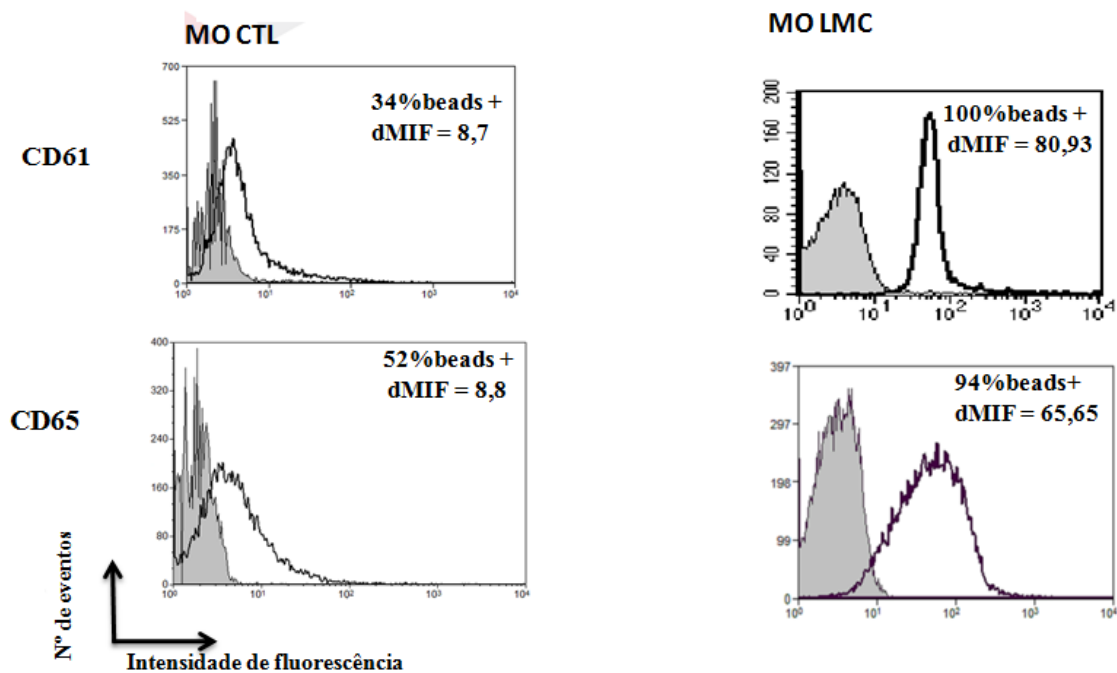


Figura 5.2.4. Análise dos marcadores anti-CD61 e anti-CD65 em exossomos CD63+. Porcentagem de beads marcadas e de diferença de média de intensidade de fluorescência (dMIF), correspondente à quantidade relativa de exossomos capturados pelas beads.

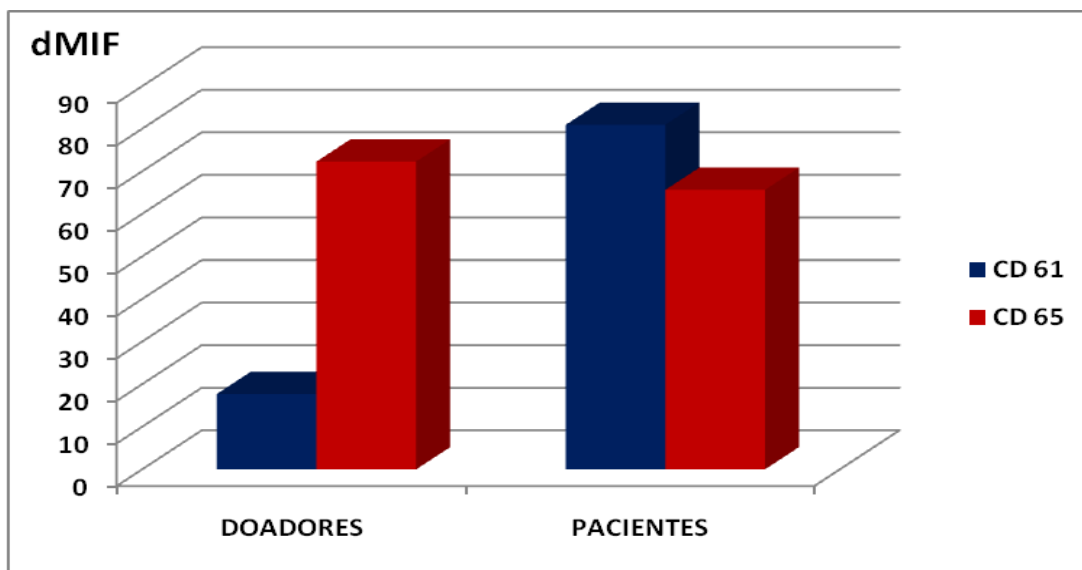


Figura 5.2.5. Visualização gráfica da presença de tetraspaninas CD 61 e CD 65 em exossomos de plasma de medula óssea. Pode-se observar que ambas as tetraspaninas foram observadas com Dmif semelhante entre pacientes, enquanto que nos doadores, houve maior secreção por parte de células CD65⁺.

5.3. Análise proteômica quantitativa *label-free* dos exossomos enriquecidos

Com o objetivo de identificar as proteínas presentes no interior dos exossomos enriquecidos em pacientes com LMC e doadores de medula, a análise proteômica quantitativa *label-free* foi realizada utilizando cromatografia bidimensional acoplada à espectrometria de massas. Após o enriquecimento dos exossomos as proteínas foram extraídas e preparadas para a análise proteômica como descrito na seção materiais e métodos.

Para assegurar a reprodutibilidade e robustez experimental, nesta metodologia, as amostras foram analisadas em triplicata. Nas figuras 5.3 e 5.3.1, pode-se observar a distribuição cromatográfica para cada tréplica experimental injetada, proveniente de doadores e pacientes, respectivamente.

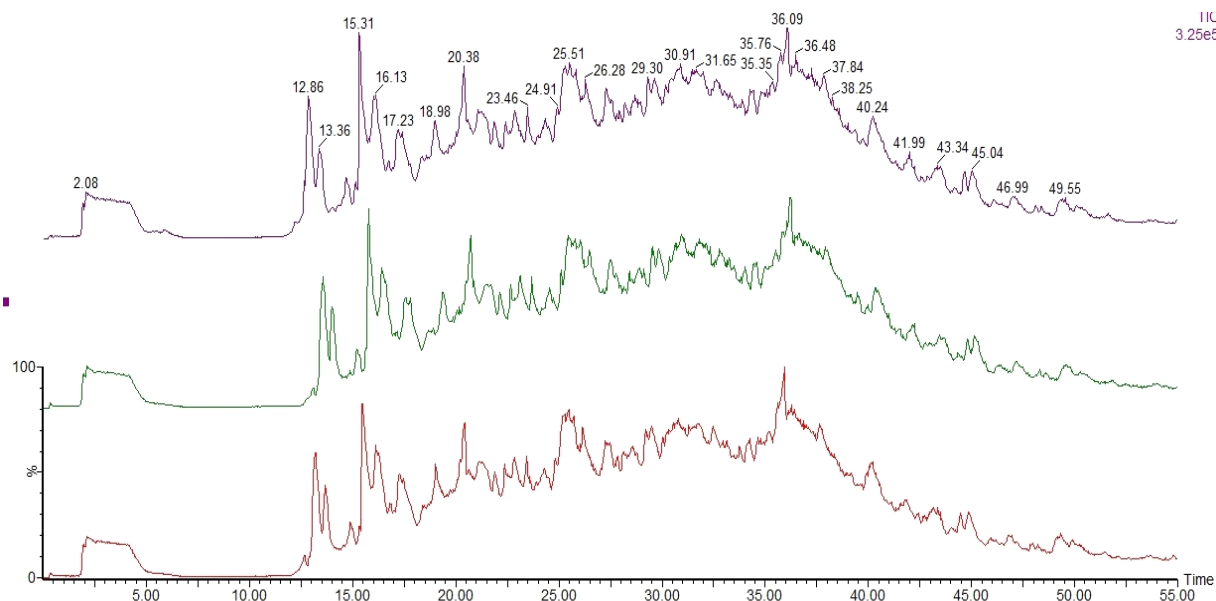


Figura 5.3. Cromatograma bidimensional representativa de triplicatas experimentais de peptídeos tripticos de exossomos enriquecidos de doadores. Cada curva representa uma das três injeções das amostras dos doadores. Pode- se observar que, em um mesmo tempo, em ambas as injeções, peptídeos com mesma carga ou mesma hidrofília ou hidrofobicidade foram detectados no cromatógrafo líquido.

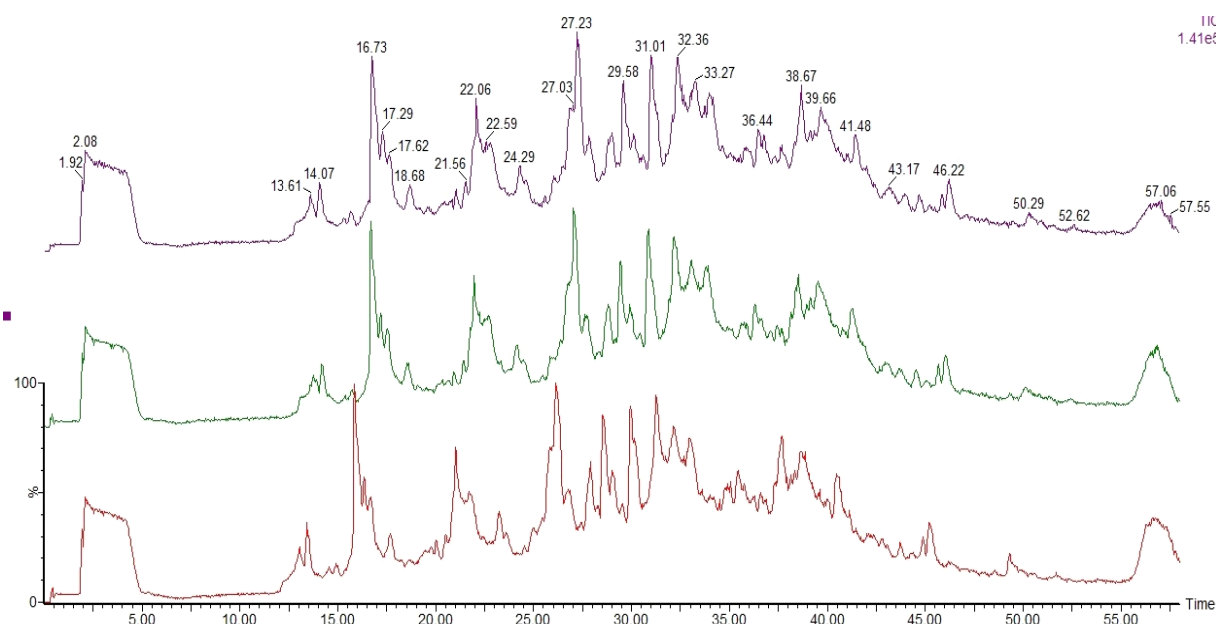


Figura 5.3.1. Cromatograma bidimensional representativo de triplicatas experimentais de peptídeos tripticos de exossomos enriquecidos de pacientes com LMC ao diagnóstico. Cada curva representa uma das três injeções das amostras dos pacientes. Pode- se observar que, em um mesmo tempo, em ambas injeções peptídeos com mesma carga ou mesma hidrofília ou hidrofobicidade foram detectados no cromatógrafo líquido.

Após o processamento dos dados brutos utilizando o programa Protein Lynks Global Sever (Waters), foi possível identificar um total de 5892 proteínas e mais de 58000 peptídeos para as duas amostras, com 2 ppm de erro em 70% do total com um coeficiente de variação de menos de 2%, evidenciando a qualidade e reprodutibilidade dos dados. Os gráficos de

coeficiente de variação (CV) entre as amostras, distribuição da qualidade de identificação e reprodutibilidade entre as triplicatas analisadas estão descritos na **Fig. 5.3.2**.

A Abordagem proteômica *label-free* utilizada gerou uma robusta identificação quando associada à técnica de espectrometria de massas escolhida acoplada a cromatografia bidimensional. Isto foi demonstrado pelos dados de coeficiente de variação e distribuição da qualidade de identificação (**Fig. 5.3.2 c e d**) onde é possível verificar a mesma porcentagem de fragmentação ($42\% + 27\% = 69\%$) para doadores e para pacientes ($38\% + 31\% = 69\%$), o que significa que a normalização, realizada durante as injeções no espectrometro de massas, entre as amostras foi eficiente.

A normalização por espectrometria de massas quantitativa foi realizada através das contagens absolutas dos peptídeos ionizados que foram identificados pelo detector do instrumento. Após uma série de 6 injeções com volumes distintos as contagens absolutas dos sinais foram normalizadas e o volume/fentomol específico para cada grupo amostral foi estabelecido. Com isso as análises foram realizadas em triplicatas experimentais para cada amostra.

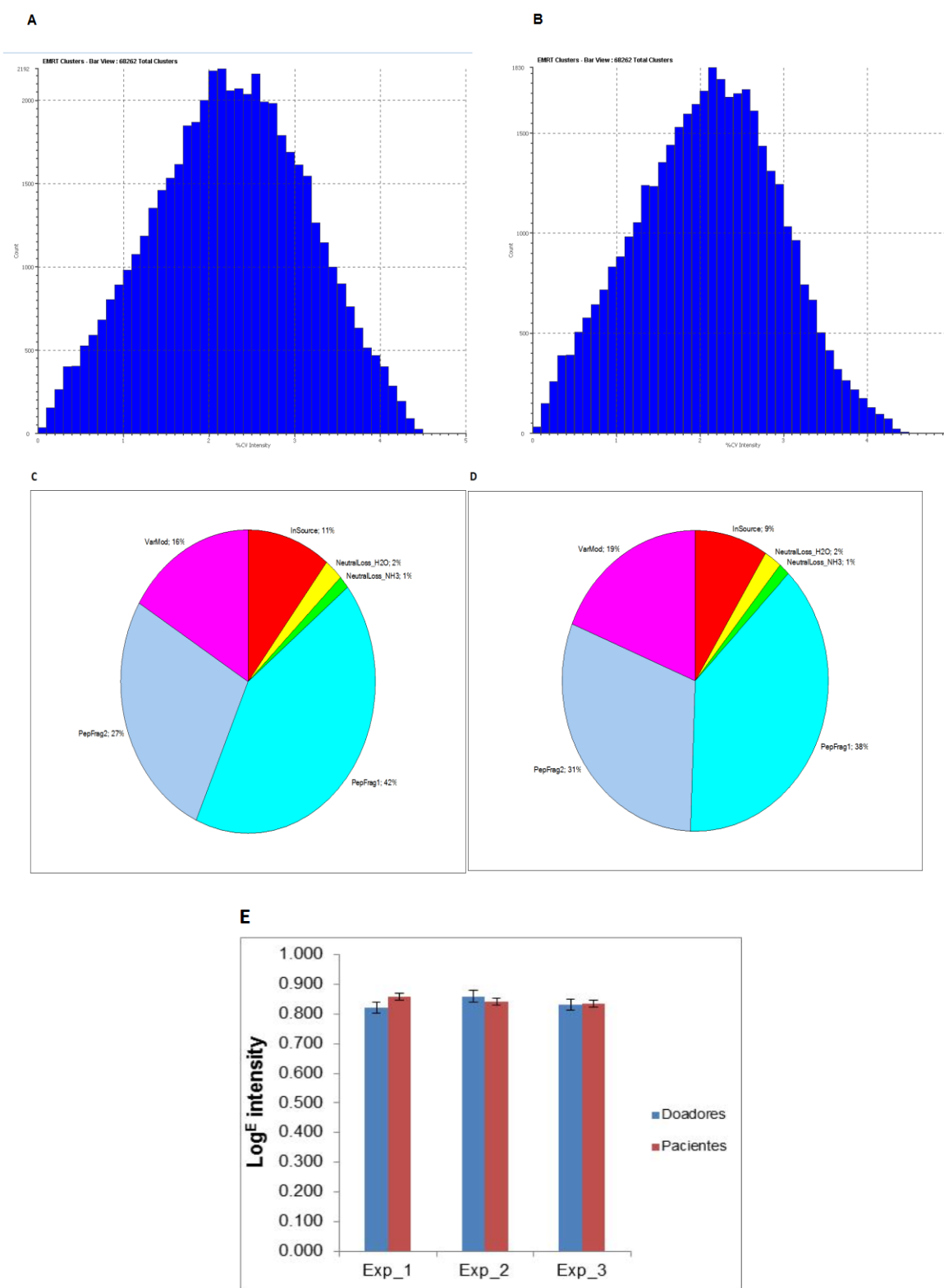


Figura 5.3.2. Análise proteômica *label-free*. Em **A**(doadores) e **B** (pacientes), gráfico do coeficiente de variação entre as triplicatas analisadas. A variação entre as triplicatas foi menor que 2%. Em **C** (doadores) e **D** (pacientes), distribuição da qualidade de identificação no EM. Pode-se observar 69% de fragmentação em ambas as triplicatas realizadas, e que a perda de peptídeos na fonte foi menor que 19% (cutoff) em ambas. Perdas neutras referentes à perda de água durante a colisão Comgás argônio na câmara de colisão totalizaram 3%,. As variações de modificações, referentes à adição de Iodacetamida (IAA) e Dietiltritol (DTT), corresponderam a 16% nos doadores e 19% nos pacientes, valores também aceitáveis para garantir a qualidade de calibração e fragmentação do EM. Em **E**, gráfico de reprodutibilidade em Intensidade logarítmica entre as triplicatas

analisadas; pode-se observar ausência de diferença estatisticamente significativa entre as triplicatas analisadas de doadores e pacientes, dado este que fornece um dado adicional referente à calibração do EM.

Dentre as proteínas identificadas, 3044 proteínas totais (nas duas amostras) apresentaram valor de FDR (*false discovery rate*), abaixo de 4% e por esta razão foram consideradas pelo programa de análise PLGS (Waters) para a posterior análise de expressão.

Além disso, em nossa análise somente foram consideradas proteínas identificadas em todas as réplicas experimentais de cada amostra. Com isso, após utilizarmos este filtro, 1.878 proteínas, de fato, foram analisadas com a ferramenta Expression E (Waters). Dentro do universo de proteínas consideradas para a análise quantitativa com os critérios estabelecidos, 341 estavam diferencialmente expressas (**Quadros 1 e 2 em anexo**), sendo 106 com expressão aumentada e 235 com expressão diminuída em pacientes, quando comparadas com as amostras dos doadores de medula óssea (**Fig. 5.3.3**). Com relação à presença exclusiva de proteínas nas amostras de doadores e pacientes, no diagrama de Venn (**Fig. 5.3.4**), é possível observar esta distribuição.

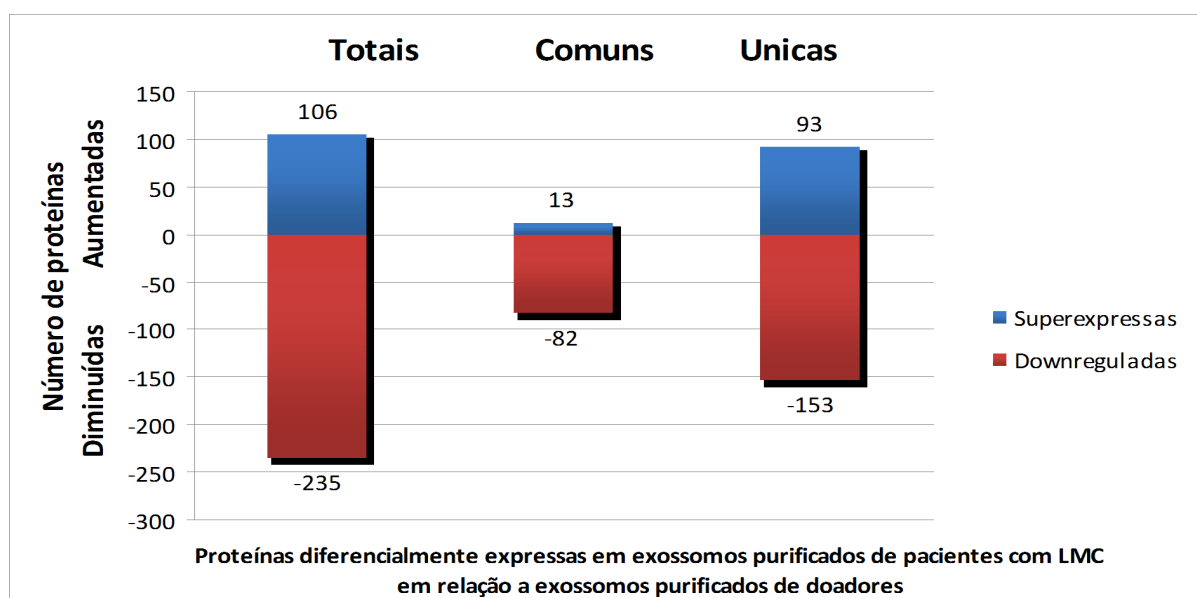


Figura 5.3.3. Proteínas diferencialmente expressas em exossomos enriquecidos de pacientes com LMC.

Pode-se observar que 93 proteínas estavam com expressão aumentada unicamente nas amostras dos pacientes, enquanto que 153 estavam diminuídas nos pacientes, ou seja, estavam presentes exclusivamente nas amostras dos doadores de medula óssea. (Todas as comparações quantitativas foram realizadas em comparação com doadores normais).

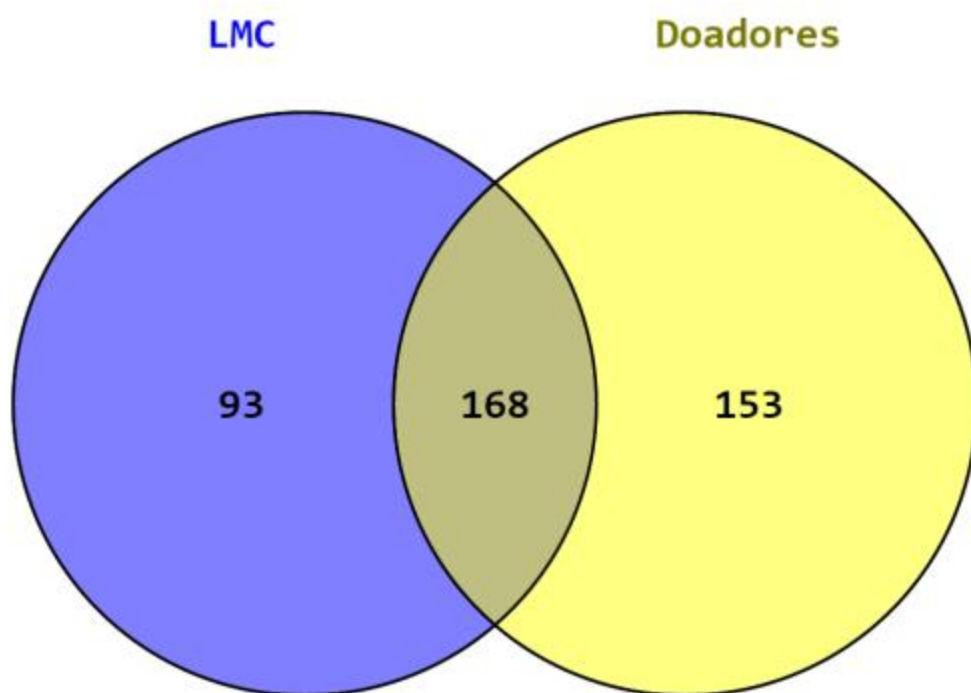


Figura 5.3.4. Diagrama de Veinn ilustrando as proteínas diferencialmente expressas entre pacientes e doadores. 153 proteínas estavam presentes unicamente nas amostras dos doadores de medula, enquanto que 93 estavam contidas unicamente nas amostras dos pacientes com LMC. 168 proteínas estavam diferencialmente expressas, porém presentes em ambas as amostras.

5.4. Análise *In Silico* descritiva das proteínas diferencialmente expressas identificadas por proteômica quantitativa label-free

Todas as proteínas foram analisadas pelo software MetaCore GeneGO e pela base de dados Exocarta com o intuito de classificar as proteínas identificadas biologicamente e determinar funções majoritárias alteradas em cada amostra analisada. Após a análise foi possível obter funções e classificações do conteúdo proteico presente nos exossomos.

A base de dados Exocarta foi utilizada primeiramente para comparar nossos dados com os já descritos anteriormente em exossomos presentes em outras amostras em estudos já realizados. Este banco de dados é citado em protocolos relacionados a purificação de exossomos e em vários trabalhos (KEERTHIKUMAR *et al.*, 2015; GE *et al.*, 2015; KUMARI *et al.*, 2015; SINHA *et al.*, 2014) por ser específico em listar o conteúdo de lipídios, RNAs, ácidos nucleicos e proteínas encontrados nestas nanovesículas. Contudo, o Exocarta não detém de muitos dados advindos de estudos de plasma de medula óssea. As distribuições

relacionadas a já descrição já realizada ou não de proteínas encontradas no Exocarta estão descritas nas **Figuras 5.4 e 5.4.1.**

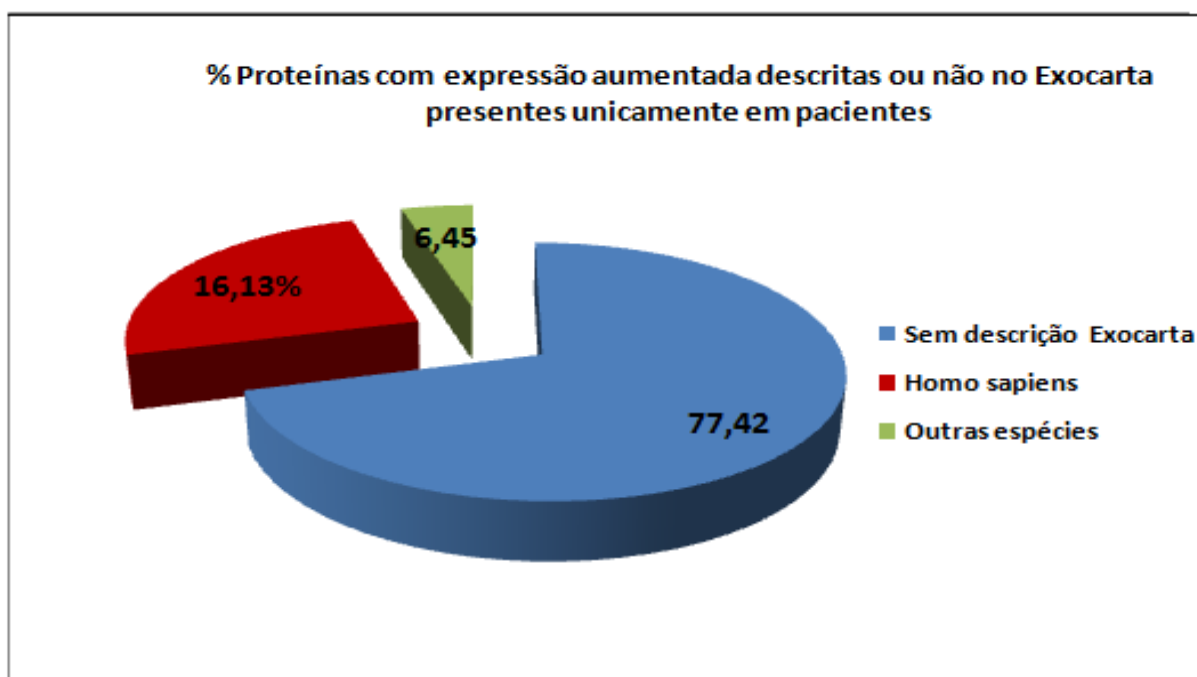


Figura 5.4. Distribuição comparativa das proteínas identificadas em amostras de doadores com a base de dados Exocarta. 77,42% das proteínas encontradas em amostras de doadores ainda não haviam sido descritas no banco de dados Exocarta. 16,13% já possuíam descrição para *Homo sapiens*, 6,45% já haviam sido descritas em outras espécies, como *Mus musculus* e *Ratus norvegicus*.

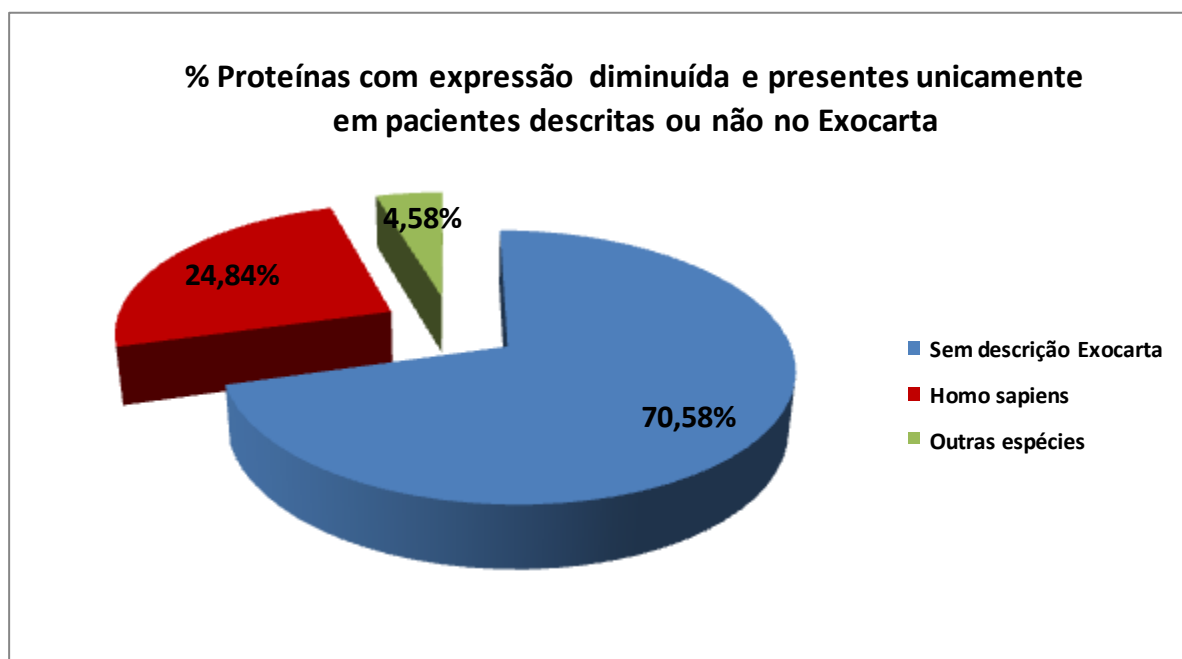


Figura 5.4.1. Distribuição comparativa das proteínas identificadas em amostras de LMC com a base de dados Exocarta. 70,58% das proteínas encontradas em amostras de doadores ainda não haviam sido descritas no banco de dados Exocarta. 24,84% já possuíam descrição para *Homo sapiens*, 4,58% já haviam sido descritas em outras espécies, como *Mus musculus* e *Ratus norvegicus*.

Com esta análise foi possível observar que mais de 70% das proteínas identificadas na análise proteômica ainda não foram descritas em estudos de enriquecimento de exossomos em plasma de medula óssea. O restante das proteínas identificadas na análise proteômica, já foram anteriormente descritas. Na base de dados Exocarta, até o momento, não existem estudos de conteúdo proteico de exossomos enriquecidos em plasma de medula óssea, somente plasma de sangue periférico. Neste sentido o estudo proteômico pode fornecer novas informações acerca deste material e do conteúdo proteico presente em exossomos deste compartimento.

As análises *in silico* das proteínas diferencialmente expressas identificadas e quantificadas foram realizadas com o software MetaCore GeneGO, Funrich, e iPath 2 de acordo com descrição na seção materiais e métodos. Foi possível obter a distribuição da classificação funcional das proteínas. Na **Fig. 5.4.2** pode-se observar um gráfico com a distribuição funcional das proteínas diferencialmente expressas nos pacientes em relação aos doadores. Nesta distribuição a maioria das proteínas encontradas eram cinases (18,87%), seguidas pelas fosfatases (15,79%) e proteases (15,69%).

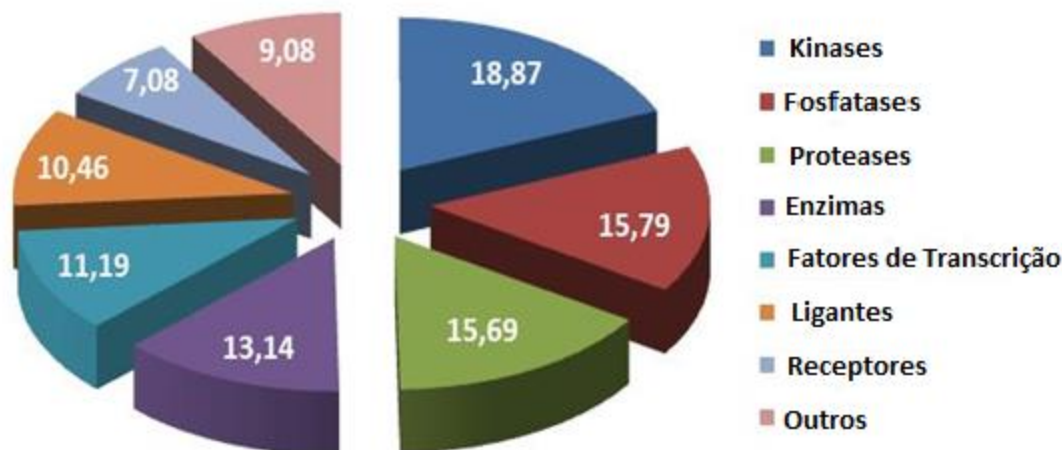


Figura 5.4.2. Distribuição funcional das proteínas diferencialmente expressas aumentadas em LMC. As classes de proteínas diferencialmente expressas mais abundantes nas amostras foram as Kinases (18,87%) e Fosfatases (15,79%), seguidas de proteases (15,69%).

Utilizando o *software* FunRich (Functional Enrichment Analysis Tool) os principais domínios presentes nas proteínas diferencialmente expressas foram analisados. Esta análise teve como objetivo aprofundar o entendimento acerca das prováveis funções que a diferença de expressão entre as amostras representa.

Com isso, na **Fig. 5.4.3** estão descritos os doze principais domínios presentes nas proteínas diferencialmente expressas. Destacamos o domínio PH (Pleckstrin homology domain) que, tanto nas proteínas superexpressas, quanto nas proteínas com expressão diminuídas, foi identificado presente na maioria. Este domínio está presente em muitas proteínas relacionadas ao metabolismo energético, como proteínas GTP, quinases e fosfolipases.

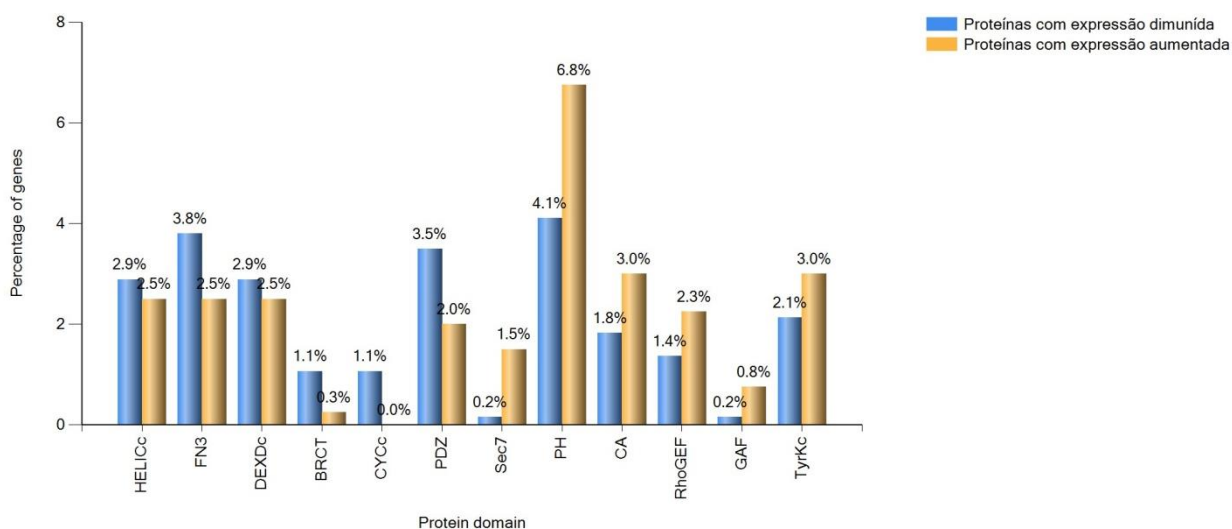


Figura 5.4.3: Distribuição dos principais domínios estatisticamente relevantes presentes nas proteínas com expressão aumentada e diminuída. O domínio PH (Pleckstrin Homology) estava presente na maioria das proteínas diferencialmente expressas entre doadores e pacientes. Tal domínio está relacionado principalmente com metabolismo energético.

5.5. Provável assinatura (*In Silico*) de glicosilação identificada nas proteínas diferencialmente expressas

As prováveis modificações pós-traducionais que as proteínas diferencialmente expressas apresentaram foram sugeridas pelo banco de dados UniprotKB. Devido ao fato de que os processos de secreção, mediados por exossomos, podem ocorrer com a participação de eventos de glicosilação, foi dada especial atenção para este tipo de modificação pós-tradução nas análises *in silico*. Dentre as proteínas diferencialmente expressas identificadas, 23,58% putativamente podem apresentar esta modificação devido a presença de sítios previamente descritos. E com relação ao tipo de glicosilação 90,47% das proteínas que podem ser glicosiladas apresentam uma glicosilação do tipo N-glicosil (**Figs. 5.5. e 5.5.1**).



Figura 5.5. Distribuição de glicosilação putativa nas proteínas diferencialmente expressas em pacientes. Utilizando a base de dados UniprotKb, pôde-se observar que 23,58% das proteínas estavam putativamente glicosiladas.

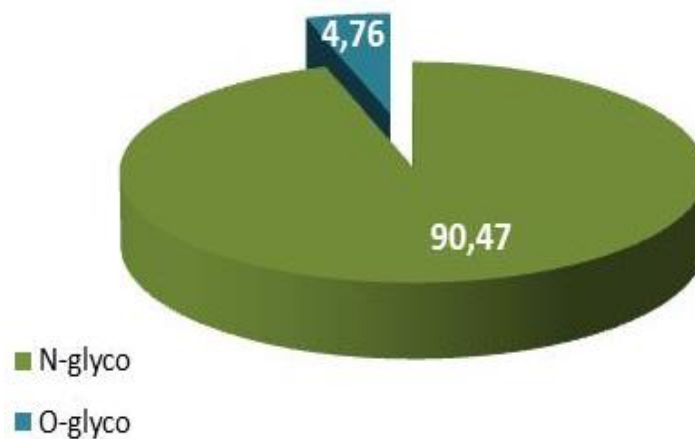


Figura 5.5.1. Distribuição do tipo de glicosilação putativa nas proteínas diferencialmente expressas em pacientes. Utilizando a base de dados UniprotKb, pôde-se observar que, das proteínas putativamente glicosiladas, 90,47% eram N-glicosiladas. Tal análise foi realizada devido ao processo de secreção de exossomos ser mediado por glicosilação.

5.6. Análise *In Silico* de processos biológicos e vias de sinalizações alteradas nas proteínas diferencialmente expressas

As proteínas identificadas foram analisadas no programa MetaCore gene GO e FunRich (Functional Enrichment Analysis Tool) para que as principais funções e vias de sinalização alteradas nos exossomos de LMC pudessem ser identificadas.

Nesta análise, várias vias de sinalização foram identificadas como provavelmente envolvidas nos processos biológicos representados pelas proteínas identificadas (**Figs. 5.6 e 5.6.1**).

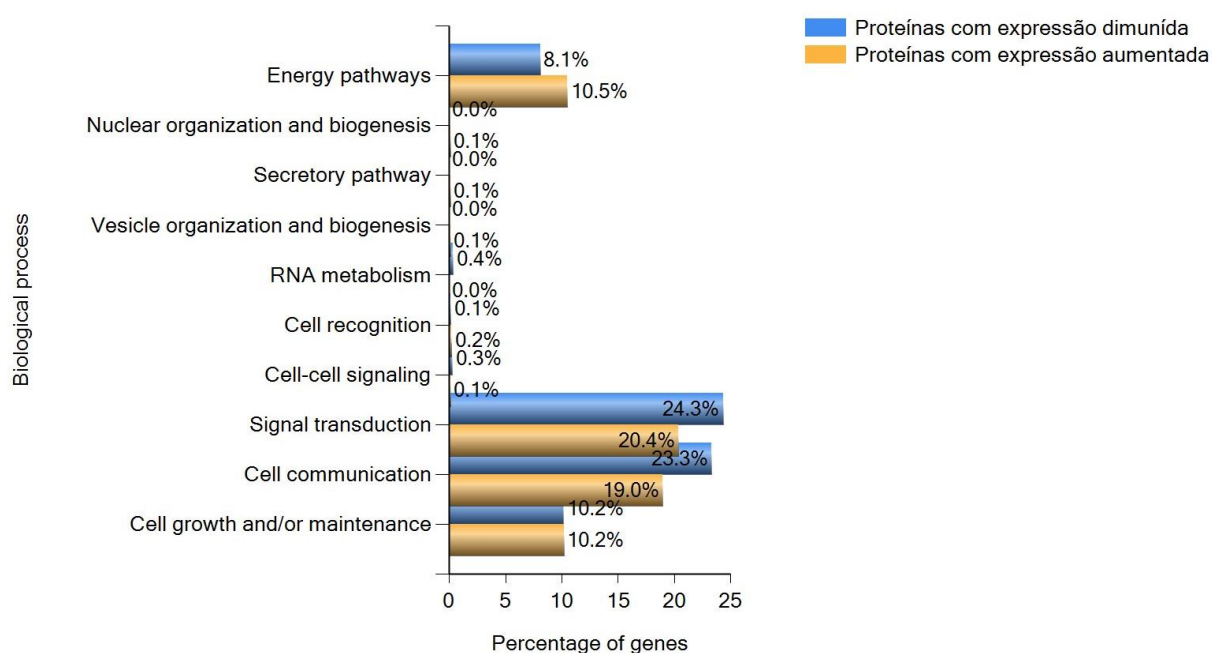


Figura 5.6. Processos biológicos estatisticamente relevantes e majoritariamente representados pelas proteínas com expressão aumentada e diminuída. Utilizando o software *Funrich*, foi possível obter dados dos processos biológicos majoritariamente alterados nas amostras, através da análise das proteínas diferencialmente expressas entre doadores e pacientes. Genes codificadores das proteínas diferencialmente expressas, relacionados a metabolismo energético, transdução de sinais, crescimento celular e comunicação intercelular foram os que apresentaram maior porcentagem de possível alteração nas amostras.

Dentre os principais processos biológicos diferencialmente expressos entre os grupos amostrais analisados, destacam-se majoritariamente processos envolvendo metabolismo energético, comunicação celular, transdução de sinais celulares e processos envolvendo crescimento celular e sua manutenção. As análises *in silico* revelaram ainda as redes de sinalização na comparação entre as amostras. As redes que receberam destaque estão relacionadas à inflamação, atração e repulsão de receptores de moléculas de adesão celular, agregação de plaquetas e de interações célula-matriz, envolvidas também no aumento ou diminuição da adesão celular.

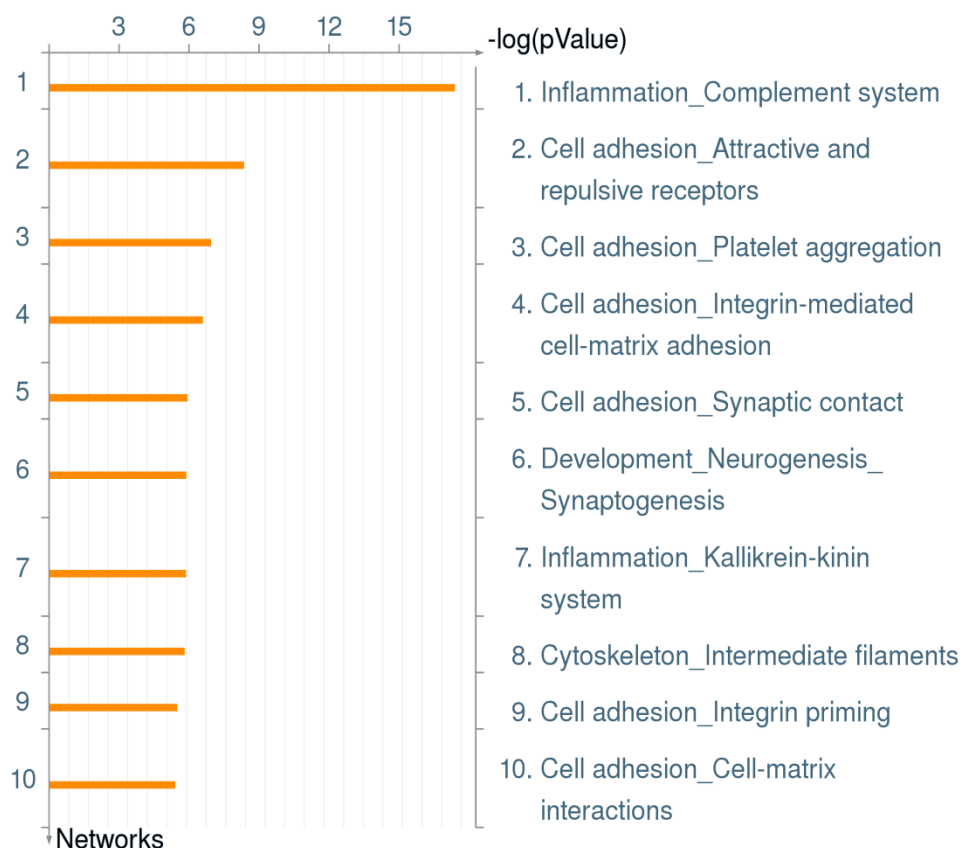


Figura 5.6.1. Principais redes de sinalização diferencialmente expressas. Utilizando o software *Metacore*, foi possível obter dados das redes de sinalização majoritariamente alterados nas amostras, através da análise das proteínas diferencialmente expressas entre doadores e pacientes. Redes relacionadas a Inflamação e alteração de adesão celular foram as que apresentaram maior porcentagem de possível alteração nas amostras.

Dentre as vias de sinalização identificadas com a análise proteômica dos exossomos enriquecidos, destacamos a via de regulação da transcrição de granulócitos, via de indução de diferenciação mielóide mediada pelo fator de crescimento G-CSF (*“Granulocyte colony-stimulating factor”*), via de sinalização de Sonic Hedgehog (Shh), TGF, WNT e remodelamento do citoesqueleto, via de c-Kit, via de indução da diferenciação mielóide induzida por G-CSF, via de contato de células endoteliais por mecanismos não juncionais e, por fim, via de indução da diferenciação mielóide por G-CSF. **(Figs 5.6.3 a 5.6.8, anexo 2).**

Estas vias de sinalização sugerem que o conteúdo proteico do interior dos exossomos secretados por diferentes células dentro da medula óssea pode ilustrar as características inerentes da célula leucêmica LMC e também conter a sinalização essencial e necessária para a comunicação precursora com o nicho medular.

Contudo, pela importância e correlação com as prováveis alterações entre a célula leucêmica e seu nicho hematopoiético, destacamos a via de Shh (Fig. 5.6.2), na qual observamos a proteína Brother of CDO (BOC) aumentada em exossomos de LMC. BOC é um co-receptor direto da molécula de Shh.

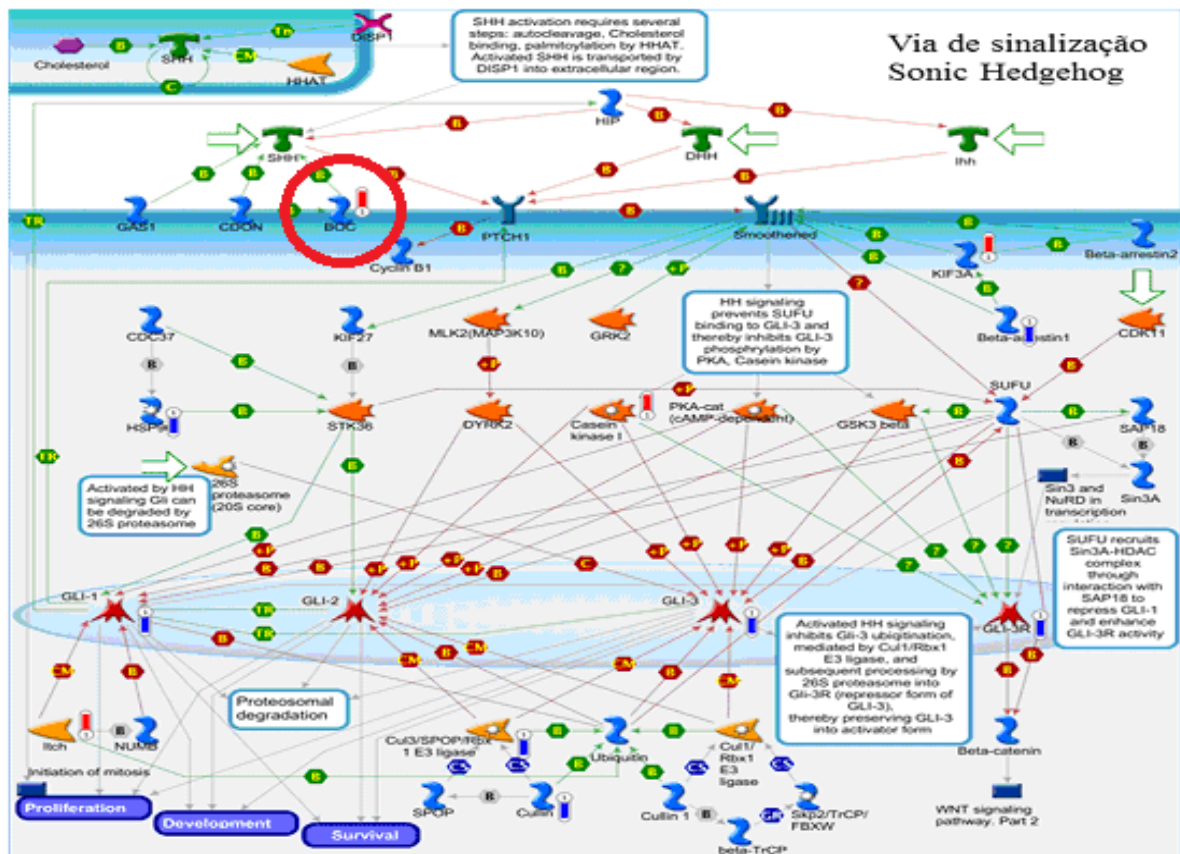


Figura 5.6.2. Via de sinalização Sonic Hedgehog. Os termômetros em vermelho representam as proteínas com expressão aumentada em exossomos de LMC e os em azul as proteínas identificadas com expressão diminuída em exossomos de LMC. (Em anexo a legenda completa para todos os símbolos). Pode-se observar a proteína BOC, receptora direta da via de Shh, com indicação de expressão aumentada nas amostras dos pacientes com LMC.

5.7. Identificação e quantificação por RT-qPCR array de RNAs longos não codificantes em amostras de exossomos de doadores e pacientes de LMC

Com o intuito de identificar se exossomos oriundos de plasma de medula óssea possuem RNAs longos não codificantes, foram utilizados arrays especificamente desenvolvidos para exossomos. As amostras de pacientes e de doadores foram analisadas em triplicata. Dos 90 lncRNAs contidos no ensaio somente nove amplificaram (**Tabela 2**) nas

amostras com exceção do RNA controle (8 em doadores e 3 em pacientes). Os RNAs longos não codificantes com expressão identificada foram: anti-NOSA, HOTAIR, LincRNA-VLDLR, Y-RNA1, LincRNA-Ror, LincRNA-SFMBT2, NEAT1 e 21A.

Tabela 2. RNAs longos não codificantes identificados por RT-qPCR array

RNAs longos não codificantes	Doadores (média cts)	Pacientes (média cts)	Fold-change
Anti-NOSA	● 30.88	● 35.40	0,048
HOTAIR*	● 38.80	● 35.29	13,24*
LincRNA-VLDLR	● 27.41	●	●
Y-RNA1	● 33.06	●	●
LincRNA-Ror	● 27.15	● 36.01	0,002
LincRNA-SFMBT2	● 26.71	●	●
Neat1	● 39.15	●	●
21A	● 38.45	●	●
18rRNA	● 21.32	● 21.45	Normalizador

*diferença de expressão considerada como aumentada em pacientes **em relação a doadores (controles)**. Os círculos verdes representam amplificação e os círculos vermelhos ausência de amplificação e portanto ausência de diferença de expressão em relação aos doadores (controle). Cutoff: ct 40.

Em pacientes foram identificados somente os RNAs Anti-NOSA, HOTAIR e LincRNA-Ror, entretanto somente HOTAIR foi considerado diferencialmente expresso com um fold-change de 13,24 após a análise pelo método de delta ct. Os RNAs Anti-NOSA, LincRNA-Ror foram considerados com expressão aumentada, assim como os RNAs restantes identificados somente em amostras de doadores.

VI. DISCUSSÃO

Até o momento, os estudos com exossomos realizados com modelos de LMC foram feitos utilizando linhagens celulares. Taverna *et al.* (2012) observaram a presença de exossomos sendo liberados de células leucêmicas da linhagem LAMA84, contendo moléculas promotoras de angiogênese. Uma vez que os exossomos foram adicionados a células endoteliais vasculares (HUVEC), foi observado aumento de moléculas de adesão celular,

como ICAM-1 e VCAM-1, além da expressão de interleucina 8. Outro grupo também identificou estas mesmas moléculas em exossomos secretados por células da linhagem K562 (MINEO *et al.*, 2012).

Em 2012, Pizzatti e colaboradores detectaram, através de análise proteômica, proteínas anteriormente descritas como presentes no interior dos exossomos, em amostra de plasma de medula óssea de pacientes com LMC. A partir de então o interesse em caracterizar o conteúdo molecular destas microvesículas surgiu. Tendo em vista que no plasma da medula óssea podem ser encontradas moléculas secretadas de diversos tipos celulares, a caracterização de exossomos distintos também foi planejada.

Tendo em vista que as novas linhas de pesquisa em LMC estão voltadas para o interior da medula óssea e para moléculas que regulam vias de sinalização relacionadas com renovação celular das células tronco, abordamos também neste estudo a identificação de RNAs longos não codificantes presentes no interior de exossomos enriquecidos diretamente do plasma de pacientes com LMC em fase crônica, abordagem ainda não realizada por nenhum outro grupo, bem como a descrição do perfil imunofenotípico destas nanovesículas no mesmo modelo.

O enriquecimento e caracterização imunofenotípica do exossomo no plasma dos pacientes abre uma nova linha de estudo na forma de comunicação celular dentro da medula óssea, anteriormente uma evidência observada em linhagens celulares foi confirmada em amostras de pacientes. A fim de compreender melhor a comunicação entre as populações celulares presentes no microambiente da medula óssea e mensurar a contribuição de cada uma no que diz respeito à secreção mediada por exossomos, também foram realizadas marcações com anticorpos anti-CD45, anti-CD34, anti-CD 90 e anti-CD105, uma vez que as duas primeiras tetraspaninas correspondentes são consideradas marcadores de células-tronco hematopoiéticas, enquanto que as duas últimas, de células- tronco mesenquimais.

Dessa forma, nossos resultados apontaram para a presença de ambas as populações celulares. Contudo, houve maior mDIF (média de diferença de intensidade de fluorescência) nas marcações realizadas com os marcadores das células mesenquimais, fato este que nos sugere uma maior secreção de exossomos por parte destas células, corroborando os dados da literatura, os quais descrevem as células-tronco mesenquimais como fonte de citocinas e outras substâncias essenciais a hematopoiese microambiente da medula óssea (LONG, 2011; ZHANG, ZHANG, 2009; JORGENSEN, 2007; COPLAND, 2006; HOLTZ, 2005; GRAHAM, 2002). O aumento de intensidade de fluorescência também foi

observado quando os exossomos foram marcados com anticorpos anti-CD61 e anti-CD-65. A tetraspanina CD61 é um marcador de megacariócitos imaturos, enquanto que a CD65 se encontra majoritariamente presente na linhagem mielóide, estando em maior quantidade em granulócitos quando comparada aos monócitos, de forma que este resultado também nos leva a inferir que estas populações de células também são responsáveis por uma maior secreção de exossomos no microambiente da medula óssea, em pacientes com LMC em fase crônica. Relevante também é mencionar que não foi feita uma caracterização de populações de exossomos completa, ou seja, para todos os possíveis marcadores celulares. O que claramente podemos sugerir é que entre os marcadores analisados os marcadores presentes em células-tronco mesenquimais estão em maioria.

Em relação à descrição das classes de proteínas encontradas no interior dos exossomos tal análise já foi realizada em muitos modelos de neoplasias. Contudo, tal descrição também não detém dados referentes à exossomos purificados do plasma da medula óssea de pacientes com LMC em fase crônica e sem tratamento.

Entendendo que os exossomos são cruciais nos processos de comunicação célula-célula, muitos grupos intensificaram as pesquisas relacionadas à essa classe de microvesículas, uma vez que as mesmas encontram-se com secreção aumentada quando comparadas com tecidos normais adjacentes, no intuito de obter dados referentes ao seu conteúdo e origem.

Entendendo também que o exossomo, além de contribuir para o envio de moléculas e substâncias de uma célula a outra, pode também refletir a célula que o originou- uma vez que durante sua biogênese, passa a obter grande parte das proteínas de membrana das células que o secretaram -, procuramos entender o mecanismo inicial de comunicação entre as células presentes no microambiente da medula óssea, identificando o conteúdo protéico e de RNAs longos não codificantes presentes nos exossomos, bem como identificar quais populações celulares presentes na medula óssea poderiam ser as responsáveis majoritárias pela secreção destas nanovesículas.

As células envolvidas no transporte intercelular podem sofrer injúrias relacionadas à estabilidade e solubilidade do meio extracelular, de forma que as mesmas desenvolveram mecanismos para garantir que os fatores secretados possam eficientemente transmitir informação. Um destes mecanismos foi a formação dos referidos exossomos, que podem conter moléculas como DNA, RNA, lipídeos, proteínas, carboidratos e proteínas de membranas (THERY, ZITVOGEL, AMIGORENA, 2002; VLASSOV, *et al.*, 2012).

A habilidade dos exossomos em percorrer longos circuitos faz destas vesículas uma plataforma eficaz de transmissão de moléculas de sinalização, relacionadas, por exemplo, a processos biológicos como transmissão de morfógenos, modulação da resposta imune e progressão do câncer (LAKKARAJU,2008; THERY,2009). Dessa forma, os exossomos podem intermediar a comunicação entre as células tumorais e seu microambiente que, por sua vez, contém células hospedeiras, como as células-tronco mesenquimais (MSCs), que podem fornecer citocinas e fatores de crescimento para promover ou suprimir a proliferação, manutenção, auto-renovação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas normais (HSCs) e das células-tronco leucêmicas (LSCs) (ARAI, *et al.*, 2004). Evidências experimentais indicam que as células leucêmicas tendem a crescer e se acumular associadas com as MSCs, as quais podem promover a proliferação das primeiras (UMIEL *et al.*, 1986), exercendo efeitos protetivos contra agentes citotóxicos às LSCs.

Contudo, na leucemia mielóide crônica (LMC), a principal terapia consiste no uso dos inibidores de tirosina-quinase (TKIs), como imatinibe e nilotinibe, que competem pelo sítio kinase do oncogene BCR-ABL, impedindo a ação tirosina-quinase. Porém, ainda assim, muitos pacientes são resistentes à terapia por apresentarem doença residual mínima (MRD), provavelmente devido à inabilidade dos TKIs atingirem as LSCs. Além disso, vários grupos observaram a persistência de LSCs BCR-ABL⁺ mesmo após o tratamento com imatinibe *in vivo*; contudo, *in vitro*, as LSCs morreram após a exposição à droga, indicando um provável papel crucial do estroma do microambiente da medula óssea na leucemogênese da LMC (GRAHAM, 2002; HOLTZ, 2005; COPLAND, 2006; JORGENSEN, 2007; LONG, 2011). A inferência de que as MSCs suportam a sobrevivência e proliferação das LSCs- uma vez que as MSCs podem secretar fatores solúveis no microambiente medular quando estimuladas-, também foi observada pelo grupo de Zhang e colaboradores (ZHANG, ZHANG, 2009).

Em nossa análise proteômica, pudemos observar que a proteína Brother of CDO (BOC), um co-receptor da via de sinalização de Shh, estava com expressão aumentada no interior dos exossomos do plasma da medula nos pacientes com LMC. Tal proteína é uma glicoproteína transmembrana, que atua como co-receptor direto das moléculas da via de Shh e compete com os receptores GAS1 e CDON. A identificação deste receptor dentro de exossomos sugere que a via de Shh pode ter sua ativação mediada por esta forma de secreção, uma vez que a própria molécula Shh já foi descrita desta forma (WARD, RUBIN, 2015).

A proteína BOC é uma glicoproteína transmembrana, pertencente à superfamília das moléculas de adesão celular (CAMs e do subgrupo das Imunoglobulinas (Ig) e fibronectinas

tipo III (FNIII), envolvida na diferenciação miogênica (KANG *et al.*, 1998), e em processos de ativação de cascatas de sinalização e adesão celular, fundamentais para garantir a interação e contato entre as células. BOC se localiza no cromossomo 3, sendo responsável por codificar 1.114 aminoácidos (aa) a partir de seus 20 éxons (KANG *et al.*, 2002).

O mRNA desta proteína foi inicialmente localizado em células de linhagens miogênicas, mas sua distribuição tem sido detectada em estágios de gastrulação em muitos tecidos de diferentes espécies de vertebrados. Em geral, sua expressão é principalmente associada a domínios de proliferação e de células indiferenciadas (MULIERI, *et al.*, 2002).

Esta proteína se liga com alta afinidade aos membros da família Shh (OKADA *et al.*, 2006; TENZEN *et al.*, 2006), que possuem três formas homólogas nos mamíferos, sendo elas Sonic Hh, Indian Hh e Desert Hh. Através de estudos bioquímicos e de raio-X estruturais, foi observado que as moléculas de Shh encontram-se isoladas ou em complexos associadas a domínios ativos da proteína BOC (KAVRAN, *et al.*, 2010).

A recepção do sinal de Shh envolve a proteína transmembrana integral Patched (Ptch), Smoothed (SMO). Na ausência de Hh, Ptched inibe a atividade de SMO; contudo, quando ligado a seu receptor Ptched, SMO é liberado de sua latência, que ativa *downstream* os fatores de transcrição da família Gli, que migram para o núcleo e, ao se ligarem aos promotores dos genes alvos, alteram a expressão dos mesmos (TAIPALE *et al.*, 2002), o que faz de BOC um regulador positivo da via de Hh (KANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2006).

Dessa forma, podemos sugerir que a presença de BOC nos exossomos tem por objetivo ativar esta via em outros sítios da medula óssea, a fim de manter a leucemogênese. Tal fato se baseia nos estudos que já correlacionaram a via de Shh como alterada em várias neoplasias, como no câncer de pulmão (BORA-SINAFRAL *et al.*, 2015), mama (HE *et al.*, 2015), cérebro (WARD *et al.*, 2015) e pancreático (VERMA *et al.*, 2015), inclusive na LMC (LIAO *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; LONG *et al.*, 2011).

Dessa forma, como a proteína BOC estava com expressão aumentada nas amostras dos pacientes, podemos inferir que provavelmente os exossomos presentes no plasma da medula exercem função de promover a comunicação entre as células neste nicho, carregando várias moléculas e, neste caso, a proteína BOC, que poderá dar início a ativação da via de Shh na célula que receber os exossomos via membrana plasmática. Esta proteína foi inicialmente descrita com expressão aumentada em processos de desenvolvimento embrionário em drosófilas (ZHANG *et al.*, 2011), e estudo de raio-X estrutural observou que as moléculas da

via de Shh se apresentam sozinhas ou em associação com a proteína BOC (TENZEN *et al.*, 2006

), mostrando que ha alta afinidade de ligação entre os membros da via de Shh e a proteína BOC. Vale ressaltar que outras proteínas receptoras da via, como Ptched, são mais comumente citadas na literatura como receptoras da via de Shh. Contudo, nas amostras de plasma de medula óssea de pacientes com LMC, a proteína BOC que apresentou expressão aumentada, nos permitindo inferir possível ativação da via de Shh através da secreção dos exossomos. Ensaios para validação desta hipótese serão realizados posteriormente.

LIAO *et al.*, (2012), demonstraram que a concentração dos membros da via de Shh (Sonic, SMO e Patched) aumentavam proporcionalmente ao fenótipo normal ou resistente da linhagem K562.

Além da proteína BOC destacada acima, nas análises proteômicas, identificamos uma grande participação de proteínas com domínio PH (*Pleckstrin domain*) em nossas análises *in silico*. Em conjunto as proteínas com este domínio sugerem alterações em processos de metabolismo energético e metabolismo lipídico, resultado também comprovado nas análises *in silico* em softwares distintos. Estas alterações já foram previamente descritas em estudos com pacientes em LMC por Pizzatti et al, (2012), entretanto, utilizando plasma total sem enriquecimento específico algum. Uma vez que enriquecemos a amostra para exossomos, este dado foi melhor observado.

A análise de domínios realizadas com o software *FunRich* e posteriormente utilizando a base de dados KEGG, mostrou proteínas que apresentam o domínio PH (Pleckstrin homology) em um porcentagem aumentada, tanto para proteínas com expressão aumentada, quanto para proteínas diminuídas. É sabido que este domínio esta presente em proteínas que possuem funções relacionadas com metabolismo energético, metabolismo lipídico, biodegradação de xenobióticos e sinalização mediada por tirosina-quinases.

Com relação às vias de sinalização identificadas dentro de exossomos, todas correspondem ao fenótipo de alteração granulocítica observado na LMC em fase crônica e desta forma ilustra que talvez, o conteúdo molecular identificado nestas microvesículas, reflita a malignidade de sua célula de origem e não necessariamente uma mensagem para outra célula receptora. Estudos demonstrando o efeito ortogonal destes exossomos enriquecidos em outros tipos celulares poderão esclarecer esta questão, já que o presente estudo tem o objetivo de realizar somente um *screening* das moléculas.

A análise proteômica quantitativa comparativa nos permitiu obter uma ampla lista de proteínas presentes nos exossomos dos pacientes com LMC e de doadores, com 341 destas proteínas com expressão diferenciada entre as amostras. Além disso, dentre as proteínas presentes unicamente nas amostras dos pacientes, 77,41% (72 proteínas) não haviam sido descritas até o momento no banco de dados Exocarta, enquanto que 70,58% (108) ausentes nos pacientes com LMC, também não haviam sido citadas no banco de dados até o momento. Isto se deve ao fato de que o banco de proteínas Exocarta possui pouquíssimas proteínas originárias de medula óssea, apontando que o futuro *upload* dos dados do presente estudo contribuirá para estudos futuros.

Interessantemente dentre os processos biológicos identificados como majoritários na análise proteômica, identificamos processos coincidentes com exceção do metabolismo de xenobióticos.

Já os lncRNAs incluem centenas de RNAs regulatórios que têm sido alvo de intensos estudos. Os papéis destes RNAs na regulação da expressão gênica são diversos, incluindo pluripotência de células-tronco, desenvolvimento, segmentação e hematopoiese. Promotores de mais de 100 lncRNAs estão vinculados a fatores de células-tronco, de forma que uma expressão diferenciada destes lncRNAs podem alterar a diferenciação celular. Desta forma, os lncRNAs parecem ter papel relevante nos processos de desenvolvimento normal e outros que requerem manutenção de *pools* de células-tronco adultas.

A análise em larga escala (RNA seq) em câncer de próstata identificou 121 lncRNAs diferencialmente expressos entre espécimes tumorais e benignos (PRENSNER *et al.*, 2011). Os padrões de expressão dos lncRNAs são mais tecido-específicos em relação aos genes que codificam proteínas, fato este que embasou a proposta de que a assinatura de expressão dos lncRNAs pode ser útil em determinar a origem de tecidos no câncer humano (CABILI *et al.*, 2011; DERRIEN *et al.*, 2012)

Apesar dos estudos com lncRNAs ainda se apresentarem em estágios precoces, alguns estudos já deixam claro que essas moléculas estão envolvidas em processos como regulação de proliferação (HUNG *et al.*, 2011), diferenciação (GROTE, *et al.*, 2013), migração (GUPTA *et al.*, 2010) e apoptose (HUARTE *et al.*, 2010). Dessa forma, uma expressão aberrante destes lncRNAs pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do câncer.

Em relação ao lncRNAs identificados nas amostras, observamos a amplificação com reprodutibilidade, porém não estatisticamente significativa, dos lncRNAs VLDLR,

SFMBT2, ANTI NOS2A e RoR nos doadores e, somente HOTAIR, com expressão aumentada de forma significativa em pacientes. O lncRNA VLDLR e SFMBT2 já foram descritos como enriquecidos em células-tronco embrionárias e em células-tronco pluripotentes induzidas. São alvos de fatores de transcrição para pluripotência, como Oct4, Sox2 e Nanog, e o nocaute destes culminou na diminuição da expressão de VLDLR.

Takahashi *et al.*, (2014), verificaram aumento de expressão do lncRNA VLDLR em microvesículas secretadas de linhagens de câncer hepatocelular e também observaram que houve diminuição deste lncRNA quando exossomos derivados das células tumorais foram incubados em linhagens transfectadas com RNA de interferência (siRNA) para VLDLR, mostrando que além dos exossomos conterem lncRNAs, muito provavelmente eles contribuem para a comunicação intercelular. Já o lncRNA RoR foi descrito como indutor de pluripotência, uma vez que é alvo de fatores de transcrição relacionados a este processo (LOEWER, *et al.*, 2010). Sendo assim, como estes lncRNAs apresentaram amplificação somente nas amostras dos doadores, podemos sugerir que eles possam estar relacionados a ativação de genes supressores de tumores, sendo necessários estudos posteriores para confirmação desta hipótese.

Desta forma, como os lncRNAs VLDLR, RoR e SFMBT2 apresentaram amplificação reprodutível somente nas amostras dos doadores, podemos inferir que talvez estes lncRNAs possam estar silenciados nas amostras dos pacientes, caso estejam associados à função de supressão tumoral. Ensaios futuros deverão ser realizados para comprovar tais hipóteses.

O RNA longo NEAT1 está relacionado à formação, manutenção e integridade dos *paraspeckles* (CLEMSON *et al.*, 2009), e foi descrito como um lncRNA que interage com complexos e proteínas modificadoras da cromatina em células-tronco embrionárias e com moléculas repressoras da expressão gênica (GUTMAN *et al.*, 2011).

O único RNA longo identificado com expressão aumentada em amostras de pacientes, HOTAIR, já foi descrito como o inibidor de Wif-1, um ligante regulador negativo da via de Wnt/beta-catenina (GE, *et al.*, 2013). HOTAIR é o RNA longo melhor descrito em diversos tipos de câncer e o principal regulador dos complexos repressores polycomb (PRC2, principalmente). Este lncRNA atua principalmente formando arcabouço com proteínas dos complexos PRC2 e LSD1, ambas repressoras da transcrição através da tri-metilação do resíduo 27 de lisina na histona 3 (H3K27me3) e demetilação do resíduo de lisina 4, também na histona 3 (H3K4deme), respectivamente (HAJJARI, SALAVATY, 2015).

). Dessa forma, modificam a estrutura da cromatina e tornam invivável a transcrição de genes alvos, que então ficam silenciados. Este mesmo grupo mostrou que HOTAIR se apresenta com expressão aumentada em vários tipos de câncer, como mama, gástrico, hepatocelular e pulmão, dentre outros. Porém, a identificação de sua expressão em LMC ainda não detinha dados, fazendo com que a identificação deste RNA regulador de grande importância no interior de exossomos na medula óssea seja um dado que sugere extremo interesse, incentivando futuros estudos com relação ao seu papel funcional em LMC.

Contudo, dada a complexidade de conteúdo molecular que pode ser carregado pelos exossomos, novos trabalhos devem ser realizados a fim de validar a presença dos lncRNAs em amostras de células mononucleares e mesenquimais de pacientes com LMC em fase crônica e aprofundar os estudos funcionais específicos para cada molécula.

VII. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos inicialmente propostos e com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- o enriquecimento dos exossomos do plasma de medula óssea de pacientes e doadores, bem como o perfil imunofenotípico e microscopia eletrônica dos mesmos evidenciou que estas microvesículas estão presentes no plasma da medula óssea com conteúdos moleculares distintos;
- a análise imunofenotípica nos permitiu inferir que provavelmente os exossomos são secretados majoritariamente pelas células mesenquimais do microambiente medular, bem como pelos megacariócitos e granulócitos;
- a análise proteômica quantitativa identificou um perfil específico e exclusivo de exossomos em pacientes com LMC, apontando a via de regulação de transcrição de granulócitos, via de c-kit, indução de diferenciação mielóide G-CSF, via de VEGF e via de Shh como majoritárias no interior dos exossomos;
- a análise por RT-qPCR array identificou 8 RNAs longos não codificantes expressos no interior dos exossomos do plasma de medula óssea e somente o RNA longo HOTAIR estava superexpresso em amostras de LMC.

VIII. REFERÊNCIAS

- ABKOWITZ JL, ROBINSON AE, KALE S, LONG MW, CHEN J. **Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure.** Blood, v. 102, n. 4, p. 1249-53, Aug 15 2003.
- ADAMS, G. B. **Deconstructing the hematopoietic stem cell niche: revealing the therapeutic potential.** Regen Med, v. 3, n. 4, p. 523-30, Jul 2008.
- ARA T, TOKOYODA K, SUGIYAMA T, EGAWA T, KAWABATA K, NAGASAWA T. **Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny.** Immunity, v. 19, n. 2, p. 257-67, Aug 2003.
- ARAI F, HIRAO A, OHMURA M, SATO H, MATSUOKA S, TAKUBO K, ITO K, KOH GY, SUDA T **Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche.** Cell, v. 118, n. 2, p. 149-61, Jul 23 2004.
- BACCARANI M, SAGLIO G, GOLDMAN J, HOCHHAUS A, SIMONSSON B, APPELBAUM F, APPERLEY J, CERVANTES F, CORTES J, DEININGER M, GRATWOHL A, GUILHOT F, HOROWITZ M, HUGHES T, KANTARJIAN H, LARSON R, NIEDERWIESER D, SILVER R, HEHLMANN R; EUROPEAN LEUKEMIANET. **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.** Blood, v. 108, n. 6, p. 1809-20, Sep 15 2006.
- BAI W, YANG J, YANG G, NIU P, TIAN L, GAO A. **Long non-coding RNA NR_045623 and NR_028291 involved in benzene hematotoxicity in occupationally benzene-exposed workers.** Exp Mol Pathol, v. 96, n. 3, p. 354-60, Jun 2014.
- BALDWIN, MA; McLAFFERTY, FW. **Liquid chromatography-mass spectrometry interface-I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer.** Volume 7, Issue 9, pages 1111–1112. 1973.
- BOBRIE A, COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. **EXOSOME secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses.** Traffic, v. 12, n. 12, p. 1659-68, Dec 2011.
- BONNET, D. **Normal and leukaemic stem cells.** Br J Haematol, v. 130, n. 4, p. 469-79, Aug 2005.
- BORA-SINGHAL N, PERUMAL D, NGUYEN J, CHELLAPPAN S. **Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer.** Neoplasia, v. 17, n. 7, p. 538-51, Jul 2015.
- BOYD AL, SALCI KR, SHAPOVALOVA Z, MCINTYRE BA, BHATIA M. **Nonhematopoietic cells represent a more rational target of in vivo hedgehog signaling affecting normal or acute myeloid leukemia progenitors.** Exp Hematol, v. 41, n. 10, p. 858-869.e4, Oct 2013.
- BOZOVIC, A.; KULASINGAM, V. **Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins.** Clin Biochem, v. 46, n. 6,

p. 444-55, Apr 2013.

BRADFORD, MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry. **72**, 248–254. 1976.

CABILI MN1, TRAPNELL C, GOFF L, KOZIOL M, TAZON-VEGA B, REGEV A, RINN JL.. **Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses.** Genes Dev, v. 25, n. 18, p. 1915-27, Sep 15 2011.

CABY MP, LANKAR D, VINCENDEAU-SCHERRER C, RAPOSO G, BONNEROT C.**Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma.** Int Immunol, v. 17, n. 7, p. 879-87, Jul 2005.

CAI J, WU G, TAN X, HAN Y, CHEN C, LI C, WANG N, ZOU X, CHEN X, ZHOU F, HE D, ZHOU L, JOSE PA, ZENG C. **Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice.** PLoS One, v. 9, n. 8, p. e105200, 2014.

CAMUSSI G, DEREGIBUS MC, BRUNO S, CANTALUPPI V, BIANCONE L. **Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication.** Kidney Int, v. 78, n. 9, p. 838-48, Nov 2010.

CARNINCI, P. et al (GenomeNetwork Project Core Group). **The transcriptional landscape of the mammalian genome.** Science, v. 309, n. 5740, p. 1559-63, Sep 2 2005.

CEA M, CAGNETTA A, CIRMENA G, GARUTI A, ROCCO I, PALERMO C, PIERRI I, REVERBERI D, NENCIONI A, BALLESTRERO A, GOBBI M, CARELLA AM, PATRONE F. **Tracking molecular relapse of chronic myeloid leukemia by measuring Hedgehog signaling status.** Leuk Lymphoma, v. 54, n. 2, p. 342-52, Feb 2013.

CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, SANTINI T, STHANDIER O, CHINAPPI M, TRAMONTANO A, BOZZONI I. **A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA.** Cell, v. 147, n. 2, p. 358-69, Oct 14 2011.

CHAUFFAILLE, MLLF. **Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosinoquinase.** Rev Bras Hemato Hemoter;30(supl I):13-9. 2008.

CHEN Y, HU Y, ZHANG H, PENG C, LI S. **Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia.** Nat Genet, v. 41, n. 7, p. 783-92, Jul 2009.

CHOMEL JC, TURHAN AG.**Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy.** Oncotarget, v.2, n.9, p.713-727. 2011 .

.

CLARK, B. R.; KEATING, A. **Biology of bone marrow stroma.** Ann N Y Acad Sci, v. 770, p. 70-8, Dec 29 1995.

CLAYTON A, COURT J, NAVABI H, ADAMS M, MASON MD, HOBOT JA, NEWMAN GR, JASANI B. **Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry.** J Immunol Methods, v. 247, n. 1-2, p. 163-74, Jan 1 2001.

CLEMONSON CM, HUTCHINSON JN, SARA SA, ENSMINGER AW, FOX AH, CHESS A, LAWRENCE JB. **An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles.** Mol Cell, v. 33, n. 6, p. 717-26, Mar 27 2009.

COPLAND M, HAMILTON A, ELRICK LJ, BAIRD JW, ALLAN EK, JORDANIDES N, BAROW M, MOUNTFORD JC, HOLYOAKE TL. **Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction.** Blood, v. 107, n. 11, p. 4532-9, Jun 1 2006a.

CORBIN AS, AGARWAL A, LORIAUX M, CORTES J, DEININGER MW, DRUKER BJ. **Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity.** J Clin Invest, v. 121, n. 1, p. 396-409, Jan 2011.

COVAS DT, PICCINATO CE, ORELLANA MD, SIUFI JL, SILVA WA JR, PROTO-SIQUEIRA R, RIZZATTI EG, NEDER L, SILVA AR, ROCHA V, ZAGO MA VAS, D. T. et al. **Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein.** Exp Cell Res, v. 309, n. 2, p. 340-4, Oct 1 2005.

DAZZI F, RAMASAMY R, GLENNIE S, JONES SP, ROBERTS I. **The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis.** Blood Rev, v. 20, n. 3, p. 161-71, May 2006.

DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, TANZER A, DJEBALI S, TILGNER H, GUERNEC G, MARTIN D, MERKEL A, KNOWLES DG, LAGARDE J, VEERAVALLI L, RUAN X, RUAN Y, LASSMANN T, CARNINCI P, BROWN JB, LIPOVICH L, GONZALEZ JM, THOMAS M, DAVIS CA, SHIEKHATTAR R, GINGERAS TR, HUBBARD TJ, NOTREDAME C, HARROW J, GUIGÓ R. **The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression.** Genome Res, v. 22, n. 9, p. 1775-89, Sep 2012.

DIERKS,C; BEIGI,R; GUO,GR;ZIRLIK,K; STEGERT,MR; MANLEY,P; TRUSSELL,C; SCHMITT-GRAEFF,A; LANDWERLIN,K; VEELKEN,H; WARMUTH,M. **Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation.** v.14, n.3, p.238-249. 2008.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. **Mass spectrometry and protein analysis.** Science, v. 312, n. 5771, p. 212-7, Apr 14 2006.

ERNST, T.; HOCHHAUS, A. **Chronic myeloid leukemia: clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression.** Semin Oncol, v. 39, n. 1, p. 58-66, Feb 2012.

ESTELLER, M. **Non-coding RNAs in human disease.** Nat Rev Genet, v. 12, n. 12, p. 861-

74, Dec 2011.

ESTIMATIVA 2014: **Incidência de Câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Coordenação de prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. < <http://www.exocarta.org/>>.

FEVRIER, B. et al. **Exosomes: a bubble ride for prions?** Traffic, v. 6, n. 1, p. 10-7, Jan 2005.

FLEMING HE, JANZEN V, LO CELSO C, GUO J, LEAHY KM, KRONENBERG HM, SCADDEN DT. **Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo.** Cell Stem Cell, v. 2, n. 3, p. 274-83, Mar 6 2008.

FRIEDENSTEIN AJ, DERIGLASOVA UF, KULAGINA NN, PANASUK AF, RUDAKOWA SF, LURIÁ EA, RUADKOW IA. **Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.** Exp Hematol, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

FunRich: Functional Enrichment analysis tool.< <http://www.funrich.org/>>.

GAJOS-MICHNIEWICZ, A.; DUECHLER, M.; CZYZ, M. **MiRNA in melanoma-derived exosomes.** Cancer Lett, v. 347, n. 1, p. 29-37, May 28 2014.

GONG J, TONG Y, ZHANG HM, WANG K, HU T, SHAN G, SUN J, GUO AY. **Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis.** Hum MutatJan, v.33, n.1, p.254-63. 2012.

GRAHAM SM, JØRGENSEN HG, ALLAN E, PEARSON C, ALCORN MJ, RICHMOND L, HOLYOAKE TL. **Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro.** Blood, v. 99, n. 1, p. 319-25, Jan 1 2002.

GROSS JC, CHAUDHARY V, BARTSCHERER K, BOUTROS M. **Active Wnt proteins are secreted on exosomes.** Nat Cell Biol, v. 14, n. 10, p. 1036-45, Oct 2012.

GROTE P, WITTLER L, HENDRIX D,KOCH F, WÄHRISCH S, BEISAW A, MACURA K, BLÄSS G, KELLIS M, WERBER M, HERRMANN BG . **The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse.** Dev Cell, v. 24, n. 2, p. 206-14, Jan 28 2013.

GUPTA RA, SHAH N, WANG KC, KIM J, HORLINGS HM, WONG DJ, TSAI MC, HUNG T, ARGANI P, RINN JL, WANG Y, BRZOSKA P, KONG B, LI R, WEST RB, VAN DE VIJVER MJ, SUKUMAR S, CHANG HY. **Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis.** Nature, v. 464, n. 7291, p. 1071-6, Apr 15 2010.

GUTTMAN M, DONAGHEY J, CAREY BW, GARBER M, GRENIER JK, MUNSON G, YOUNG G, LUCAS AB, ACH R, BRUHN L, YANG X, AMIT I, MEISSNER A, REGEV A, RINN JL, ROOT DE, LANDER ES. **lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation.** Nature, v. 477, n. 7364, p. 295-300, Sep 15 2011.

HAJJARI, M; SALAVATY, A. **HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different Cancers.** Cancer Biol Med n. 12, p.1-9. 2015.

HAKULINEN J, SANKKILA L, SUGIYAMA N, LEHTI K, KESKI-OJA J. **Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes.** J Cell Biochem, v. 105, n. 5, p. 1211-8, Dec 1 2008.

HANNAFON, B. N.; DING, W. Q. **Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer.** Int J Mol Sci, v. 14, n. 7, p. 14240-69, 2013a.

HE M, FU Y, YAN Y, XIAO Q, WU H, YAO W, ZHAO H, ZHAO L, JIANG Q, YU Z¹, JIN F, MI X, WANG E, CUI Z, FU L, CHEN J, WEI M. **The Hedgehog signalling pathway mediates drug response of MCF-7 mammosphere cells in breast cancer patients.** Clin Sci (Lond), v. 129, n. 9, p. 809-22, Nov 1 2015.

HEARD, E.; DISTECHE, C. M. **Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome.** Genes Dev, v. 20, n. 14, p. 1848-67, Jul 15 2006.

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

HOFFMAN, E. de. **Tandem mass spectrometry: a primer.** J Mass Spectrom, 31 pp. 129–137. 1996.

HOLTZ, M. S.; FORMAN, S. J.; BHATIA, R. **Nonproliferating CML CD34+ progenitors are resistant to apoptosis induced by a wide range of proapoptotic stimuli.** Leukemia, v. 19, n. 6, p. 1034-41, Jun 2005.

HU B, PILLAI-NAIR N, HEMENWAY C. **Long-distance RNA-RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the potato virus X genome mediate minus- and plus- strand RNA synthesis.** RNA, v.13, n.2, p.267-280. 2007.

HU Y, CHEN Y, DOUGLAS L, LI S. **beta-Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia.** Leukemia, v. 23, n. 1, p. 109-16, Jan 2009.

HUARTE M, GUTTMAN M, FELDSEER D, GARBER M, KOZIOL MJ, KENZELMANN-BROZ D, KHALIL AM, ZUK O, AMIT I, RABANI M, ATTARDI LD, REGEV A, LANDER ES, JACKS T, RINN JL. **A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response.** Cell, v. 142, n. 3, p. 409-19, Aug 6 2010a.

HUNG T, WANG Y, LIN MF, KOEGEL AK, KOTAKE Y, GRANT GD, HORLINGS HM, SHAH N, UMBRIGHT C, WANG P, WANG Y, KONG B, LANGERØD A, BØRRESEN-

DALE AL, KIM SK, VAN DE VIJVER M, SUKUMAR S, WHITFIELD ML, KELLIS M, XIONG Y, WONG DJ, CHANG HY.. **Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters.** Nat Genet, v. 43, n. 7, p. 621-9, Jul 2011.

HUNTLY, B. J.; GILLILAND, D. G. **Cancer biology: summing up cancer stem cells.** In: (Ed.). Nature. England, v.435, 2005. p.1169-70.

JAMIESON CH1, AILLES LE, DYLLA SJ, MUIJTJENS M, JONES C, ZEHNDER JL, GOTLIB J, LI K, MANZ MG, KEATING A, SAWYERS CL, WEISSMAN IL. **Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML.** N Engl J Med, v. 351, n. 7, p. 657-67, Aug 12 2004.

JIN L, TABE Y, KONOPLEV S, XU Y, LEYSATH CE, LU H et al. **CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells.** Mol Cancer Ther 2008; 7: 48–58.

JØRGENSEN HG, ALLAN EK, JORDANIDES NE, MOUNTFORD JC, HOLYOAKE TL. **Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells.** Blood, v. 109, n. 9, p. 4016-9, May 1 2007.

KANG JS, MULIERI PJ, MILLER C, SASSOON DA, KRAUSS RS. **CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation.** J Cell Biol, v. 143, n. 2, p. 403-13, Oct 19 1998.

KAVRAN JM, WARD MD, OLADOSU OO, MULEPATI S, LEAHY DJ. **All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner.** J Biol Chem, v. 285, n. 32, p. 24584-90, Aug 6 2010.

KELLER S, SANDERSON MP, STOECK A, ALTEVOGT P. **Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function.** Immunol Lett, v. 107, n. 2, p. 102-8, Nov 15 2006.

KEMP, K. C.; HOWS, J.; DONALDSON, C. **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** Leuk Lymphoma, v. 46, n. 11, p. 1531-44, Nov 2005.

KIM DK, KANG B, KIM OY, CHOI DS, LEE J, KIM SR, GO G, YOON YJ, KIM JH, JANG SC, PARK KS, CHOI EJ, KIM KP, DESIDERIO DM, KIM YK, LÖTVALL J, HWANG D, GHOSH YS. **EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles.** J Extracell Vesicles. 2013

KINO T, HURT DE, ICHIJO T, NADER N, CHROUSOS GP. **Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor.** Sci Signal, v. 3, n. 107, p. ra8, 2010.

KOZIOL MJ, RINN JL. **RNA traffic control of chromatin complexes.** *Curr Opin Genet Dev.* v.20, n.2, p.142-148. **2010.**

KURZROCK R, KANTARJIAN HM, DRUKER BJ, TALPAZ M. **Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics.** *Ann Intern Med.* v. 138, n. 10, p. 819-30, May 20 2003.

LAKKARAJU, A.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. **Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity.** *Trends Cell Biol.* v. 18, n. 5, p. 199-209, May 2008.

LANDER, E. S. et al. (International Human Genome Sequencing Consortium). **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature.* v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb 15 2001.

LIAO HF, SU YC, ZHENG ZY, JHIH CAI C, HOU MH, CHAO KS, CHEN YJ. **Sonic hedgehog signaling regulates Bcr-Abl expression in human chronic myeloid leukemia cells.** *Biomed Pharmacother.* v. 66, n. 5, p. 378-83, Jul 2012.

LOEWER S1, CABILI MN, GUTTMAN M, LOH YH, THOMAS K, PARK IH, GARBER M, CURRAN M, ONDER T, AGARWAL S, MANOS PD, DATTA S, LANDER ES, SCHLAEGER TM, DALEY GQ, RINN J. **Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells.** *Nat Genet.* v. 42, n. 12, p. 1113-7, Dec 2010.

LONG B, ZHU H, ZHU C, LIU T, MENG W. **Activation of the Hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients.** *J Exp Clin Cancer Res.* v. 30, p. 8, 2011.

LORD,BI; TESTA, N; HENDRY,JH. **The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur.** v.46,n.1, p.65-72.1975.

MAHON FX, RÉA D, GUILHOT J, GUILHOT F, HUGUET F, NICOLINI F, LEGROS L, CHARBONNIER A, GUERCI A, VARET B, ETIENNE G, REIFFERS J, ROUSSELOT P; INTERGROUPE FRANÇAIS DES LEUCÉMIES MYÉLOÏDES CHRONIQUES. **Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial.** *Lancet Oncol.* v. 11, n. 11, p. 1029-35, Nov 2010.

MAO YB, XUE XY, TAO XY, YANG CQ, WANG LJ, CHEN XY. **Cysteine protease enhances plant-mediated bollworm RNA interference.** *Plant Mol Biol.* v.83, n.1, v.2, p.119-129.2013.

MCCREADY J, SIMS JD, CHAN D, JAY DG. **Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation.** *BMC Cancer.* v. 10, p. 294, 2010.

MECKES, D. G., JR.; RAAB-TRAUB, N. **Microvesicles and viral infection.** *J Virol.* v. 85, n. 24, p. 12844-54, Dec 2011.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. **Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution**

in human cancer. Nat Rev Cancer, v. 7, n. 6, p. 441-53, Jun 2007.

MetaCore™. Data-mining and pathway analysis.
<http://thomsonreuters.com/en/products-services/pharma-life-sciences/pharmaceutical-research/metacore.html>.

MINEO M, GARFIELD SH, TAVERNA S, FLUGY A, DE LEO G, ALESSANDRO R, KOHN EC. **Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion.** Angiogenesis, v. 15, n. 1, p. 33-45, Mar 2012.

MODI H, MCDONALD T, CHU S, YEE JK, FORMAN SJ, BHATIA R. **Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells.** Blood, v. 109, n. 12, p. 5411-21, Jun 15 2007.

MULIERI PJ, KANG JS, SASSOON DA, KRAUSS RS. **Expression of the boc gene during murine embryogenesis.** Dev Dyn, v. 223, n. 3, p. 379-88, Mar 2002.

MURALIDHARAN-CHARI,V; CLANCY, JW; SEDGWICK, A; D'SOUZA-SCHOREY,C. **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** J Cell Sci. v.15, n. 123(10), p. 1603–1611. 2010 .

NAKAHARA, F. **Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia.** Blood, v. 115, n. 14, p. 2872-81, Apr 8 2010.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. **Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.** J Natl Cancer Inst, v. 25, p. 85-109, Jul 1960.

OKADA A, CHARRON F, MORIN S, SHIN DS, WONG K, FABRE PJ, TESSIER-LAVIGNE M, MCCONNELL SK. **Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons.** Nature, v. 444, n. 7117, p. 369-73, Nov 16 2006.

OU J, VERGILIO JA, BAGG A. **Molecular diagnosis and monitoring in the clinical management of patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors.** Am J Hematol. v. 83, n.4, p.296-302. 2008.

PARMAR K, MAUCH P, VERGILIO JA, SACKSTEIN R, DOWN JD. **Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 104, n. 13, p. 5431-6, Mar 27 2007.

PERRIMON, N.; PITSOULI, C.; SHILO, B. Z. **Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning.** Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 4, n. 8, p. 5975, 2012.

PERROTTI, D. et al. **Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation.** J Clin Invest, v. 120, n. 7, p. 2254-64, Jul 2010.

PIZZATTI L, BINATO R, COFRE J, GOMES BE, DOBBIN J, HAUSSMANN ME, D'AZAMBUJA D, BOUZAS LF, ABDELHAY . **SUZ12 is a candidate target of the non-canonical WNT pathway in the progression of chronic myeloid leukemia.** Genes Chromosomes Cancer, v. 49, n. 2, p. 107-18, Feb 2010.

PIZZATTI L1, PANIS C, LEMOS G, ROCHA M, CECCHINI R, SOUZA GH, ABDELHAY E. **Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: disclosing new insights from therapy resistance.** Proteomics, v. 12, n. 17, p. 2618-31, Aug 2012.

PRENSNER, J. R. et al. **Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression.** Nat Biotechnol, v. 29, n. 8, p. 742-9, Aug 2011.

RADICH, J. P. et al. **Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, n. 8, p. 2794-9, Feb 21 2006.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. **Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.** J Cell Biol, v. 200, n. 4, p. 373-83, Feb 18 2013.

RECORD, M. et al. **Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiology.** Biochim Biophys Acta, v. 1841, n. 1, p. 108-20, Jan 2014.

RECORD,M; CARAYON,K; POIROT,M; SILVENTE-POIROT,S. **Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiology.** Biochim Biophys Acta. v.1841,n.1, p. 108-120. 2014.

REDAELLI A, LASKIN BL, STEPHENS JM, BOTTEMAN MF, PASHOS CL. **The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia.** Eur J Cancer Care (Engl), v. 13, n. 3, p. 279-87, Jul 2004.

REYA, T; CLEVERS,H. **Wnt signalling in stem cells and cancer.** Nature. v.434, n.7035,p.843-850. 2005.

ROMA- RODRIGUES,C; FERNANDES,AR; BAPTISTA,PV. **Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells.** Biomed Res Int. v.2014; p.179486.2014.

ROORDA BD, TER ELST A, KAMPS WA, DE BONT ES. **Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells.** Crit Rev Oncol Hematol, v. 69, n. 3, p. 187-98, Mar 2009. ISSN 1040-8428.

SAWYERS, C. L. **Making progress through molecular attacks on cancer.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v. 70, p. 479-82, 2005.

SCHOFIELD, R. **A comparative study of the repopulating potential of grafts from various haemopoietic sources: CFU repopulation.** Cell Tissue Kinet, v. 3, n. 2, p. 119-30, Apr 1970.

SCHOFIELD, R. **The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.** Blood Cells, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978.

SCHOREY, J. S.; BHATNAGAR, S. **Exosome function: from tumor immunology to**

pathogen biology. Traffic, v. 9, n. 6, p. 871-81, Jun 2008.

SCHUMACHER,R; KESMIR, C; van buuren, M. **Biomarkers in Cancer Immunotherapy** Cancer Cell . 27(1):12-4. 2015.

SEKE ETET, P. F.; VECCHIO, L.; NWABO KAMDJE, A. H. **Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: key role of stromal microenvironment.** Cell Signal, v. 24, n. 9, p. 1883-8, Sep 2012.

SERDLOW, SH; CAMPO, E; HARRIS, NL; JAFFE, ES; PILERI, SA; STEIN, H; THIELE, J; VARDIMAN, JW. **World Health Organization Classifications of Tumours. of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.** IARC Press, Lyon, France. 2008.

Shlush,LI and Minden, MD. **Preleukemia: the normal side of cancer.** Current Opinion.V. 22, n.2, 2015

SILVEIRA RA, FACHEL AA, MOREIRA YB, DE SOUZA CA, COSTA FF, VERJOVSKI-ALMEIDA S, PAGNANO KB. **Protein-coding genes and long noncoding RNAs are differentially expressed in dasatinib-treated chronic myeloid leukemia patients with resistance to imatinib.** Hematology, v. 19, n. 1, p. 31-41, Jan 2014.

SIMPSON, RJ; KALRA,H MATHIVANAN,S. ExoCarta as a resource for exosomal research. J Extracell Vesicles. **2012.**

SIMPSON, R. J.; JENSEN, S. S.; LIM, J. W. **Proteomic profiling of exosomes: current perspectives.** Proteomics, v. 8, n. 19, p. 4083-99, Oct 2008.

SKORSKI, T. **Genetic mechanisms of chronic myeloid leukemia blastic transformation.** Curr Hematol Malig Rep, v. 7, n. 2, p. 87-93, Jun 2012.

SU, W. et al. **Sonic hedgehog maintains survival and growth of chronic myeloid leukemia progenitor cells through beta-catenin signaling.** Exp Hematol, v. 40, n. 5, p. 418-27, May 2012.

SUGIYAMA, T. et al. **Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches.** Immunity, v. 25, n. 6, p. 977-88, Dec 2006.

SUI, X. et al. **Crosstalk Between DNA and Histones: Tet's New Role in Embryonic Stem Cells.** Curr Genomics, v. 13, n. 8, p. 603-8, Dec 2012.

SWERDLOW SH, JAFFE ES, BROUSSET P, CHAN JK, DE LEVAL L, GAULARD P, HARRIS NL, PILERI S, WEISS LM; INTERNATIONAL LYMPHOMA STUDY ROUP. CYTOTOXIC T-CELL AND NK-CELL lymphomas: current questions and controversies. Am J Surg Pathol. v.38, n.10, p. 60-71. 2014

TAIPALE, J. et al. **Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed.** Nature, v. 418, n. 6900, p. 892-7, Aug 22 2002.

TAVERNA, S. et al. **Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis.** Int J Cancer, v. 130, n. 9, p. 2033-43, May 1 2012.

TENZEN T, ALLEN BL, COLE F, KANG JS, KRAUSS RS, MCMAHON AP. **The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice.** Dev Cell, v. 10, n. 5, p. 647-56, May 2006.

THERY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. **Membrane vesicles as conveyors of immune responses.** Nat Rev Immunol, v. 9, n. 8, p. 581-93, Aug 2009.

THERY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. **Exosomes: composition, biogenesis and function.** Nat Rev Immunol, v. 2, n. 8, p. 569-79, Aug 2002.

UMIEL T, FRIEDMAN S, ZAIZOV R, COHEN IJ, GOZES Y, EPSTEIN N, KOBILER D, ZIPORI D. **Long-term culture of infant leukemia cells: dependence upon stromal cells from the bone marrow and bilineage differentiation.** Leuk Res, v. 10, n. 8, p. 1007-13, 1986.

UniProt: a hub for protein information database. <http://uniprot.org>

van der pol E, BÖING AN, HARRISON P, STURK A, NIEUWLAND R. **Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles.** Pharmacol Rev, v. 64, n. 3, p. 676-705, Jul 2012.

VAZ DE CAMPOS, MG; MONTESANO, FT; RODRIGUES, MM; CHAUFFAILLE Mde,L. **Clinical implications of der(9q) deletions detected through dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia.** Cancer Genet Cytogenet. v.178, n.1, p. 49-56. 2007.

VERFAILLIE C, HURLEY R, BHATIA R, MCCARTHY JB. **Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis.** Crit Rev Oncol Hematol, v. 16, n. 3, p. 201-24, Jun 1994.

VERMA RK, YU W, SINGH SP, SHANKAR S, SRIVASTAVA RK. **Anthothecol-encapsulated PLGA nanoparticles inhibit pancreatic cancer stem cell growth by modulating sonic hedgehog pathway.** Nanomedicine, Jul 19 2015.

VINCIGUERRA, P.; STUTZ, F. **mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores.** Curr Opin Cell Biol, v. 16, n. 3, p. 285-92, Jun 2004.

VLASSOV AV1, MAGDALENO S, SETTERQUIST R, CONRAD R. **Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials.** Biochim Biophys Acta, v. 1820, n. 7, p. 940-8, Jul 2012.

VOGESER, M. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry--application in the clinical laboratory.** Clin Chem Lab Med, v. 41, n. 2, p. 117-26, Feb 2003.

WARD, S.A.; RUBIN, J.B. **Not so Fast: Co-Requirements for Sonic Hedgehog Induced Brain Tumorigenesis.** Cancers (Basel), v. 7, n. 3, p. 1484-98, 2015.

WILLINGHAM AT, ORTH AP, BATALOV S, PETERS EC, WEN BG, AZA-BLANC

P, HOGENESCH JB, SCHULTZ PG. **A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT.** Science, v. 309, n. 5740, p. 1570-3, Sep 2 2005.

WITTERS LM1, WITKOSKI A, PLANAS-SILVA MD, BERGER M, VIALLET J, LIPTON A. **Synergistic inhibition of breast cancer cell lines with a dual inhibitor of EGFR-HER-2/neu and a Bcl-2 inhibitor.** Oncol Rep, v. 17, n. 2, p. 465-9, Feb 2007.

WOLF-YADLIN A, HAUTANIEMI S, LAUFFENBURGER DA, WHITE FM. **Multiple reaction monitoring for robust quantitative proteomic analysis of cellular signaling networks.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 104, n. 14, p. 5860-5, Apr 3 2007.

WRIGHT DE, WAGERS AJ, GULATI AP, JOHNSON FL, WEISSMAN IL. **Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells.** Science, v. 294, n. 5548, p. 1933-6, Nov 30 2001.

ZAKHAROVA, L.; SVETLOVA, M.; FOMINA, A. F. **T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor.** J Cell Physiol, v. 212, n. 1, p. 174-81, Jul 2007.

ZENG L, WANG YY, ZHANG J, LIN P, GONG XD, HUANG LG. **IN utero exposure to dichlorvos induces apoptosis of Leydig cells in rats.** Zhonghua Nan Ke Xue, v. 15, n. 11, p. 1001-6, Nov 2009. 1009-3591.

ZHANG, H. M.; ZHANG, L. S. **Influence of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation of chronic myeloid leukemia cells.** Ai Zheng, v. 28, n. 1, p. 29-32, Jan 2009.

ZHANG J, NIU C, YE L, HUANG H, HE X, TONG WG, ROSS J, HAUG J, JOHNSON T, FENG JQ, HARRIS S, WIEDEMANN LM, MISHINA Y, LI L. **Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size.** Nature, v. 425, n. 6960, p. 836-41, Oct 23 2003.

ZHANG W, KANG JS, COLE F, YI MJ, KRAUSS RS. **Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly.** Dev Cell, v. 10, n. 5, p. 657-65, May 2006.

ZHAO C, CHEN A, JAMIESON CH, FERESHTEH M, ABRAHAMSSON A, BLUM J, KWON HY, KIM J, CHUTE JP, RIZZIERI D, MUNCHHOF M, VANARSDALE T, BEACHY PA, REYA T. **Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia.** Nature, v. 458, n. 7239, p. 776-9, Apr 9 2009.

ZUO, C, WANG Z, LU H, DAI Z, LIU X, CUI L. **Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation.** Mol Med Rep, v. 8, n. 2, p. 463-7, Aug 2013. ISSN 1791-2997.

<<http://www.rpciflow.org/services/multiplex.html>> Acesso em: 05 de Junho de 2015.

ANEXO I

Quadro 2. Proteínas aumentadas identificadas em exossomos purificados de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

Proteínas aumentadas em exossomos de pacientes com LMC			
Acesso	Descrição	Score	Únicas/ Razão
ACACB_HUMAN	Acetyl CoA carboxylase 2 OS Homo sapiens GN ACACB PE 1 SV 3	53,51	0,012525357
ASM3A_HUMAN	Acid sphingomyelinase like phosphodiesterase 3a OS Homo sapiens GN SMPDL3A PE 1 SV 2	297,64	EXO LMC
ACTA_HUMAN	Actin aortic smooth muscle OS Homo sapiens GN ACTA2 PE 1 SV 1	1599,85	EXO LMC
ACTH_HUMAN	Actin gamma enteric smooth muscle OS Homo sapiens GN ACTG2 PE 1 SV 1	470,21	EXO LMC
BST1_HUMAN	ADP ribosyl cyclase 2 OS Homo sapiens GN BST1 PE 1 SV 2	291,12	EXO LMC
ALAT2_HUMAN	Alanine aminotransferase 2 OS Homo sapiens GN GPT2 PE 1 SV 1	211,22	EXO LMC
A1AG1_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 1 OS Homo sapiens GN ORM1 PE 1 SV 1	4293,56	EXO LMC
AMPQ_HUMAN	Aminopeptidase Q OS Homo sapiens GN AQPEP PE 1 SV 4	145,57	EXO LMC
AP1M2_HUMAN	AP 1 complex subunit mu 2 OS Homo sapiens GN AP1M2 PE 1 SV 4	159,48	EXO LMC
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A IV OS Homo sapiens GN APOA4 PE 1 SV 3	239,48	EXO LMC
BAHC1_HUMAN	BAH and coiled coil domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN BAHCC1 PE 1 SV 3	22,24	0,491644208
BAIP3_HUMAN	BAI1 associated protein 3 OS Homo sapiens GN BAIAP3 PE 1 SV 2	173,44	0,003624642
E41L5_HUMAN	Band 4.1 like protein 5 OS Homo sapiens GN EPB41L5 PE 1 SV 3	79,02	EXO LMC
MANBA_HUMAN	Beta mannosidase OS Homo sapiens GN MANBA PE 1 SV 3	112,91	EXO LMC
BOC_HUMAN	Brother of CDO OS Homo sapiens GN BOC PE 1 SV 1	146,71	EXO LMC
MYCPP_HUMAN	C myc promoter binding protein OS Homo sapiens GN DENND4A PE 1 SV 2	147,7	EXO LMC
CG010_HUMAN	CaiB baiF CoA transferase family protein C7orf10 OS Homo sapiens GN C7orf10 PE 1 SV 2	293,75	EXO LMC
CATG_HUMAN	Cathepsin G OS Homo sapiens GN CTSG PE 1 SV 2	1213,07	EXO LMC
CENPP_HUMAN	Centromere protein P OS Homo sapiens GN CENPP PE 1 SV 1	86,27	EXO LMC
CE350_HUMAN	Centrosome associated protein 350 OS Homo sapiens GN CEP350 PE 1 SV 1	23,45	0,089815287

CSDE1_HUMAN	Cold shock domain containing protein E1 OS Homo sapiens GN CSDE1 PE 1 SV 2	121,12	EXO LMC
FHR3_HUMAN	Complement factor H related protein 3 OS Homo sapiens GN CFHR3 PE 1 SV 2	549,79	EXO LMC
CDKL1_HUMAN	Cyclin dependent kinase like 1 OS Homo sapiens GN CDKL1 PE 1 SV 5	146,25	EXO LMC
DCNL5_HUMAN	DCN1 like protein 5 OS Homo sapiens GN DCUN1D5 PE 1 SV 1	333,9	EXO LMC
DPYD_HUMAN	Dihydropyrimidine dehydrogenase NADP OS Homo sapiens GN DPYD PE 1 SV 2	118,41	EXO LMC
ERCC8_HUMAN	DNA excision repair protein ERCC 8 OS Homo sapiens GN ERCC8 PE 1 SV 1	189,82	EXO LMC
PERE_HUMAN	Eosinophil peroxidase OS Homo sapiens GN EPX PE 1 SV 2	132,5	EXO LMC
LOXE3_HUMAN	Epidermis type lipoxygenase 3 OS Homo sapiens GN ALOXE3 PE 1 SV 1	194,35	EXO LMC
STOM_HUMAN	Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS Homo sapiens GN STOM PE 1 SV 3	242,61	EXO LMC
FILA_HUMAN	Filaggrin OS Homo sapiens GN FLG PE 1 SV 3	12,45	EXO LMC
FOXL1_HUMAN	Forkhead box protein L1 OS Homo sapiens GN FOXL1 PE 2 SV 2	584,89	EXO LMC
GBF1_HUMAN	Golgi specific brefeldin A resistance guanine nucleotide exchange factor 1 OS Homo sapiens GN GBF1 P	102,6	0,024477522
HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta OS Homo sapiens GN HBD PE 1 SV 2	6414,06	EXO LMC
HBG1_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma 1 OS Homo sapiens GN HBG1 PE 1 SV 2	4735,79	EXO LMC
ASH1L_HUMAN	Histone lysine N methyltransferase ASH1L OS Homo sapiens GN ASH1L PE 1 SV 2	97,67	EXO LMC
HJURP_HUMAN	Holliday junction recognition protein OS Homo sapiens GN HJURP PE 1 SV 2	141,09	EXO LMC
IGHG2_HUMAN	Ig gamma 2 chain C region OS Homo sapiens GN IGHG2 PE 1 SV 2	31132,27	0,726149042
HV316_HUMAN	Ig heavy chain V III region TEI OS Homo sapiens PE 1 SV 1	34264,94	EXO LMC
KV113_HUMAN	Ig kappa chain V I region Lay OS Homo sapiens PE 1 SV 1	3350,46	EXO LMC
KV125_HUMAN	Ig kappa chain V I region WAT OS Homo sapiens PE 1 SV 1	18174,29	EXO LMC
KV201_HUMAN	Ig kappa chain V II region Cum OS Homo sapiens PE 1 SV 1	3090,79	EXO LMC
IRF4_HUMAN	Interferon regulatory factor 4 OS Homo sapiens GN IRF4 PE 1 SV 1	697,91	EXO LMC
IQEC2_HUMAN	IQ motif and SEC7 domain containing protein 2 OS Homo sapiens GN IQSEC2 PE 1 SV 1	75,5	EXO LMC
K1C18_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 18 OS Homo sapiens GN KRT18 PE 1 SV 2	358,17	EXO LMC

TRFL_HUMAN	Lactotransferrin OS Homo sapiens GN LTF PE 1 SV 6	150,56	EXO LMC
LZTS1_HUMAN	Leucine zipper putative tumor suppressor 1 OS Homo sapiens GN LZTS1 PE 1 SV 3	128,52	EXO LMC
LYSC_HUMAN	Lysozyme C OS Homo sapiens GN LYZ PE 1 SV 1	9265,3	0,166960176
MGA_HUMAN	Maltase glucoamylase intestinal OS Homo sapiens GN MGAM PE 1 SV 5	22,68	EXO LMC
MMEL1_HUMAN	Membrane metallo endopeptidase like 1 OS Homo sapiens GN MMEL1 PE 1 SV 2	192,66	EXO LMC
PERM_HUMAN	Myeloperoxidase OS Homo sapiens GN MPO PE 1 SV 1	1106,83	EXO LMC
MYOM2_HUMAN	Myomesin 2 OS Homo sapiens GN MYOM2 PE 2 SV 2	82,21	0,26184566
MYOM3_HUMAN	Myomesin 3 OS Homo sapiens GN MYOM3 PE 2 SV 1	128,01	EXO LMC
MYH9_HUMAN	Myosin 9 OS Homo sapiens GN MYH9 PE 1 SV 4	43,1	0,02678268
NELF_HUMAN	Nasal embryonic luteinizing hormone releasing hormone factor OS Homo sapiens GN NELF PE 1 SV 1	304,79	EXO LMC
NELFE_HUMAN	Negative elongation factor E OS Homo sapiens GN RDBP PE 1 SV 3	515,89	EXO LMC
NBAS_HUMAN	Neuroblastoma amplified sequence OS Homo sapiens GN NBAS PE 1 SV 2	76,31	EXO LMC
NTF4_HUMAN	Neurotrophin 4 OS Homo sapiens GN NTF4 PE 1 SV 1	198,02	EXO LMC
NCF1_HUMAN	Neutrophil cytosol factor 1 OS Homo sapiens GN NCF1 PE 1 SV 3	225,4	EXO LMC
DEF1_HUMAN	Neutrophil defensin 1 OS Homo sapiens GN DEFA1 PE 1 SV 1	14644,42	EXO LMC
DEF3_HUMAN	Neutrophil defensin 3 OS Homo sapiens GN DEFA3 PE 1 SV 1	14644,42	EXO LMC
ELNE_HUMAN	Neutrophil elastase OS Homo sapiens GN ELANE PE 1 SV 1	1228,76	EXO LMC
NOS3_HUMAN	Nitric oxide synthase endothelial OS Homo sapiens GN NOS3 PE 1 SV 3	59,24	EXO LMC
NCOA5_HUMAN	Nuclear receptor coactivator 5 OS Homo sapiens GN NCOA5 PE 1 SV 2	337,82	EXO LMC
NR5A2_HUMAN	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 OS Homo sapiens GN NR5A2 PE 1 SV 2	264,89	EXO LMC
GLE1_HUMAN	Nucleoporin GLE1 OS Homo sapiens GN GLE1 PE 1 SV 2	190,99	EXO LMC
PPIA_HUMAN	Peptidyl prolyl cis trans isomerase A OS Homo sapiens GN PPIA PE 1 SV 2	433,31	EXO LMC
ACOX3_HUMAN	Peroxisomal acyl coenzyme A oxidase 3 OS Homo sapiens GN ACOX3 PE 1 SV 2	126,85	EXO LMC
PACS1_HUMAN	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1 OS Homo sapiens GN PACS1 PE 1 SV 2	127,32	EXO LMC

GALT2_HUMAN	Polypeptide N acetylgalactosaminyltransferase 2 OS Homo sapiens GN GALNT2 PE 1 SV 1	201,36	EXO LMC
KCNA1_HUMAN	Potassium voltage gated channel subfamily A member 1 OS Homo sapiens GN KCNA1 PE 1 SV 2	101,5	EXO LMC
PROX1_HUMAN	Prospero homeobox protein 1 OS Homo sapiens GN PROX1 PE 1 SV 2	123,21	EXO LMC
F135B_HUMAN	Protein FAM135B OS Homo sapiens GN FAM135B PE 2 SV 2	93,51	EXO LMC
F75A4_HUMAN	Protein FAM75A4 OS Homo sapiens GN FAM75A4 PE 3 SV 2	160,57	EXO LMC
F75A7_HUMAN	Protein FAM75A7 OS Homo sapiens GN FAM75A7 PE 2 SV 4	160,57	EXO LMC
MB211_HUMAN	Protein mab 21 like 1 OS Homo sapiens GN MAB21L1 PE 2 SV 1	260,82	EXO LMC
S10A8_HUMAN	Protein S100 A8 OS Homo sapiens GN S100A8 PE 1 SV 1	4156	EXO LMC
S10A9_HUMAN	Protein S100 A9 OS Homo sapiens GN S100A9 PE 1 SV 1	2639,47	EXO LMC
S6OS1_HUMAN	Protein SIX6OS1 OS Homo sapiens GN SIX6OS1 PE 2 SV 2	318,37	EXO LMC
UN13D_HUMAN	Protein unc 13 homolog D OS Homo sapiens GN UNC13D PE 1 SV 1	163,79	EXO LMC
PUM1_HUMAN	Pumilio homolog 1 OS Homo sapiens GN PUM1 PE 1 SV 3	138,39	EXO LMC
GLPK3_HUMAN	Putative glycerol kinase 3 OS Homo sapiens GN GK3P PE 5 SV 2	167,56	EXO LMC
RGPD1_HUMAN	RANBP2 like and GRIP domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN RGPD1 PE 2 SV 1	62,94	0,256660773
RGPD3_HUMAN	RanBP2 like and GRIP domain containing protein 3 OS Homo sapiens GN RGPD3 PE 2 SV 2	42,17	0,12245644
PDE6A_HUMAN	Rod cGMP specific 3 5 cyclic phosphodiesterase subunit alpha OS Homo sapiens GN PDE6A PE 1 SV 4	146,95	EXO LMC
C163A_HUMAN	Scavenger receptor cysteine rich type 1 protein M130 OS Homo sapiens GN CD163 PE 1 SV 2	142,67	EXO LMC
SH321_HUMAN	SH3 domain containing protein 21 OS Homo sapiens GN SH3D21 PE 1 SV 2	170,97	EXO LMC
SHC1_HUMAN	SHC transforming protein 1 OS Homo sapiens GN SHC1 PE 1 SV 4	184,65	EXO LMC
SLIK3_HUMAN	SLIT and NTRK like protein 3 OS Homo sapiens GN SLITRK3 PE 2 SV 2	146,4	EXO LMC
SOS2_HUMAN	Son of sevenless homolog 2 OS Homo sapiens GN SOS2 PE 1 SV 2	169,74	EXO LMC
SYT17_HUMAN	Synaptotagmin 17 OS Homo sapiens GN SYT17 PE 1 SV 1	234,61	EXO LMC

TEP1_HUMAN	Telomerase protein component 1 OS Homo sapiens GN TEP1 PE 1 SV 2	57,31	EXO LMC
TX13B_HUMAN	Testis expressed sequence 13B protein OS Homo sapiens GN TEX13B PE 2 SV 1	130,52	EXO LMC
BGH3_HUMAN	Transforming growth factor beta induced protein ig h3 OS Homo sapiens GN TGFBI PE 1 SV 1	160,87	EXO LMC
TMEM2_HUMAN	Transmembrane protein 2 OS Homo sapiens GN TMEM2 PE 1 SV 1	19,83	0,014846368
SNUT1_HUMAN	U4 U6 U5 tri snRNP associated protein 1 OS Homo sapiens GN SART1 PE 1 SV 1	153,33	EXO LMC
UBP11_HUMAN	Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 11 OS Homo sapiens GN USP11 PE 1 SV 3	77,74	EXO LMC
UBA1_HUMAN	Ubiquitin like modifier activating enzyme 1 OS Homo sapiens GN UBA1 PE 1 SV 3	160,98	EXO LMC
CC017_HUMAN	Uncharacterized protein C3orf17 OS Homo sapiens GN C3orf17 PE 1 SV 3	230,86	EXO LMC
K0528_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0528 OS Homo sapiens GN KIAA0528 PE 1 SV 1	150,52	EXO LMC
UTRO_HUMAN	Utrophin OS Homo sapiens GN UTRN PE 1 SV 2	27,55	0,236927745
VPS35_HUMAN	Vacuolar protein sorting associated protein 35 OS Homo sapiens GN VPS35 PE 1 SV 2	145,56	EXO LMC
VITRN_HUMAN	Vitrin OS Homo sapiens GN VIT PE 2 SV 1	107,4	EXO LMC
ZC3H3_HUMAN	Zinc finger CCCH domain containing protein 3 OS Homo sapiens GN ZC3H3 PE 1 SV 3	107,25	EXO LMC
ZFY26_HUMAN	Zinc finger FYVE domain containing protein 26 OS Homo sapiens GN ZFYVE26 PE 1 SV 3	36,67	0,278037308
Z286A_HUMAN	Zinc finger protein 286A OS Homo sapiens GN ZNF286A PE 2 SV 1	128,42	EXO LMC
ZN642_HUMAN	Zinc finger protein 642 OS Homo sapiens GN ZNF642 PE 1 SV 2	44,02	EXO LMC

Quadro 3. Proteínas diminuídas identificadas em exossomos purificados de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

Proteínas diminuídas em exossomos de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica			
Acesso	Descrição	Score	Únicas/Razão
AAKG2_HUMAN	5 AMP activated protein kinase subunit gamma 2 OS Homo sapiens GN PRKAG2 PE 1 SV 1	209,89	EXO DOADORES
ATS13_HUMAN	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13 OS Homo sapiens GN ADAMTS13 PE 1 S	54,75	EXO DOADORES
SPKAP_HUMAN	A kinase anchor protein SPHKAP OS Homo sapiens GN SPHKAP PE 1 SV 1	88,9	3,387187831
ACTS_HUMAN	Actin alpha skeletal muscle OS Homo sapiens GN ACTA1 PE 1 SV 1	395,29	EXO DOADORES
ASCC3_HUMAN	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 OS Homo sapiens GN ASCC3 PE 1 SV 3	174,43	EXO DOADORES

FAHD1_HUMAN	Acylpyruvase FAHD1 mitochondrial OS Homo sapiens GN FAHD1 PE 1 SV 2	312,71	EXO DOADORES
A1AG2_HUMAN	Alpha 1 acid glycoprotein 2 OS Homo sapiens GN ORM2 PE 1 SV 2	693,54	EXO DOADORES
AACT_HUMAN	Alpha 1 antichymotrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA3 PE 1 SV 2	2579,53	EXO DOADORES
A1AT_HUMAN	Alpha 1 antitrypsin OS Homo sapiens GN SERPINA1 PE 1 SV 3	1426,56	EXO DOADORES
A2MG_HUMAN	Alpha 2 macroglobulin OS Homo sapiens GN A2M PE 1 SV 3	4460,15	4,526730751
ACTN2_HUMAN	Alpha actinin 2 OS Homo sapiens GN ACTN2 PE 1 SV 1	124,12	EXO DOADORES
KI67_HUMAN	Antigen KI 67 OS Homo sapiens GN MKI67 PE 1 SV 2	12,45	2,745600989
ANT3_HUMAN	Antithrombin III OS Homo sapiens GN SERPINC1 PE 1 SV 1	1410,76	EXO DOADORES
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A I OS Homo sapiens GN APOA1 PE 1 SV 1	6975,44	3,78104355
APOA2_HUMAN	Apolipoprotein A II OS Homo sapiens GN APOA2 PE 1 SV 1	5541,76	EXO DOADORES
APOB_HUMAN	Apolipoprotein B 100 OS Homo sapiens GN APOB PE 1 SV 2	161,67	4,437095561
APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C III OS Homo sapiens GN APOC3 PE 1 SV 1	3057,77	EXO DOADORES
APOE_HUMAN	Apolipoprotein E OS Homo sapiens GN APOE PE 1 SV 1	4483,39	EXO DOADORES
APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1 OS Homo sapiens GN APOL1 PE 1 SV 5	1399,99	EXO DOADORES
APOH_HUMAN	Beta 2 glycoprotein 1 OS Homo sapiens GN APOH PE 1 SV 3	888,19	5,206979703
BHMT1_HUMAN	Betaine homocysteine S methyltransferase 1 OS Homo sapiens GN BHMT PE 1 SV 2	156,57	EXO DOADORES
C4BPA_HUMAN	C4b binding protein alpha chain OS Homo sapiens GN C4BPA PE 1 SV 2	646,14	8,248240419
C4BPB_HUMAN	C4b binding protein beta chain OS Homo sapiens GN C4BPB PE 1 SV 1	1651,2	EXO DOADORES
CABP5_HUMAN	Calcium binding protein 5 OS Homo sapiens GN CABP5 PE 2 SV 1	335,89	EXO DOADORES
PDE10_HUMAN	cAMP and cAMP inhibited cGMP 3 5 cyclic phosphodiesterase 10A OS Homo sapiens GN PDE10A PE 1 SV 1	157,44	EXO DOADORES
CAR11_HUMAN	Caspase recruitment domain containing protein 11 OS Homo sapiens GN CARD11 PE 1 SV 3	29,66	3,158192834
CD5L_HUMAN	CD5 antigen like OS Homo sapiens GN CD5L PE 1 SV 1	1152,35	10,59095034
CENPC_HUMAN	Centromere protein C 1 OS Homo sapiens GN CENPC1 PE 1 SV 2	28,29	8,166169134

CENPJ_HUMAN	Centromere protein J OS Homo sapiens GN CENPJ PE 1 SV 2	48,03	EXO DOADORES
C170L_HUMAN	Cep170 like protein OS Homo sapiens GN CEP170P1 PE 5 SV 2	124,88	EXO DOADORES
CSPG4_HUMAN	Chondroitin sulfate proteoglycan 4 OS Homo sapiens GN CSPG4 PE 1 SV 2	111,52	EXO DOADORES
CLSPN_HUMAN	Claspin OS Homo sapiens GN CLSPN PE 1 SV 3	66,25	EXO DOADORES
CLUS_HUMAN	Clusterin OS Homo sapiens GN CLU PE 1 SV 1	573,99	EXO DOADORES
CO1A2_HUMAN	Collagen alpha 2 I chain OS Homo sapiens GN COL1A2 PE 1 SV 7	44,33	EXO DOADORES
C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit A OS Homo sapiens GN C1QA PE 1 SV 2	1796,46	EXO DOADORES
C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit B OS Homo sapiens GN C1QB PE 1 SV 3	2231,07	EXO DOADORES
C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C OS Homo sapiens GN C1QC PE 1 SV 3	911,57	5,812437339
C1RL_HUMAN	Complement C1r subcomponent like protein OS Homo sapiens GN C1RL PE 1 SV 2	420,86	EXO DOADORES
C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent OS Homo sapiens GN C1R PE 1 SV 2	4357,86	EXO DOADORES
C1S_HUMAN	Complement C1s subcomponent OS Homo sapiens GN C1S PE 1 SV 1	3909,95	EXO DOADORES
CO3_HUMAN	Complement C3 OS Homo sapiens GN C3 PE 1 SV 2	6510,36	5,584528624
CO4B_HUMAN	Complement C4 B OS Homo sapiens GN C4B PE 1 SV 1	3839,32	4,305959693
CO5_HUMAN	Complement C5 OS Homo sapiens GN C5 PE 1 SV 4	1167,59	EXO DOADORES
CO6_HUMAN	Complement component C6 OS Homo sapiens GN C6 PE 1 SV 3	431,13	EXO DOADORES
CO7_HUMAN	Complement component C7 OS Homo sapiens GN C7 PE 1 SV 2	489,8	EXO DOADORES
CO8A_HUMAN	Complement component C8 alpha chain OS Homo sapiens GN C8A PE 1 SV 2	326,24	EXO DOADORES
CO8B_HUMAN	Complement component C8 beta chain OS Homo sapiens GN C8B PE 1 SV 3	514,77	EXO DOADORES
CO8G_HUMAN	Complement component C8 gamma chain OS Homo sapiens GN C8G PE 1 SV 3	2291,06	EXO DOADORES
CO9_HUMAN	Complement component C9 OS Homo sapiens GN C9 PE 1 SV 2	568,53	EXO DOADORES
CFAH_HUMAN	Complement factor H OS Homo sapiens GN CFH PE 1 SV 4	569,25	9,487735836
FHR1_HUMAN	Complement factor H related protein 1 OS Homo sapiens GN CFHR1 PE 1 SV 2	69,28	3,743421574
FHR2_HUMAN	Complement factor H related protein 2 OS Homo sapiens GN CFHR2 PE 1 SV 1	1313,4	EXO DOADORES

KCRU_HUMAN	Creatine kinase U type mitochondrial OS Homo sapiens GN CKMT1A PE 1 SV 1	208,6	EXO DOADORES
CP19A_HUMAN	Cytochrome P450 19A1 OS Homo sapiens GN CYP19A1 PE 1 SV 3	162,76	EXO DOADORES
ACOC_HUMAN	Cytoplasmic aconitate hydratase OS Homo sapiens GN ACO1 PE 1 SV 3	84,48	EXO DOADORES
DNLI4_HUMAN	DNA ligase 4 OS Homo sapiens GN LIG4 PE 1 SV 2	240,81	EXO DOADORES
DNJC3_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 3 OS Homo sapiens GN DNAJC3 PE 1 SV 1	173,64	EXO DOADORES
DMD_HUMAN	Dystrophin OS Homo sapiens GN DMD PE 1 SV 3	26,02	2,095935534
ELTD1_HUMAN	EGF latrophilin and seven transmembrane domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN ELTD1 PE 1 S	155,6	EXO DOADORES
EHD4_HUMAN	EH domain containing protein 4 OS Homo sapiens GN EHD4 PE 1 SV 1	184,63	EXO DOADORES
EVL_HUMAN	Ena VASP like protein OS Homo sapiens GN EVL PE 1 SV 2	250,06	EXO DOADORES
EPIPL_HUMAN	Epiplakin OS Homo sapiens GN EPPK1 PE 1 SV 2	22,5	2,857650982
EIF2A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS Homo sapiens GN EIF2A PE 1 SV 3	91,97	EXO DOADORES
FBX8_HUMAN	F box only protein 8 OS Homo sapiens GN FBXO8 PE 2 SV 1	197,6	EXO DOADORES
FBN3_HUMAN	Fibrillin 3 OS Homo sapiens GN FBN3 PE 2 SV 3	78,35	EXO DOADORES
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain OS Homo sapiens GN FGA PE 1 SV 2	4606	1,185304853
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain OS Homo sapiens GN FGB PE 1 SV 2	8068,06	1,173510867
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain OS Homo sapiens GN FGG PE 1 SV 3	11749,99	1,632316236
FRS2_HUMAN	Fibroblast growth factor receptor substrate 2 OS Homo sapiens GN FRS2 PE 1 SV 4	195,76	EXO DOADORES
FINC_HUMAN	Fibronectin OS Homo sapiens GN FN1 PE 1 SV 4	104,8	2,033991215
FSIP1_HUMAN	Fibrous sheath interacting protein 1 OS Homo sapiens GN FSIP1 PE 2 SV 1	193,88	EXO DOADORES
LG3BP_HUMAN	Galectin 3 binding protein OS Homo sapiens GN LGALS3BP PE 1 SV 1	5696,28	EXO DOADORES
GELS_HUMAN	Gelsolin OS Homo sapiens GN GSN PE 1 SV 1	81,54	7,099327336
GSTT4_HUMAN	Glutathione S transferase theta 4 OS Homo sapiens GN GSTT4 PE 3 SV 2	210,33	EXO DOADORES
GDPD1_HUMAN	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing protein 1 OS Homo sapiens GN GDPD1 PE 1 SV	240,62	EXO DOADORES
GCYA3_HUMAN	Guanylate cyclase soluble subunit alpha 3 OS Homo sapiens GN GUCY1A3 PE 1 SV 2	123,48	EXO DOADORES

GCYB1_HUMAN	Guanylate cyclase soluble subunit beta 1 OS Homo sapiens GN GUCY1B3 PE 1 SV 1	141,98	EXO DOADORES
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS Homo sapiens GN HP PE 1 SV 1	3723,05	1,632316236
HPTR_HUMAN	Haptoglobin related protein OS Homo sapiens GN HPR PE 1 SV 2	1718,48	2,534509196
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS Homo sapiens GN HBA1 PE 1 SV 2	11125,47	1,323129814
HBE_HUMAN	Hemoglobin subunit epsilon OS Homo sapiens GN HBE1 PE 1 SV 2	1990,08	EXO DOADORES
HBG2_HUMAN	Hemoglobin subunit gamma 2 OS Homo sapiens GN HBG2 PE 1 SV 2	1847,5	EXO DOADORES
HEMO_HUMAN	Hemopexin OS Homo sapiens GN HPX PE 1 SV 2	2041,99	EXO DOADORES
HIG2A_HUMAN	HIG1 domain family member 2A OS Homo sapiens GN HIGD2A PE 1 SV 1	637,57	EXO DOADORES
HRG_HUMAN	Histidine rich glycoprotein OS Homo sapiens GN HRG PE 1 SV 1	2331,11	EXO DOADORES
H2A1H_HUMAN	Histone H2A type 1 H OS Homo sapiens GN HIST1H2AH PE 1 SV 3	1681,94	EXO DOADORES
H2A1J_HUMAN	Histone H2A type 1 J OS Homo sapiens GN HIST1H2AJ PE 1 SV 3	1681,94	EXO DOADORES
HXD3_HUMAN	Homeobox protein Hox D3 OS Homo sapiens GN HOXD3 PE 2 SV 3	133,31	1,934792385
IGHA1_HUMAN	Ig alpha 1 chain C region OS Homo sapiens GN IGH A1 PE 1 SV 2	12396,11	2,247907992
IGHA2_HUMAN	Ig alpha 2 chain C region OS Homo sapiens GN IGH A2 PE 1 SV 3	4968,67	2,117000017
IGHG1_HUMAN	Ig gamma 1 chain C region OS Homo sapiens GN IGH G1 PE 1 SV 1	106556	1,491824707
IGHG3_HUMAN	Ig gamma 3 chain C region OS Homo sapiens GN IGH G3 PE 1 SV 2	27656,86	1,233678052
IGHG4_HUMAN	Ig gamma 4 chain C region OS Homo sapiens GN IGH G4 PE 1 SV 1	21787,96	1,323129814
HV102_HUMAN	Ig heavy chain V I region HG3 OS Homo sapiens PE 4 SV 1	424,33	1,973877746
HV103_HUMAN	Ig heavy chain V I region V35 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	973,64	2,459603053
HV209_HUMAN	Ig heavy chain V II region ARH 77 OS Homo sapiens PE 4 SV 1	1481,97	EXO DOADORES
HV305_HUMAN	Ig heavy chain V III region BRO OS Homo sapiens PE 1 SV 1	26655,12	6,423736863
HV306_HUMAN	Ig heavy chain V III region BUT OS Homo sapiens PE 1 SV 1	762,22	EXO DOADORES
HV320_HUMAN	Ig heavy chain V III region GAL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1036,18	4,526730751
HV310_HUMAN	Ig heavy chain V III region HIL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	3642,86	EXO DOADORES

HV304_HUMAN	Ig heavy chain V III region TIL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	14827,34	2,691234498
HV318_HUMAN	Ig heavy chain V III region TUR OS Homo sapiens PE 1 SV 1	15522,21	9,299866257
HV303_HUMAN	Ig heavy chain V III region VH26 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	50171,48	EXO DOADORES
HV302_HUMAN	Ig heavy chain V III region WEA OS Homo sapiens PE 1 SV 1	9181,51	7,924822589
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS Homo sapiens GN IGKC PE 1 SV 1	145567,6	1,233678052
KV101_HUMAN	Ig kappa chain V I region AG OS Homo sapiens PE 1 SV 1	18934,88	3,287081395
KV102_HUMAN	Ig kappa chain V I region AU OS Homo sapiens PE 1 SV 1	47122,84	EXO DOADORES
KV105_HUMAN	Ig kappa chain V I region DEE OS Homo sapiens PE 1 SV 1	10387,51	EXO DOADORES
KV106_HUMAN	Ig kappa chain V I region EU OS Homo sapiens PE 1 SV 1	4763,78	2,459603053
KV110_HUMAN	Ig kappa chain V I region HK102 Fragment OS Homo sapiens GN IGKV1 5 PE 4 SV 1	4206,98	1,716006899
KV121_HUMAN	Ig kappa chain V I region Ni OS Homo sapiens PE 1 SV 1	7252,23	EXO DOADORES
KV116_HUMAN	Ig kappa chain V I region Roy OS Homo sapiens PE 1 SV 1	19464,02	3,387187831
KV118_HUMAN	Ig kappa chain V I region WEA OS Homo sapiens PE 1 SV 1	26941,75	3,12676832
KV119_HUMAN	Ig kappa chain V I region Wes OS Homo sapiens PE 1 SV 1	14578,54	EXO DOADORES
KV206_HUMAN	Ig kappa chain V II region RPMI 6410 OS Homo sapiens PE 4 SV 1	3909,33	EXO DOADORES
KV204_HUMAN	Ig kappa chain V II region TEW OS Homo sapiens PE 1 SV 1	4132,58	3,287081395
KV307_HUMAN	Ig kappa chain V III region GOL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	44194,07	EXO DOADORES
KV312_HUMAN	Ig kappa chain V III region HAH OS Homo sapiens PE 2 SV 1	70262,13	EXO DOADORES
KV313_HUMAN	Ig kappa chain V III region HIC OS Homo sapiens PE 2 SV 2	85443,95	EXO DOADORES
KV303_HUMAN	Ig kappa chain V III region NG9 Fragment OS Homo sapiens PE 1 SV 1	30964,78	3,525421454
KV302_HUMAN	Ig kappa chain V III region SIE OS Homo sapiens PE 1 SV 1	37048,5	3,455613498
KV304_HUMAN	Ig kappa chain V III region Ti OS Homo sapiens PE 1 SV 1	43294,09	EXO DOADORES
KV309_HUMAN	Ig kappa chain V III region VG Fragment OS Homo sapiens PE 1 SV 1	8627,18	1,69893226
KV305_HUMAN	Ig kappa chain V III region WOL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	42977,68	2,773194711

KV401_HUMAN	Ig kappa chain V IV region Fragment OS Homo sapiens GN IGKV4 1 PE 4 SV 1	53418,15	EXO DOADORES
KV402_HUMAN	Ig kappa chain V IV region Len OS Homo sapiens PE 1 SV 2	8903,74	3,78104355
KV405_HUMAN	Ig kappa chain V IV region STH Fragment OS Homo sapiens PE 1 SV 1	2802,57	EXO DOADORES
LAC1_HUMAN	Ig lambda 1 chain C regions OS Homo sapiens GN IGLC1 PE 1 SV 1	98430,36	8,758284709
LAC2_HUMAN	Ig lambda 2 chain C regions OS Homo sapiens GN IGLC2 PE 1 SV 1	113752,8	3,7061735
LAC3_HUMAN	Ig lambda 3 chain C regions OS Homo sapiens GN IGLC3 PE 1 SV 1	111039,5	8,004468304
LV102_HUMAN	Ig lambda chain V I region HA OS Homo sapiens PE 1 SV 1	2674,8	6,48829643
LV103_HUMAN	Ig lambda chain V I region NEW OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1802,63	EXO DOADORES
LV104_HUMAN	Ig lambda chain V I region NIG 64 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1008,01	EXO DOADORES
LV106_HUMAN	Ig lambda chain V I region WAH OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1467,86	8,671138403
LV205_HUMAN	Ig lambda chain V II region BUR OS Homo sapiens PE 1 SV 1	2600,25	EXO DOADORES
LV302_HUMAN	Ig lambda chain V III region LOI OS Homo sapiens PE 1 SV 1	6125,48	EXO DOADORES
LV301_HUMAN	Ig lambda chain V III region SH OS Homo sapiens PE 1 SV 1	1487,9	3,819043633
LV401_HUMAN	Ig lambda chain V IV region Bau OS Homo sapiens PE 1 SV 1	99,21	EXO DOADORES
LV405_HUMAN	Ig lambda chain V IV region MOL OS Homo sapiens PE 1 SV 1	2206,68	EXO DOADORES
IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region OS Homo sapiens GN IGHM PE 1 SV 3	18382,11	8,758284709
MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein OS Homo sapiens PE 1 SV 1	10784,83	6,553504831
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain OS Homo sapiens GN IGJ PE 1 SV 4	1679,49	9,299866257
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda like polypeptide 5 OS Homo sapiens GN IGLL5 PE 2 SV 2	98505,91	8,004468304
TEX14_HUMAN	Inactive serine threonine protein kinase TEX14 OS Homo sapiens GN TEX14 PE 1 SV 2	11,69	7,389056099
ALS_HUMAN	Insulin like growth factor binding protein complex acid labile subunit OS Homo sapiens GN IGFALS PE	207,02	EXO DOADORES
ITA11_HUMAN	Integrin alpha 11 OS Homo sapiens GN ITGA11 PE 1 SV 2	139,95	EXO DOADORES
ITIH1_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H1 OS Homo sapiens GN ITIH1 PE 1 SV 3	318,08	1,648721271

ITIH2_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H2 OS Homo sapiens GN ITIH2 PE 1 SV 2	527,01	2,054433269
ITIH4_HUMAN	Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain H4 OS Homo sapiens GN ITIH4 PE 1 SV 4	282,11	EXO DOADORES
IRAK1_HUMAN	Interleukin 1 receptor associated kinase 1 OS Homo sapiens GN IRAK1 PE 1 SV 2	232,62	EXO DOADORES
IL17RC_HUMAN	Interleukin 17 receptor C OS Homo sapiens GN IL17RC PE 1 SV 2	104,14	EXO DOADORES
IL6_HUMAN	Interleukin 6 OS Homo sapiens GN IL6 PE 1 SV 1	312,72	EXO DOADORES
K2C5_HUMAN	Keratin type II cytoskeletal 5 OS Homo sapiens GN KRT5 PE 1 SV 3	129,06	EXO DOADORES
LAD1_HUMAN	Ladinin 1 OS Homo sapiens GN LAD1 PE 1 SV 2	157,91	EXO DOADORES
LETM1_HUMAN	LETM1 and EF hand domain containing protein 1 mitochondrial OS Homo sapiens GN LETM1 PE 1 SV 1	211,96	EXO DOADORES
LRRF1_HUMAN	Leucine rich repeat flightless interacting protein 1 OS Homo sapiens GN LRRFIP1 PE 1 SV 2	128,53	EXO DOADORES
LRIG3_HUMAN	Leucine rich repeats and immunoglobulin like domains protein 3 OS Homo sapiens GN LRIG3 PE 2 SV 1	23,64	EXO DOADORES
LRP8_HUMAN	Low density lipoprotein receptor related protein 8 OS Homo sapiens GN LRP8 PE 1 SV 4	175,98	4,903749092
MBL2_HUMAN	Mannose binding protein C OS Homo sapiens GN MBL2 PE 1 SV 2	395,23	EXO DOADORES
MAGI2_HUMAN	Membrane associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing protein 2 OS Homo sapiens GN MAGI	190,71	EXO DOADORES
MAGI3_HUMAN	Membrane associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing protein 3 OS Homo sapiens GN MAGI	19,73	6,296538471
MEP1A_HUMAN	Meprin A subunit alpha OS Homo sapiens GN MEP1A PE 1 SV 2	114,5	EXO DOADORES
MAT2B_HUMAN	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta OS Homo sapiens GN MAT2B PE 1 SV 1	238,93	EXO DOADORES
MARE3_HUMAN	Microtubule associated protein RP EB family member 3 OS Homo sapiens GN MAPRE3 PE 1 SV 1	123,47	2,1382762
M3K14_HUMAN	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 14 OS Homo sapiens GN MAP3K14 PE 1 SV 2	182,91	EXO DOADORES
MRP6_HUMAN	Multidrug resistance associated protein 6 OS Homo sapiens GN ABCC6 PE 1 SV 2	67,91	EXO DOADORES
RENB_P_HUMAN	N acylglucosamine 2 epimerase OS Homo sapiens GN RENBP PE 1 SV 2	264,95	EXO DOADORES
NRX2A_HUMAN	Neurexin 2 alpha OS Homo sapiens GN NRXN2 PE 2 SV 1	88,93	4,758820973

NOL8_HUMAN	Nucleolar protein 8 OS Homo sapiens GN NOL8 PE 1 SV 1	133,14	EXO DOADORES
PTX3_HUMAN	Pentraxin related protein PTX3 OS Homo sapiens GN PTX3 PE 1 SV 3	240,94	EXO DOADORES
PGM5_HUMAN	Phosphoglucomutase like protein 5 OS Homo sapiens GN PGM5 PE 1 SV 2	183,96	EXO DOADORES
PEDF_HUMAN	Pigment epithelium derived factor OS Homo sapiens GN SERPINF1 PE 1 SV 4	1129,32	EXO DOADORES
IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor OS Homo sapiens GN SERPING1 PE 1 SV 2	693,75	EXO DOADORES
PLMN_HUMAN	Plasminogen OS Homo sapiens GN PLG PE 1 SV 2	890,25	4,572225108
PLSI_HUMAN	Plastin 1 OS Homo sapiens GN PLS1 PE 1 SV 2	190,62	EXO DOADORES
PLF4_HUMAN	Platelet factor 4 OS Homo sapiens GN PF4 PE 1 SV 2	1186,86	EXO DOADORES
PAR14_HUMAN	Poly ADP ribose polymerase 14 OS Homo sapiens GN PARP14 PE 1 SV 3	33,89	14,43997029
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E OS Homo sapiens GN POTEE PE 1 SV 3	339,77	EXO DOADORES
POTEI_HUMAN	POTE ankyrin domain family member I OS Homo sapiens GN POTEI PE 3 SV 1	451,4	EXO DOADORES
PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein OS Homo sapiens GN PZP PE 1 SV 4	377,35	5,053090341
PRR11_HUMAN	Proline rich protein 11 OS Homo sapiens GN PRR11 PE 1 SV 1	110,65	12,06127624
PROP_HUMAN	Properdin OS Homo sapiens GN CFP PE 1 SV 2	1076,69	EXO DOADORES
MTG16_HUMAN	Protein CBFA2T3 OS Homo sapiens GN CBFA2T3 PE 1 SV 2	57,73	EXO DOADORES
DDI1_HUMAN	Protein DDI1 homolog 1 OS Homo sapiens GN DDI1 PE 1 SV 1	187,02	EXO DOADORES
F110D_HUMAN	Protein FAM110D OS Homo sapiens GN FAM110D PE 2 SV 1	224,26	EXO DOADORES
PTAR1_HUMAN	Protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing protein 1 OS Homo sapiens GN PTAR1 PE 2 SV	273,11	EXO DOADORES
THRB_HUMAN	Prothrombin OS Homo sapiens GN F2 PE 1 SV 2	209,93	4,953032542
TRH_HUMAN	Prothyroliberin OS Homo sapiens GN TRH PE 1 SV 1	496,22	EXO DOADORES
PUS7_HUMAN	Pseudouridylate synthase 7 homolog OS Homo sapiens GN PUS7 PE 1 SV 2	203,36	EXO DOADORES
PHS_HUMAN	Pterin 4 alpha carbinolamine dehydratase OS Homo sapiens GN PCBD1 PE 1 SV 2	299,36	EXO DOADORES
ACTBM_HUMAN	Putative beta actin like protein 3 OS Homo sapiens GN POTEKP PE 5 SV 1	444,19	EXO DOADORES

F90AL_HUMAN	Putative protein FAM90A like OS Homo sapiens PE 3 SV 2	272,86	EXO DOADORES
CR018_HUMAN	Putative uncharacterized protein encoded LINC00526 OS Homo sapiens GN LINC00526 PE 5 SV 1	399,94	EXO DOADORES
ODPB_HUMAN	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta mitochondrial OS Homo sapiens GN PDHB PE 1 SV 3	431,99	EXO DOADORES
RADI_HUMAN	Radixin OS Homo sapiens GN RDX PE 1 SV 1	67,84	EXO DOADORES
GRP1_HUMAN	RAS guanyl releasing protein 1 OS Homo sapiens GN RASGRP1 PE 1 SV 2	159,32	EXO DOADORES
RAB30_HUMAN	Ras related protein Rab 30 OS Homo sapiens GN RAB30 PE 1 SV 2	352,54	EXO DOADORES
REEP4_HUMAN	Receptor expression enhancing protein 4 OS Homo sapiens GN REEP4 PE 1 SV 1	599,28	EXO DOADORES
RCC1_HUMAN	Regulator of chromosome condensation OS Homo sapiens GN RCC1 PE 1 SV 1	58,07	EXO DOADORES
RBM44_HUMAN	RNA binding protein 44 OS Homo sapiens GN RBM44 PE 2 SV 2	197,25	EXO DOADORES
RYR3_HUMAN	Ryanodine receptor 3 OS Homo sapiens GN RYR3 PE 1 SV 3	42,96	1,616074385
SEN2_HUMAN	Sentrin specific protease 2 OS Homo sapiens GN SENP2 PE 1 SV 3	189,28	EXO DOADORES
ESPL1_HUMAN	Separin OS Homo sapiens GN ESPL1 PE 1 SV 3	21,52	EXO DOADORES
ATR_HUMAN	Serine threonine protein kinase ATR OS Homo sapiens GN ATR PE 1 SV 3	49,86	4,953032542
TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS Homo sapiens GN TF PE 1 SV 3	1968,87	2,159766213
ALBU_HUMAN	Serum albumin OS Homo sapiens GN ALB PE 1 SV 2	29408	2,339646908
SAMP_HUMAN	Serum amyloid P component OS Homo sapiens GN APCS PE 1 SV 2	1426,34	EXO DOADORES
AT1A1_HUMAN	Sodium potassium transporting ATPase subunit alpha 1 OS Homo sapiens GN ATP1A1 PE 1 SV 1	140,77	EXO DOADORES
SPEG_HUMAN	Striated muscle preferentially expressed protein kinase OS Homo sapiens GN SPEG PE 1 SV 4	98,8	2,270499821
SMRC1_HUMAN	SWI SNF complex subunit SMARCC1 OS Homo sapiens GN SMARCC1 PE 1 SV 3	138,64	EXO DOADORES
SYN2_HUMAN	Synapsin 2 OS Homo sapiens GN SYN2 PE 1 SV 3	126,9	EXO DOADORES
SYCP1_HUMAN	Synaptonemal complex protein 1 OS Homo sapiens GN SYCP1 PE 1 SV 2	34,96	EXO DOADORES
SYNM_HUMAN	Synemin OS Homo sapiens GN SYNM PE 1 SV 2	209,29	EXO DOADORES

TVC_HUMAN	T cell receptor gamma chain V region PT gamma 1 2 OS Homo sapiens GN TRGV3 PE 2 SV 1	525,87	EXO DOADORES
TIAM2_HUMAN	T lymphoma invasion and metastasis inducing protein 2 OS Homo sapiens GN TIAM2 PE 2 SV 4	113,07	2,1382762
TLN2_HUMAN	Talin 2 OS Homo sapiens GN TLN2 PE 1 SV 4	77,78	EXO DOADORES
TEN4_HUMAN	Teneurin 4 OS Homo sapiens GN ODZ4 PE 2 SV 2	19,37	EXO DOADORES
TTC23_HUMAN	Tetratricopeptide repeat protein 23 OS Homo sapiens GN TTC23 PE 2 SV 1	354,25	EXO DOADORES
TSTD2_HUMAN	Thiosulfate sulfurtransferase rhodanese like domain containing protein 2 OS Homo sapiens GN TSTD2 PE	159,59	EXO DOADORES
TSP1_HUMAN	Thrombospondin 1 OS Homo sapiens GN THBS1 PE 1 SV 2	216,72	EXO DOADORES
EI2BA_HUMAN	Translation initiation factor eIF 2B subunit alpha OS Homo sapiens GN EIF2B1 PE 1 SV 1	274,08	EXO DOADORES
SG223_HUMAN	Tyrosine protein kinase SgK223 OS Homo sapiens GN SGK223 PE 1 SV 3	79,46	53,51703525
UBX11_HUMAN	UBX domain containing protein 11 OS Homo sapiens GN UBXN11 PE 2 SV 2	162,37	EXO DOADORES
CA198_HUMAN	Uncharacterized protein C1orf198 OS Homo sapiens GN C1orf198 PE 1 SV 1	243,38	EXO DOADORES
CF062_HUMAN	Uncharacterized protein C6orf62 OS Homo sapiens GN C6orf62 PE 2 SV 1	388,09	EXO DOADORES
YD002_HUMAN	Uncharacterized protein FLJ44066 OS Homo sapiens PE 1 SV 1	62,31	7,099327336
VPS52_HUMAN	Vacuolar protein sorting associated protein 52 homolog OS Homo sapiens GN VPS52 PE 1 SV 1	192,81	EXO DOADORES
PROS_HUMAN	Vitamin K dependent protein S OS Homo sapiens GN PROS1 PE 1 SV 1	637,01	EXO DOADORES
VTNC_HUMAN	Vitronectin OS Homo sapiens GN VTN PE 1 SV 1	387,64	3,095656485
ZN432_HUMAN	Zinc finger protein 432 OS Homo sapiens GN ZNF432 PE 1 SV 1	10,73	EXO DOADORES
ZN541_HUMAN	Zinc finger protein 541 OS Homo sapiens GN ZNF541 PE 1 SV 2	78,53	3,034358438
ZN638_HUMAN	Zinc finger protein 638 OS Homo sapiens GN ZNF638 PE 1 SV 2	23,76	EXO DOADORES
BNC1_HUMAN	Zinc finger protein basonuclin 1 OS Homo sapiens GN BNC1 PE 1 SV 2	172,98	EXO DOADORES
ZRAB3_HUMAN	Zinc finger Ran binding domain containing protein 3 OS Homo sapiens GN ZRANB3 PE 2 SV 2	168,43	8,166169134

ANEXO II

METACORE QUICK REFERENCE GUIDE

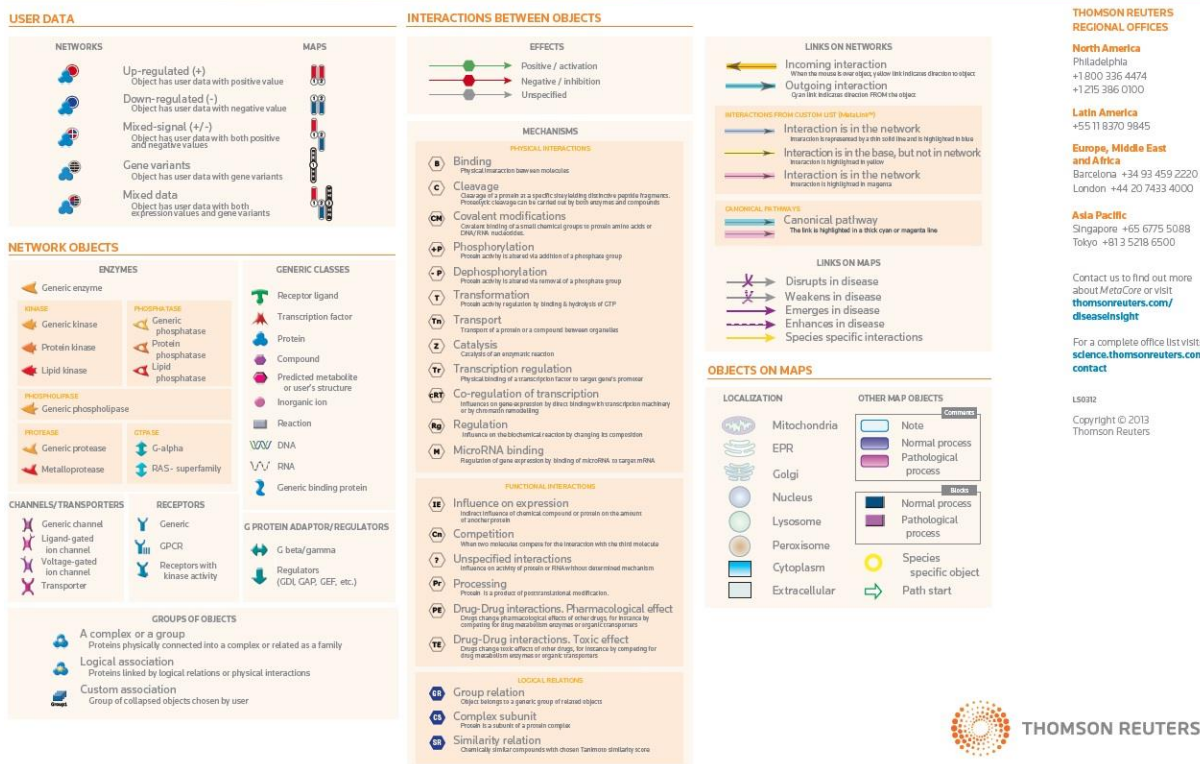


Figura 5.6.3. Guias de referência dos dados obtidos através do software Metacore.

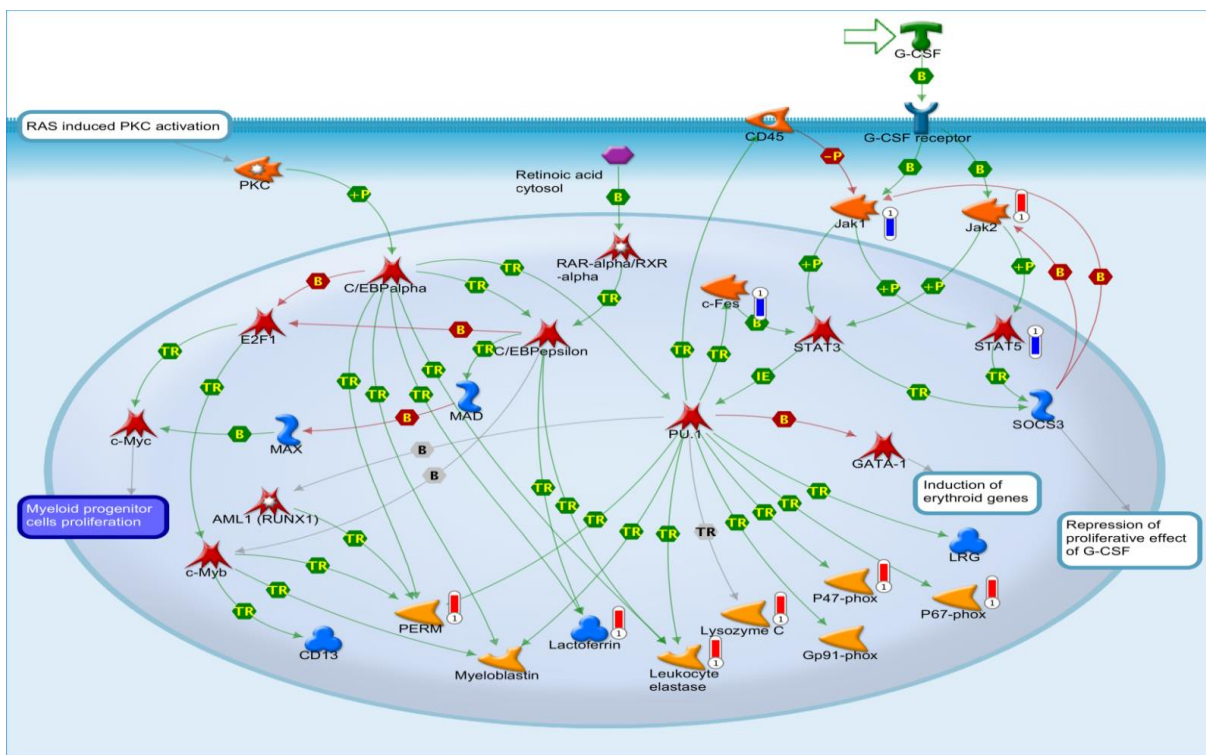


Figura 5.6.4. Via de regulação da transcrição de granulócitos. Pode-se observar, pela indicação dos termômetros vermelhos, a presença de proteínas com expressão aumentada na via de regulação da transcrição de granulócitos.

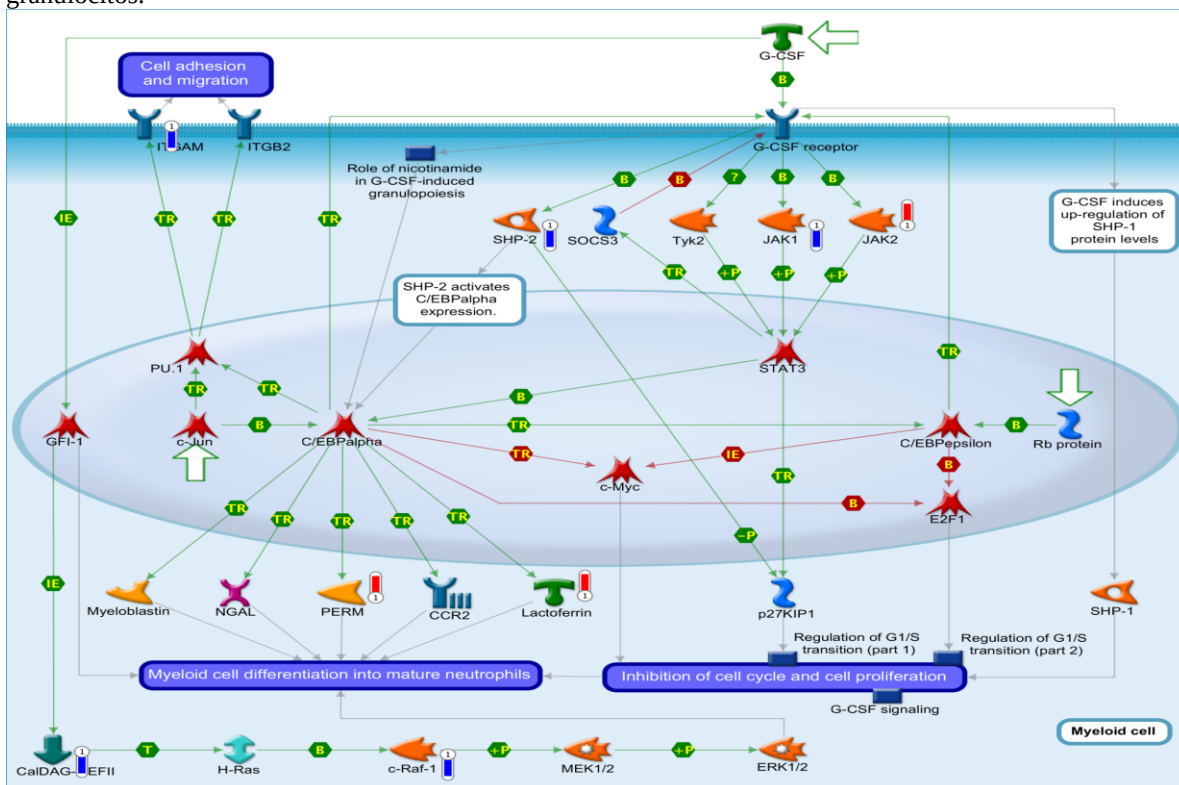
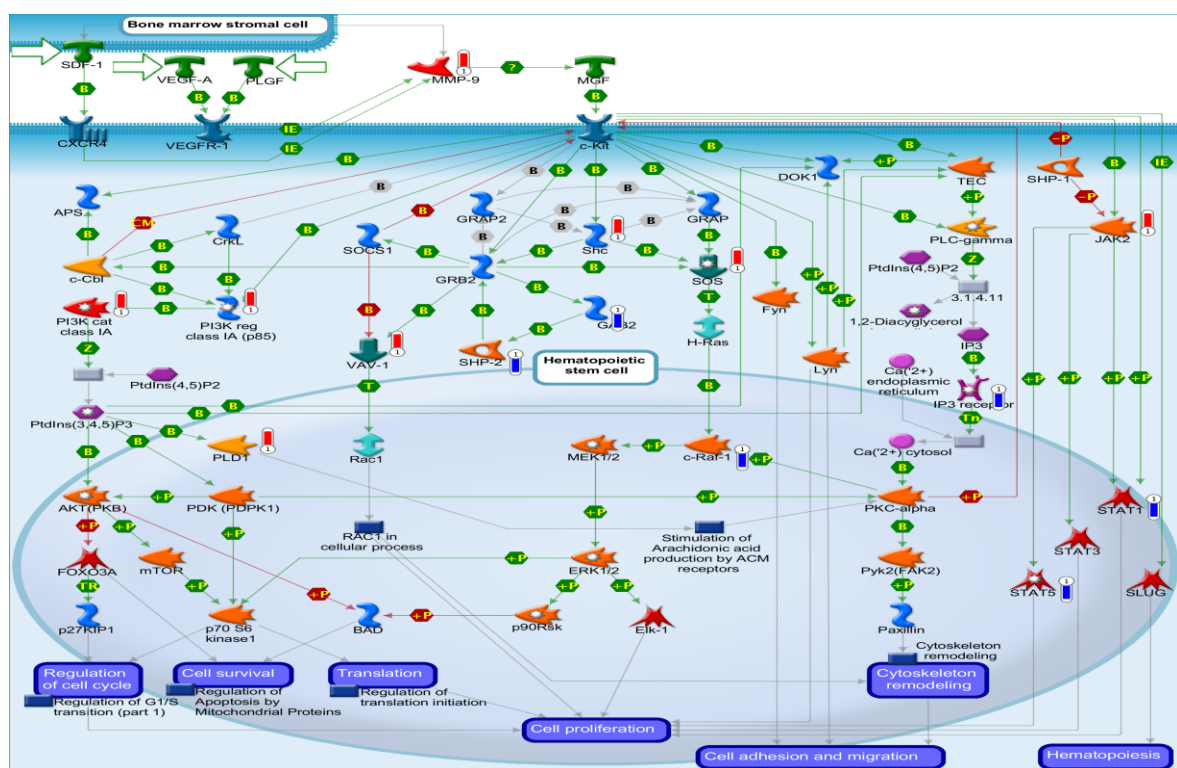
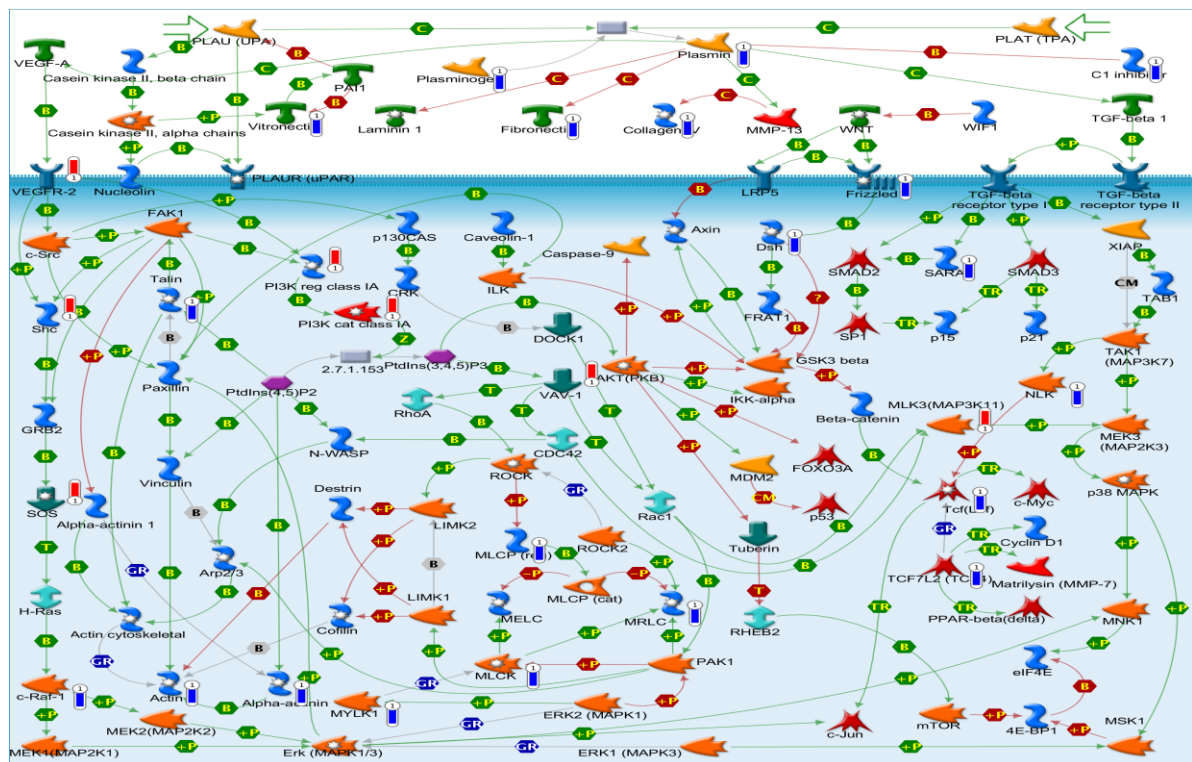


Figura 5.6.5. Via de indução da diferenciação mielóide mediada por G-CSF. Esta via encontrou-se putativamente alterada nas amostras dos pacientes. Este resultado condiz com o bloqueio da diferenciação dos granulócitos e da produção de blastos na medula óssea na LMC.



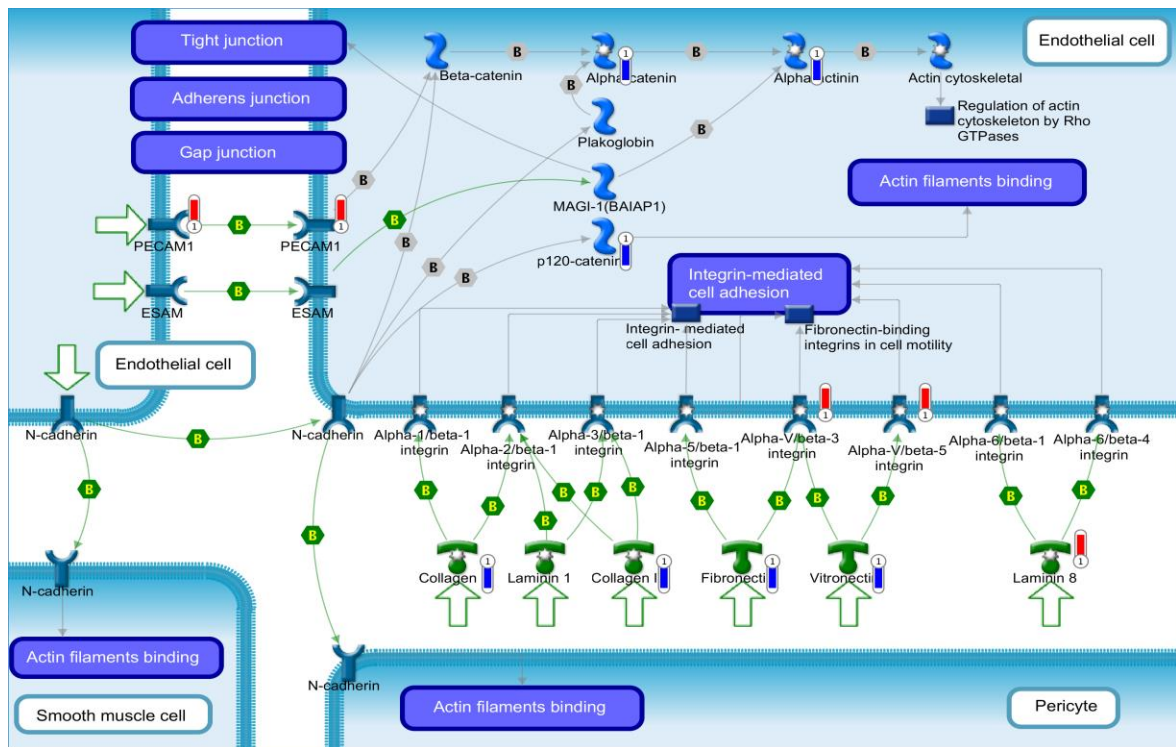


Figura 5.6.8. Via de contato de células endoteliais por mecanismos não juncionais.