

Marina Passos Torrealba

**Efeito de nanovesículas extracelulares derivadas de linhagens tumorais de
linfoma T cutâneo em queratinócitos imortalizados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches
Junior

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Notomi Sato

**São Paulo
2022**

Marina Passos Torrealba

**Efeito de nanovesículas extracelulares derivadas de linhagens tumorais de
linfoma T cutâneo em queratinócitos imortalizados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Sanches
Junior

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Notomi Sato

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Torrealba, Marina Passos
Efeito de nanovesículas extracelulares derivadas
de linhagens tumorais de linfoma T cutâneo em
queratinócitos imortalizados / Marina Passos
Torrealba. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: José Antonio Sanches Junior.
Coorientador: Maria Notomi Sato.

Descritores: 1.Vesículas extracelulares 2.Células
epidérmicas 3.Células HaCaT 4.Micose fungoide
5.Síndrome de Sézary 6.Adesão celular 7.Inflamação
8.Indutores da angiogênese

USP/FM/DBD-294/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Enquanto escrevo essa seção muitos pensamentos vêm à mente. Foi uma jornada longa que passou rápido, rica em aprendizados e experiências, e bastante intensa. Também teve a colaboração de diversas pessoas, de muitos lugares, de diferentes maneiras. A elas escrevo meu agradecimento detalhado abaixo.

Ao Prof. Dr. José Antonio Sanches Jr, pela orientação e pela confiança neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a. Maria Notomi Sato pela coorientação, parceria e compreensão. Pela grande disponibilidade ao longo desses anos. Pelos “empurrãozinhos” e pelo incentivo maternal nesse período de orientação.

Ao Prof. Dr. Anders Woetmann por me receber em seu grupo de pesquisa na Universidade de Copenhagen, Dinamarca. Agradeço também pela confiança, pela dedicada supervisão e pelas tantas discussões de resultados. E, por lembrar que ciência é, antes de tudo, entusiasmante.

Ao meu pai, Carlos Torrealba, pelo apoio fraternal e incondicional. Pelo suporte afetivo, financeiro e emocional.

Ao meu irmão Maurício, longe fisicamente, mas muito presente durante essa etapa. Obrigada pela escuta, bom humor e parceria.

Aos meus queridos irmãos, Marcelo e Leandro, sempre presentes. A minha querida tia Lygia pelo carinho e apoio familiar.

Ao Jacob Vahr, por estar tão presente nessa etapa, pela compreensão, carinho e apoio incondicional. E claro, pela contribuição com a formatação das tabelas suplementares.

Às amigadas nascidas no laboratório que pacientemente dividiam seus conhecimentos práticos, teóricos e pessoais e por todos os momentos de convívio e companheirismo: Anna Júlia, Franciane, Iara, Yasmin, Fábio Seiti, Luanda Oliveira, Elaine, Raquel, Luana e Kelly Manfrere.

Aos integrantes do grupo de pesquisa LEO Foundation Skin Immunology Research Center e ao Prof. Dr. Niels Ødum, que me receberam tão bem durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de Copenhagen: Martin, Sana, Sara, Veronika, Chella, Daniel, Shayne, Maria, Emil e Mia. Um agradecimento especial a Marina Ramírez Galera e Cheng Chi.

Em especial a Lisa Harth, colega de bancada que acompanhou de perto e participou ativamente do meu projeto. Agradeço pelas tantas discussões científicas, pela companhia e pela amizade.

Aos amigos e *roommates* Gustav, Fiqah, Paula, Greg, Fra, Victor, Emil e Alessio, pela companhia, pelos tantos jantares e claro, carinho. Por terem feito eu me sentir em casa em Copenhagen.

As minhas amigas Nátalli e Anna Claudia pelos ouvidos sempre prontos e abraços sempre abertos.

Ao auxílio dos especialistas Tillmann Pape, Thomas Hartig Braunstein e do Prof. Dr. Klaus Qvortrup do *Core Facility for Integrated Microscopy* (CFIM) da Universidade de Copenhagen, na aquisição das imagens de Cryo-TEM e de microscopia confocal.

Ao Dr. Denis Myashiro e Dra. Jade Cury-Martins pela parceria nos projetos desenvolvidos em conjunto com a Clínica de Linfomas Cutâneos do HCFMUSP.

A todos os integrantes do LIM 56 que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À banca de qualificação Dr. Fábio Seiti, Dra. Raquel Leão e Prof. Dra. Telma Oshiro pelas contribuições e melhorias na tese.

À secretaria do Departamento de Dermatologia HC-FMUSP, Ruth e Marcelo.

À CAPES, FAPESP e CNPQ pelo apoio financeiro.

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddy, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Linfomas cutâneos de células T.....	1
1.2 Contexto imunológico	2
1.3 Barreira cutânea	5
1.4 Nanovesículas	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos específicos	14
3. DELINEAMENTO DO ESTUDO	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Linhagens de linfoma de células T cutâneo (Modelos celulares tumorais utilizados) ..	16
4.2 Cultura de células	16
4.3 Protocolo de Obtenção de sEV a partir de meio de celular condicionado.....	17
4.4 Validação das nanopartículas: Análise de rastreamento de nanopartículas	17
4.5 Validação das nanopartículas: <i>Western blotting</i>	18
4.6 Validação das nanopartículas: criomicroscopia eletrônica de transmissão.....	18
4.7 Análise do conteúdo proteico das nanovesículas	18
4.8 Avaliação da captação e incorporação das nanovesículas por queratinócitos imortalizados	19
4.9 Marcação das nanovesículas para experimentos com fluorescência	19
4.10 Avaliação das sEV marcadas por citometria de fluxo	20
4.11 Análise da captação de sEV por citometria de fluxo e citometria de fluxo multiespectral por imagem.....	21
4.12 Análise da captação de sEV por microscopia confocal de fluorescência.....	21
4.13 Avaliação do efeito funcional de sEV em queratinócitos imortalizados.....	22
4.14 Expressão gênica	22
4.15 Expressão de microRNAs por qPCR em tempo real.....	23
4.16 Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Obtenção e caracterização das nanovesículas extracelulares	24
5.2 Validação das sEV: distribuição média de diâmetro	26
5.3 Validação das sEV: perfil proteico	29

5.4	Validação das sEV: morfologia	30
5.5	Conteúdo protéico das nanovesículas LCCT	32
5.6	Captação e incorporação das nanovesículas por queratinócitos imortalizados	36
5.6.1	Marcação de nanovesículas e verificação por citometria de fluxo	36
5.7	Avaliação da captação das nanovesículas por citometria de fluxo convencional e por citometria de fluxo por imagem.....	39
5.8	Avaliação da incorporação das nanovesículas por microscopia confocal.....	43
5.9	Transferência de RNA vesiculado para queratinócitos imortalizados	48
5.10	Efeito das nanovesículas em células epiteliais	51
6.	DISCUSSÃO.....	67
6.1	Obtenção, estudo do conteúdo proteico e ensaios de captação das sEV-LCCT	67
6.2	Efeito da captação das sEV-LCCT por queratinócitos	71
7.	CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
8.	ANEXOS.....	78
9.	REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES		

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Principais componentes da camada córnea e desmossomos.	6
Figura 2. Esquema de conteúdo básico de nanovesículas.	11
Figura 3. Delineamento do estudo.	15
Figura 4. Remoção do excesso do reagente de marcação por cromatografia de exclusão por tamanho.	20
Figura 5. Linhagens de linfoma T cutâneo em cultura.	24
Figura 6. Protocolo de obtenção de nanovesículas partir de meio condicionado.	25
Figura 7. Caracterização das nove frações obtidas da cromatografia por exclusão de tamanho.	26
Figura 8. Análise da distribuição de tamanho por rastreamento de nanopartículas (NTA).	27
Figura 9. Distribuição média de diâmetro das amostras sEV-Myla 2059 e sEV-Hut78.	28
Figura 10. Quantificação total de partículas por NTA	28
Figura 11. Rendimento proteico dos preparados de sEV.	29
Figura 12. Expressão de marcadores típicos de sEV em lisado proteico	30
Figura 13. Visualização da morfologia das nanovesículas sEV-Myla2059.	30
Figura 14. Visualização da morfologia das nanovesículas sEV-Myla Hut78.	31
Figura 15. As sEV-LCCT contêm 59 entre as 100 proteínas mais frequentemente encontradas em sEV.	32
Figura 16. sEV-Myla 2059 marcadas com CFSE, Anexina-V e CLA.	37
Figura 17. sEV-Myla 2059 marcadas com CFSE e Anexina-V após tratamento à base de diferentes detergentes.	38
Figura 18. Estratégia de análise por citometria de fluxo de imagem (IFC).	40
Figura 19. Estratégia de análise por citometria de fluxo (FACS).	40
Figura 20. Avaliação da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT por citometria de fluxo e citometria de imagem.	41
Figura 21. Resultados ilustrativos da inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas.	42
Figura 22. Inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas.	42
Figura 23. Inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas.	43
Figura 24. Queratinócitos imortalizados captam nanovesículas <i>in vitro</i>	44
Figura 25. Áreas de co-localização de nanovesículas e queratinócitos ampliadas.	45
Figura 26. MFI das imagens obtidas por microscopia confocal.	46
Figura 27. Ilustração da análise de reconstrução tridimensional em queratinócitos tratados com nanovesículas.	47
Figura 28. Nanovesículas incorporadas por queratinócitos imortalizados	48
Figura 29. Captação de RNA vesiculado por queratinócitos é dependente da temperatura.	49

Figura 30. Expressão dos miR-155, miR-21, miR-378 e Let-7a em amostras de sEV-LCCT.....	50
Figura 31. Expressão de miR-155 e miR-21 em células HaCaT tratadas com sEV.	51
Figura 32. Expressão de miR-378 e let-a em células HaCaT tratadas com sEV.	51
Figura 33. Expressão de filagrina e loricrina em células HaCaT tratadas com sEV.....	52
Figura 34. Expressão das citoqueratinas 1, 5, 10 e 19 em células HaCaT tratadas com sEV.....	53
Figura 35. Expressão de componentes dos desmossomos e junções de oclusão em células HaCaT tratadas com sEV.....	54
Figura 36. Expressão de VEGF-A em células HaCaT tratadas com sEV.	55
Figura 37. Correlação negativa entre a expressão dos transcritos FLG e KRT10 e o miR-155 em células HaCaT tratadas com sEV.	56
Figura 38. Correlação negativa entre a expressão dos transcritos KRT10, FLG e DSC3 e o miR-21 em células HaCaT tratadas com sEV.	56
Figura 39. Correlação positiva entre a expressão dos transcritos DSC1, FLG e LOR e o miR-155 em células HaCaT tratadas com sEV.	57
Figura 40. Total de leituras por amostra.	59
Figura 41. Correlação entre as amostras.....	59
Figura 42. Análise de expressão diferencial de células HaCaT tratadas com sEV-Myla2059.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: 59 proteínas expressas nas sEV-LCCT entre as 100 mais frequentemente encontradas em sEV	33
Tabela 2: Integrinas e proteínas relacionadas a adesão celular	33
Tabela 3: Marcadores relacionados a tumorigênese	34
Tabela 4: Marcadores comuns em células T	35
Tabela 5: Citoqueratinas	35
Tabela 6: Marcadores não comuns em sEV	35
Tabela 7: Correlação entre a expressão dos transcritos e dos miRs 155 e 21	57
Tabela 8: Correlação entre a expressão dos transcritos e os miRs 378 e let-7a	58
Tabela 9: 20 DEGs com maior variância após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	60
Tabela 10: 20 DEGs com maior variância após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	61
Tabela 11: DEGs relacionados a adesão celular após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	62
Tabela 12: DEGs relacionados a adesão celular após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	62
Tabela 13: DEGs relacionados a manutenção do envelope cornificado após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	63
Tabela 14: DEGs relacionados a manutenção do envelope cornificado após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	63
Tabela 15: DEGs relacionados com a síntese de metaloproteinases após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	64
Tabela 16: DEGs relacionados com a síntese de metaloproteinases após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	64
Tabela 17: DEGs relacionados com a síntese de galectinas após tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	65
Tabela 18: DEGs relacionados com a síntese de galectinas após tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	65
Tabela 19: DEGs relacionados com o processo de angiogênese após tratamento com as sEV-LCCT por 4 h	65
Tabela 20: DEGs relacionados com o processo de angiogênese após tratamento com as sEV-LCCT por 24 h	66

RESUMO

Torrealba MP. *Efeito de nanovesículas extracelulares derivadas de linhagens tumorais de linfoma T cutâneo em queratinócitos imortalizados* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Os linfomas cutâneos primários de células T (LCCT) são um grupo heterogêneo de linfomas não Hodgkin que se manifestam inicialmente na pele. Micose fungoide (MF) é o LCCT mais prevalente, e a síndrome de Sézary (SS) é uma variante leucêmica agressiva. A forma avançada de LCCT está correlacionada com prurido intenso, sistema imunológico disfuncional e inflamações cutâneas crônicas. De fato, infecções bacterianas são recorrentes e, pacientes em estágio avançado, muitas vezes vão a óbito em decorrência de sepse e não do tumor em si. Comprometimento da barreira cutânea e aumento na expressão de fatores angiogênicos são comuns no LCCT, entretanto, as origens dessas alterações ainda são pouco estudadas. Células tumorais influenciam e modulam o funcionamento de outras células por diferentes vias, uma delas é via secreção de nanovesículas no espaço extracelular (sEV). sEV são estruturas esféricas com bicamada lipídica que transportam em seu interior uma grande diversidade de componentes bioativos como citocinas, quimiocinas, ligantes de receptores de ativação/inibição, diferentes tipos de ácidos nucleicos, enzimas, entre outros. As sEV podem ser captadas e internalizadas por outras células, sendo consideradas mediadores da comunicação intercelular e amplamente estudadas em neoplasias. Entretanto, evidências da contribuição de sEV para a patogênese no LCCT são escassas. Portanto, o estudo teve por objetivo obter e caracterizar o conteúdo proteico de sEV tumorais no LCCT e avaliar o efeito da captação e internalização de sEV-LCCT por queratinócitos imortalizados. sEV derivadas das linhagens tumorais de LCCT, Myla2059 (MF) e Hut78 (SS), foram obtidas de meio condicionado por protocolo baseado em centrifugação diferencial, ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho. Os parâmetros de perfil morfológico, de diâmetro (167nm e 159nm) e de expressão proteica (Hsp-70, CD81 e RAB5), avaliados respectivamente por criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM), análise do rastreamento de partículas (NTA) e western blotting (WB), se mostraram típicos de sEV. Identificamos, por espectrofotometria de massa (MS), 620 proteínas carregadas pelas sEV-LCCT, dentre integrinas e moléculas de adesão celular (CD62L, ALCAM/CD166, ITGB1, TGB2) marcadores relacionados a tumorigênese (CD70, LGALS1, LGALS3BP, KIT e PDGFRB) e marcadores comuns em células T (CD26, CD40LG, IL1R2, IL1RAP e IL27b). Por meio de avaliações por citometria de fluxo e de imagem, observamos que queratinócitos absorvem e captam sEV-LCCT de maneira dependente de temperatura. Após

a confirmação da incorporação de sEV-LCCT para o citosol dos queratinócitos pela análise de *z-stack* por microscopia confocal, o perfil de expressão gênica de queratinócitos tratados com sEV-LCCT foi analisado por sequenciamento de RNA e RT-qPCR. Observamos regulação negativa de moléculas relacionadas a manutenção da barreira cutânea como filagrina, loricrina, involucrina, desmogleínas, desmocollinas e caderinas. Diversos genes relacionados com a formação da camada córnea também foram alterados (STAB1, LCE1E, HRNR e S100A8). A expressão de fatores relacionados ao processo de angiogênese (ESM1, VEGF-A-C-D, PGF) e pruritogênicos (NFG) foi maior após o tratamento com sEV-LCCT. Por fim, dentre os genes diferencialmente expressos com maior regulação positiva, observamos fatores pró-inflamatórios (CSF2, CXCL8, SERPINB2, GRZB, CXCL3 e SPRRs). Assim, concluímos que o tratamento de sEV-LCCT alterou a expressão de transcritos relacionados a via de inflamação, adesão celular e formação do envelope cornificado em queratinócitos imortalizados. Os dados são inéditos e sugerem a contribuição de sEV derivadas de células tumorais no processo de inflamação crônica, angiogênese e comprometimento da barreira cutânea no LCCT.

Descritores: Vesículas extracelulares; Células epidérmicas; Células HaCaT; Micoose fungoide; Síndrome de Sézary; Adesão celular; Inflamação; Indutores da angiogênese.

ABSTRACT

Torrealba MP. *Effect of cutaneous t cell lymphoma tumor derived small extracellular vesicles in immortalized keratinocytes* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Primary cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas that initially manifest in the skin. Mycosis fungoides (MF) is the most prevalent CTCL, and Sézary syndrome (SS) is an aggressive leukemic variant. The advanced form of CTCL is correlated with severe pruritus, a dysfunctional immune system, and chronic skin inflammation. In fact, bacterial infections in immunocompromised patients with advanced-stage CTCL often leads to sepsis and death. Dysfunctional skin barrier and increased expression of angiogenic factors are common in CTCL, however, the origins of these changes are still not completely understood. Tumor cells influence and modulate other cells behavior in different ways, one of which is via the secretion of nanovesicles into the extracellular space (sEV). sEV are spherical structures with a lipid bilayer that carry within them a great diversity of bioactive components such as cytokines, chemokines, ligands of activation/inhibition receptors, different types of nucleic acids, enzymes, among others. sEV can be captured and internalized by other cells, being considered mediators of intercellular communication and widely studied in neoplasms. However, evidence of the contribution of sEV to the pathogenesis of CTCL is scarce. Therefore, the study aimed to obtain and characterize the protein content of tumoral sEV in CTCL and to evaluate the sEV-CTCL uptake and internalization effects by immortalized keratinocytes. sEV derived from the CTCL cell lines, Myla2059 (MF) and Hut78 (SS), were obtained from conditioned medium by a protocol based on differential centrifugation, ultrafiltration and size exclusion chromatography. The morphological profile, diameter (167nm and 159nm) and protein expression markers (Hsp-70, CD81 and RAB5), evaluated respectively by transmission electron cryo-microscopy (Cryo-TEM), particle tracking analysis (NTA) and western blotting (WB), were typical of sEV. We identified by mass spectrophotometry (MS) 620 proteins carried by sEV-CTCL, among integrins and cell adhesion molecules (CD62L, ALCAM/CD166, ITGB1, TGB2) tumorigenesis-related markers (CD70, LGALS1, LGALS3BP, KIT and PDGFRB) and common markers on T cells (CD26, CD40LG, IL1R2, IL1RAP and IL27b). Flow cytometry and imaging flow cytometry confirmed keratinocytes sEV-CTCL absorption in a temperature-dependent manner. The incorporation of sEV-CTCL into the keratinocyte's cytosol was visualized by z-stack analysis with confocal microscopy. Then, the gene expression profile of sEV-CTCL-treated keratinocytes was analyzed by RNA sequencing and RT-

qPCR. We observed downregulation of molecules related to skin barrier maintenance such as filaggrin, loricrin, involucrin, desmogleins, desmocholines and cadherins. Stratum corneum formation related genes expression was also aberrant (STAB1, LCE1E, HRNR and S100A8). The pro-angiogenic factors expression (ESM1, VEGF-A/C/D and PGF) and pruritogens (NFG) was upregulated after sEV-CTCL treatment. In addition, pro-inflammatory factors (CSF2, CXCL8, SERPINB2, GRZB, CXCL3 and SPRRs) were among the upregulated differentially expressed genes. We conclude that sEV-CTCL treatment leads to aberrant expression of genes related to the inflammation pathway, cell adhesion and cornified envelope formation in immortalized keratinocytes. Our study is the first to suggest the contribution of tumor -derived sEV in the chronic inflammation, angiogenesis and impairment of the skin barrier in CTCL.

Descriptors: Extracellular vesicles; Epidermal cells; HaCaT cells; Micosis fungoides; Sezary syndrome; Cell adhesion; Inflammation; Angiogenesis inducing agents.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Linfomas cutâneos de células T

Os linfomas cutâneos primários de células T (LCCT) são um grupo heterogêneo de linfomas não-Hodgkin de origem extranodal que se manifestam primeiramente na pele, sem evidência de acometimento extracutâneo na ocasião do diagnóstico (Dummer et al. 2021).

Até 2005 essas neoplasias não eram reconhecidas como uma entidade própria, mas sim como um acometimento secundário da pele por linfomas nodais. Então, naquele ano, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) e a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (*European Organization for Research and Treatment of Cancer - EORTC*) propuseram uma uniformidade no diagnóstico e classificação dessas neoplasias. Em 2018, o mesmo grupo de trabalho publicou uma nova atualização com as recentes publicações que avaliaram processos diagnósticos e prognósticos para os linfomas cutâneos (Willemze et al. 2019, Willemze et al. 2005).

A incidência de LCCT é de cerca de 10 casos por 100 mil habitantes por ano, e seu diagnóstico se baseia em uma combinação de achados clínicos, patológicos e imunofenotípicos. A presença de uma população monoclonal de linfócitos T nas lesões cutâneas ou no sangue periférico podem colaborar com o diagnóstico em alguns casos (Willemze et al. 2018). As células T transformadas em LCCT são tipicamente células T CD4+ de memória e frequentemente produzem citocinas com perfil Th2 (Stolarenco et al. 2020, Yumeen and Girardi 2020, Dummer et al. 2021).

Dentre os tipos clássicos de LCCT, temos a micose fungoide (MF) e sua variante leucêmica, a síndrome de Sézary (SS). A micose fungoide é o tipo mais comum de LCCT e representa 50% dos linfomas cutâneos existentes. Ela é caracterizada, em sua apresentação cutânea, por manchas eritematosas, placas e/ou tumores, com ou sem envolvimento dos linfonodos e vísceras. É uma doença que tem inicialmente uma apresentação clínica bastante semelhante a outras doenças inflamatórias como psoríase e eczemas crônicos, mas que pode ser progressiva e de curso indolente. Os pacientes com MF apresentam uma sobrevida média em 5 anos de 88%, mas com melhor prognóstico e sobrevida diretamente relacionada ao estadiamento inicial (Willemze et al. 2005, Agar et al. 2010).

A síndrome de Sézary, por sua vez, é uma variante relativamente rara, caracterizada por uma tríade de eritrodermia generalizada, linfadenopatia e número elevado de células de Sézary no sangue (linfócitos grandes com o núcleo de aspecto cerebriforme) (Willemze et al. 2019). SS representa menos de 5% dos LCCT, com curso mais agressivo em comparação à MF. O diagnóstico laboratorial da SS se dá através da contagem absoluta das células de Sézary (>1000 células/mm³) no sangue periférico, juntamente com alterações imunofenotípicas em marcadores de células T maduras: deleção do CD7 numa população CD4 \geq 40% ou deleção do CD26 numa população CD4 \geq 30%, relação dos linfócitos T CD4:CD8 \geq 10 e demonstração de um clone predominante de células T no sangue periférico e em linfonodos ou em biópsias de pele (Willemze et al. 2005). A SS é uma variante dos LCCT que ocorre quase que exclusivamente em adultos, e a sobrevida média em 5 anos é de cerca de 20% (Agar et al. 2010, Willemze et al. 2005). Neste trabalho o termo LCCT restringe-se as formas de LCCT: MF e SS.

1.2 Contexto imunológico

A fisiopatologia da MF e da SS ainda não é totalmente conhecida, sendo que pouco se sabe sobre a origem do comportamento maligno dos clones de linfócitos na MF e na SS.

As células transformadas na MF e na SS exibem um fenótipo de *homing* para a pele, pela expressão de marcadores como antígeno de linfócito cutâneo (CLA) e receptores de quimiocinas CCR4, CCR4.2, CCR3 entre outros, explicando, em parte, a alta afinidade dessas células pela pele (Ferenczi et al. 2002, Campbell et al. 2010). Apesar das semelhanças, e por durante muito tempo acreditar-se que MF e SS fossem estágios diferentes da mesma doença, atualmente sabe-se que são doenças distintas por terem sua origem em células diferentes e apresentarem perfil genético distinto (Campbell et al. 2010, van Doorn et al. 2009).

Os linfócitos T clonais de indivíduos com MF são comumente derivados de linfócitos T de memória residentes (TRM) (CCR4+ CLA+ L-selectina- CCR7-) (Campbell et al. 2010). Os TRM são capazes de responder rapidamente a ativação antígeno dependente, e constituem 80% dos linfócitos T residentes na pele saudável (Clark et al. 2006). Tal perfil vai de encontro ao que é observado na clínica: pacientes com lesões que ficam fixas no mesmo local por muitos anos (Campbell et al. 2010). Em contrapartida, os linfócitos malignos na SS têm origem em linfócitos de memória central (TCM) (CCR4+ L-selectina+ CCR7+), com receptores que lhe atribuem tropismo não só para pele, como para linfonodos, justificando sua clínica mais disseminada e com pior prognóstico (Campbell et al. 2010). Alguns estudos sugerem, ainda, que em uma parcela dos

pacientes com SS, as células malignas são derivadas de células T reguladoras (T reg). Esses clones malignos expressam o fator de transcrição FoxP3 e são capazes de suprimir os linfócitos T convencionais (Heid et al. 2009).

Apesar dessas diferenças na origem dos linfócitos neoplásicos, e da polarização Th2/reguladora relatada, inicialmente, na MF, observa-se que o infiltrado linfocítico é composto por muitas células benignas, poucas malignas e de perfil mais pró-inflamatório e Th1 (com produção de IFN γ e presença de linfócitos TCD8 $^{+}$). Com o avançar da doença, há uma expansão dos linfócitos malignos, e uma polarização Th2, com o aumento de produção de citocinas como IL-10 e IL-4 (Echchakir et al. 2000, Stolarenco et al. 2020, Hsi et al. 2015).

Os linfócitos T CD4 $^{+}$ malignos de pacientes com MF/SS ao serem estimulados com fitohemaglutinina (PHA) produzem grandes quantidades de IL-4 (Vowels et al. 1992). Além disso, essas citocinas, de perfil Th2, como IL-4 e IL-5, são frequentemente identificadas em lesões de pele de pacientes em estágios iniciais de MF, mas não na pele saudável ou na pele de indivíduos saudáveis (Vowels et al. 1994). De forma bastante semelhante, já foi observado o aumento de expressão de RNAm de IL-10, outra citocina de caráter regulador/supressor, conforme houve um aumento no infiltrado maligno nas lesões de pacientes com MF, indicando que o aumento da expressão desta citocina esteja associada a um pior prognóstico tumoral (Asadullah et al. 1996).

Além da atividade das células neoplásicas, o microambiente também colabora com a patogênese da doença e o processo inflamatório gerado pelas células neoplásicas. Biópsias da pele de pacientes com MF revelam que infiltrado de linfócitos é um achado comum (>75%). Eosinófilos e linfócitos B são raros, enquanto células CD68 $^{+}$ e CD1a $^{+}$ (marcadores típicos de macrófagos) estão presentes na grande maioria dos casos estudados (Iliadis et al. 2016, Schlapbach et al. 2010). Corrobora com esses achados a expressão aumentada de RNAm de citocinas e quimiocinas relacionadas a macrófagos em biópsias de pacientes com MF quando comparadas com as de indivíduos saudáveis (Wu et al. 2014). Sugaya et al correlacionaram a maior expressão do receptor CD163, característico de perfil M2, tanto na pele como em sua forma solúvel no soro, com a progressão da doença em pacientes com LCCT (Sugaya et al. 2012). Estudos recentes também encontraram uma maior expressão do receptor CD206 $^{+}$, também característico de perfil M2, mais expresso em biópsias de pele de pacientes MF nos estágios mais avançados da doença (Furudate et al. 2016). Macrófagos do tipo M2 são mais tolerogênicos, produzem IL-10 e constantemente são relacionados à progressão tumoral em diversos tipos de neoplasias (Najafi et al. 2019).

Além de uma maior presença de macrófagos do tipo M2, observa-se nos pacientes com a forma avançada de LCCT, uma maior expressão de receptores clássicos de DCs como, CD11c, CD207, CD208, CD204 e CD303 nas lesões em relação a pele não lesionada dos pacientes com MF, indicando não só um infiltrado de linfócitos e macrófagos, como de DCs nas lesões destes pacientes (Schlapbach et al. 2010). Através de reações de imunofluorescência, pesquisadores observaram uma maior expressão do marcador CD209/DC-SIGN, característico de célula dendrítica imatura, colocalizados com células T reguladoras. Em contrapartida, células dendríticas CD208+, definidas como maduras, foram raramente encontradas nesses agrupamentos com células T, indicando que as DCs imaturas possam estar colaborando com os processos de escape tumoral e supressão de resposta contra as células neoplásicas (Schlapbach et al. 2010). Outro trabalho evidenciou que as DCs associadas ao tumor expressam PD-L1, inibem a proliferação de células T citotóxicas específicas ao tumor e promovem a indução de células T reguladoras *in vitro* (Wilcox et al. 2009).

Já é bem estabelecido que a ativação constante de STAT3 é essencial na patogênese dos LCCT, por colaborar com a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas (Sommer et al. 2004, Nielsen et al. 1999, Bromberg et al. 1999). Recentemente, em 2016, Willerslev-Olsen e colaboradores demonstraram o papel da SEA (enterotoxina A de *Staphylococcus*) produzida pelos *S. aureus* da pele, aumentando a ativação de STAT3 e a expressão de IL-17 (citocina pró-inflamatória associada a inflamação da pele, desregulação imune e progressão da doença) apenas em células neoplásicas, mesmo quando cultivadas com linfócitos T CD4+ não transformados. Tal achado indica o papel importante que o *S. aureus* da pele, e suas toxinas como a SEA, tem na ativação e sobrevivência dos linfócitos neoplásicos (Willerslev-Olsen et al. 2016).

Além de todo esse infiltrado imune nas lesões dos pacientes portadores das LCCT, os queratinócitos, responsáveis por formar a barreira protetora da pele, também medeiam respostas imunológicas cutâneas ao produzirem citocinas que interagem com células imunes na pele (Nickoloff and Griffiths 1990). Além de citocinas, os queratinócitos produzem diversas outras moléculas, que causam o prurido característico no LCCT.

O perfil mais tolerogênico e Th2 gerado pelas células neoplásicas e pelo microambiente tumoral, associado a uma diminuição da diversidade de linfócitos T saudáveis (em decorrência da expansão dos neoplásicos), gera uma imunossupressão nos indivíduos com LCCT que pode favorecer, entre outras coisas, o aparecimento de novas neoplasias. Associado a isso, a produção de componentes pruritogênicos pelos queratinócitos e outros fatores que auxiliam na quebra da

barreira cutânea, favorecem não só processos infecciosos, como uma maior ativação de STAT3 pela SEA, e conseqüentemente a maior sobrevivência dos linfócitos neoplásicos. Essa maior susceptibilidade associada à imunossupressão pode, em muitos casos, se tornar fatal (Yumeen and Girardi 2020).

1.3 Barreira cutânea

A pele humana representa o maior órgão humano de cerca de 2 m² em um indivíduo adulto. É um órgão indispensável à vida, e sua função mais importante é fornecer uma barreira eficaz entre os ambientes interno e externo do organismo (Eyerich et al. 2018). Ela é composta pela epiderme, camada mais superficial, e pela derme, camada intermediária que confere a resistência mecânica (Jiao et al. 2022). A epiderme é responsável por evitar a perda de água, proteção contra agressões externas (químicas, luzes ultravioletas, alérgenos) ou de infecções microbianas além da promoção de resposta regenerativa (Eyerich et al. 2018). As principais estruturas descritas nesse capítulo estão ilustradas na Figura 1.

Em situações patológicas como na dermatite atópica, danos à barreira cutânea diminuem o grau de hidratação da epiderme e colaboram com perda de água transepidermica (do inglês, *transepidermal water loss* - TEWL) (Sant'Anna Addor and Aoki 2010). Pacientes com LCCT apresentam as mesmas características: menor grau de hidratação na pele e maior TEWL nas regiões de lesão quando comparadas com a pele não lesionada ou a pele de indivíduos sem doença (Suga et al. 2014). Como consequência da pele seca pode haver complicações como desconforto e coceira, desenvolvimento de dermatites além de infecções bacterianas e virais.

A epiderme é composta por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação, dispostos em uma arquitetura de multicamadas altamente coesas. Essas camadas da epiderme são: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. Para a barreira cutânea ser totalmente funcional, os queratinócitos precisam passar pelo processo de diferenciação dérmica (queratinização) que é coordenado por diversos fatores entre citocinas, neuropeptídeos e fatores de crescimento (EGF, do inglês *epidermal growth factor*; TGF- α , do inglês *transforming growth factor α* ; KGF, do inglês *keratinocyte growth factor*, TGF- β , do inglês *transforming growth factor β*), e devem ser conectados uns aos outros por junções intercelulares (Moltrasio, Romagnuolo and Marzano 2022). A proliferação de queratinócitos é restrita a camada de células basais, a camada mais profunda. Após a mitose, os queratinócitos diferenciam-se progressivamente e

migram através da epiderme em direção à superfície da pele, para finalmente perder seus núcleos e outras organelas, cornificar e achatar, formando assim a camada córnea (Jiao et al. 2022).

As junções intercelulares promovem uma coesão mecânica não somente entre os queratinócitos, mas também destes com a lâmina basal. Tais junções podem ser: hemidesmossomos, desmossomos, junções aderentes (do inglês *adherent junctions*, AJ) e junções de oclusão (do inglês *tight junctions* – TJ) dispersos de maneira específica entre as diferentes camadas epiteliais (Jiao et al. 2022).

Os hemidesmossomos são responsáveis pela adesão das células basais à lâmina basal. São uma placa de aderência única, composta pelos filamentos de ancoragem de lamininina 5, integrinas e plectina. Os desmossomos mantêm uma célula unida à outra, e apresentam porções extra e intracelulares. A porção intracelular é composta por diversas proteínas associadas entre si enquanto a porção extracelular é composta por desmogleínas (DSG1-4) e desmocolininas (DSC1-3), que fazem as pontes entre as células justapostas. Junções aderentes são as estruturas intercelulares de ancoragem que acoplam a membrana celular ao citoesqueleto de actina por meio de caderinas. E, por sua vez, as junções de oclusão são compostas principalmente por claudinas e ocludinas, e fecham os espaços entre as células epiteliais (Jiao et al. 2022).

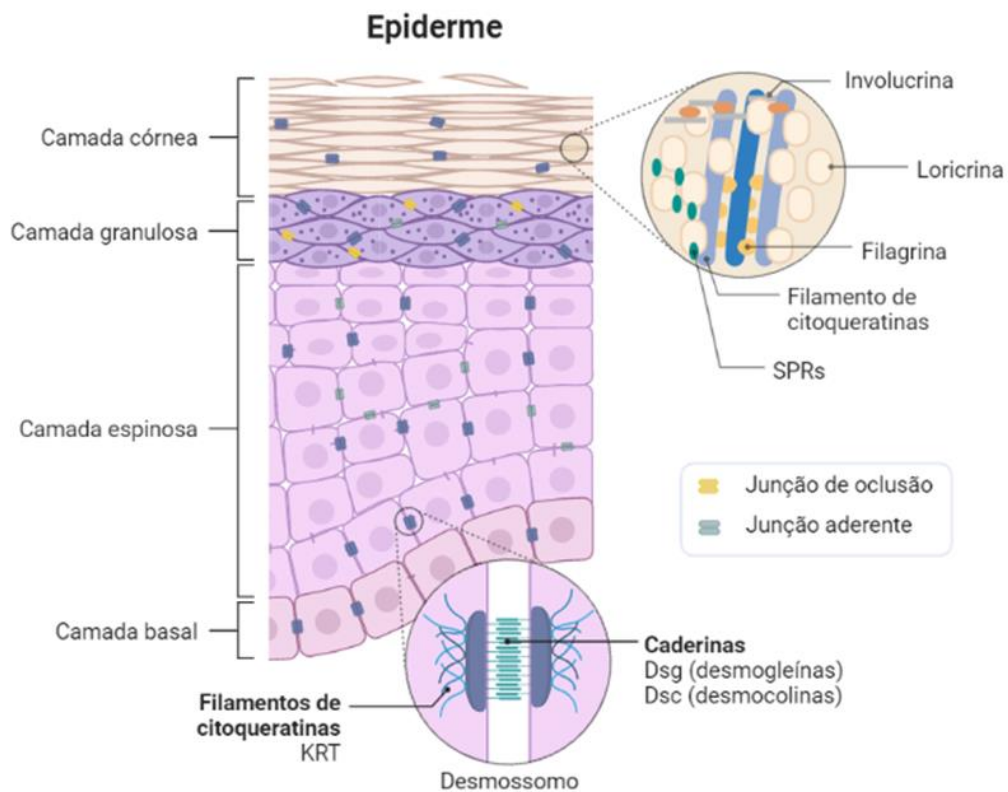


Figura 1. Principais componentes da camada córnea e desmossomos. SPRs = pequenas proteínas ricas em prolina. Criado na plataforma de ilustração Biorender.com.

No contexto dos LCCT, o sobrenadante da cultura de linhagens de LCCT provoca, *in vitro*, maior espaçamento dos desmossomos e redução na expressão de desmogleínas e integrinas relacionadas a adesão celular em cultura de queratinócitos (Thode et al. 2015). Tais modificações *in vivo* podem acarretar numa perda da integridade da barreira cutânea, tornando o indivíduo mais susceptível a lesões cutâneas e infecções. Além disso, os dados clínicos sugerem fortemente que defeitos na barreira cutânea têm um papel fundamental na suscetibilidade a infecções de pele em pacientes com LCCT (Stolarenco et al. 2020).

A alta incidência de infecções é uma característica comum nos pacientes com LCCT (Bonin et al. 2010, Axelrod, Lorber and Vonderheid 1992, Mirvish, Pomerantz and Geskin 2011). Axelrod et al. avaliaram diferentes tipos de infecção em pacientes com LCCT. De acordo com o estudo, o tipo de infecção mais prevalente é infecção cutânea bacteriana, sendo *Staphylococcus aureus* (SA) a infecção mais comum no LCCT (Axelrod et al. 1992). A infecção por SA também é a maior causa de morbidade e mortalidade nos LCCT (Mirvish et al. 2011). Além da abundância de bactéria ser um problema por si, SA é conhecido por sua capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas (ES). Chamados de superantígenos, são conhecidos por sua capacidade de ativar grandes porções de linfócitos T por reação cruzada de moléculas de MHC-II e receptores de células T (independentemente de especificidade do antígeno do TCR e da área de ligação antígeno-peptídeo no MHC) burlando as etapas de processamento e a apresentação de antígenos. Assim, SA pode gerar um meio pró-oncogênico na pele lesionada do paciente. De fato, células malignas (Tokura et al. 1992), e não malignas (Woetmann et al. 2007), de pacientes com LCCT respondem com intensa proliferação à toxina ES. Esse tipo de infecção está intimamente associado ao estágio da doença (Axelrod et al. 1992). Pacientes em estágio avançado de LCCT, em sua maioria imunocomprometidos, muitas vezes vão a óbito em decorrência da sepse e não do tumor em si (Allen et al. 2020, Posner et al. 1981).

Além dessa maior susceptibilidade da barreira cutânea, os queratinócitos produzem uma série de moléculas de efeito pruritogênico que podem levar a lesões na pele e consequentemente, facilitar a entrada de bactérias e vírus. O fator de crescimento de nervo (NGF) é um deles. Ele estimula o alongamento de fibras nervosas na derme e está altamente expresso na epiderme e em maiores concentrações no soro de pacientes com SS (Suga et al. 2013). As concentrações de NGF, juntamente com as de CCL1, CCL17, CCL26, CCL27, LDH e IgE se correlacionam positivamente com o escore de prurido nos pacientes com SS (Suga et al. 2013).

No soro, as maiores concentrações de NGF se correlacionam também com maiores concentrações do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) (Sakamoto et al. 2018), fator solúvel com papel central na angiogênese da pele (tanto em processos fisiológicos, como patogênicos). Pacientes eritrodérmicos com LCCT possuem valores séricos de VEGF-A elevados, e esse fator de crescimento, *in vitro*, induz em linhagens de queratinócitos, o aumento da expressão de outra molécula pruritogênica, o transcrito de linfopietina estromal tímica (TSLP) (Sakamoto et al. 2018), evidenciando a relação das duas moléculas pruritogênicas.

A TSLP promove, *in vitro*, a proliferação de linhagens tumorais derivadas de pacientes com LCCT via fosforilação de STAT5 (Takahashi et al. 2016). Além disso, o TSLP é encontrado em altos níveis no plasma de pacientes em estágios iniciais de LCCT (Tuzova et al. 2015), o que sugere sua participação na patogênese da doença.

Outro indutor da proteína TSLP, a periostina, também está altamente expressa em lesões de pacientes com LCCT quando comparado com peles não lesionadas (Takahashi et al. 2016). Fibroblastos são grandes produtores de periostina, e, *in vitro*, fibroblastos isolados de lesões de pacientes respondem a citocinas Th2, secretando maiores quantidades de periostina quando comparados com fibroblastos de pele não lesionada (Takahashi et al. 2016).

Assim, forma-se uma alça de *feedback* positivo onde o ambiente tumoral Th2, promove a secreção de periostina pelos fibroblastos, que por sua vez induzirá a proteína TSLP, que colaborará com a proliferação de células tumorais, e uma maior polarização Th2. A secreção dessas moléculas pruritogênicas por sua vez, podem aumentar o prurido, e a lesões na barreira cutânea, favorecendo infecções.

As galectinas são outra família de proteínas envolvidas na homeostase da barreira epitelial e na progressão tumoral. Elas estão envolvidas em diversos processos como os de adesão celular, e de proliferação, morte e migração celular em resposta a lesões (Viguier et al. 2014). No LCCT, há relatos da produção de galectina-9 por células neoplásicas diminuindo o infiltrado de linfócitos T CD8+ nas lesões, e uma correlação positiva entre seu aumento sérico e marcadores de pior prognóstico (Nakajima et al. 2019). Thode e colaboradores atribuíram as galectinas secretadas por células tumorais LCCT uma série de alterações observadas em modelo *in vitro* de pele, como proliferação exacerbada de queratinócitos e perda da estrutura organizada das camadas epiteliais (Thode et al. 2015).

Citoqueratinas (KRT) são proteínas estruturais que formam filamentos intermediários no epitélio, representando de 30 a 80% do total de proteínas presentes no epitélio (Wang, Zieman and Coulombe). Os queratinócitos que proliferam da camada basal expressam o par de citoqueratinas KRT5 e KRT14, que durante a diferenciação é substituído pelo par KRT1 e KRT10. Durante a regeneração de tecidos após lesão, os queratinócitos expressam transitoriamente o par KRT6 e KRT16 e com redução na expressão de KRT1 e KRT 10 (Fuchs and Green 1980). Entretanto, semelhante ao perfil de queratinócitos após lesão, queratinócitos em lesões de pele psoriática também expressam altos níveis de KRT6, 16 e 17 (Zhang, Yin and Zhang 2019). As KRT6, 16 e 17 em particular são consideradas alarminas já que a expressão aumentada dessas moléculas contribui para ativação de processo inflamatório em queratinócitos e em células T na epiderme (Zhang et al. 2019).

A super expressão de KRT6 e KRT16 em modelo experimental e *in vitro* provoca prejuízo no processo de cicatrização de lesões, com desorganização na estrutura dos filamentos de citoqueratinas (Zhang et al. 2019). Estudos recentes mostraram que KRT17, mas não KRT6 ou KRT16, induz hiperproliferação de queratinócitos através da ativação via STAT3 (Yang et al. 2018). Além disso, KRT17 parece atuar como fator de transcrição de citocinas inflamatórias (CXCL5/10/11; CCL2/19; IFN- γ) (Zhang et al. 2019). Assim, as KRT6, KRT16 e KRT17 são consideradas marcadores de hiperproliferação na psoríase, e em amostras tumorais.

Além de fornecer esse suporte estrutural às células epiteliais, as citoqueratinas também regulam a proliferação celular, migração, adesão e processos inflamatórios (Fuchs and Cleveland 1998). Estes estudos apontam a relevância da expressão das KRT em doenças de pele inflamatórias, embora até o momento não haja descrição da expressão dessas proteínas em pacientes com LCCT.

Outras moléculas tem participação central na integridade da barreira. A filagrina é produzida na forma de pró-filagrina pelas células da camada granulosa. Após clivagem, os monômeros de filagrina se associam aos filamentos de queratina, formados pelas proteínas KRT, e constituem as porções inferiores da camada córnea (Moosbrugger-Martinz et al. 2022). A loicrina representa 70% da massa proteica total encontrada na camada córnea, e, como a filagrina é produzida na camada granulosa (Candi, Schmidt and Melino 2005). Ambas, loicrina e filagrina, têm sido extensamente estudadas em doenças inflamatórias na pele por envolvimento com a manutenção da barreira cutânea. A expressão dos dois transcritos é reduzida na pele lesionada de pacientes LCCT (Suga et al. 2014). Além disso, os níveis de expressão destes transcritos se correlacionam

negativamente com marcadores de mal prognóstico da doença o que sugere envolvimento na progressão da doença.

Dada a ativação desregulada da sinalização associada ao tumor e a produção de citocinas, moléculas pruritogênicas, galectinas e fatores inflamatórios e angiogênicos por células T malignas, é concebível que as células T malignas sejam fatores-chave na remodelação da pele.

Células tumorais tem a capacidade de modificar em benefício próprio a matriz extracelular ou o fenótipo de células teciduais próximas como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e outros tipos celulares imunológicos ou não (Hyenne, Lefebvre and Goetz 2017). Além da interação celular direta ou a ação de fatores solúveis, a comunicação entre célula tumoral e o microambiente também pode ser mediada por outros componentes imunomoduladores como pequenas vesículas extracelulares, conhecidas antigamente como exossomas. Neste trabalho, nos referiremos a estas vesículas como nanovesículas (sEV).

1.4 Nanovesículas

Diversas células do organismo são capazes de liberar vesículas para o espaço extracelulares, que podem ser classificadas de acordo com os diferentes tamanhos e origens. Nanovesículas são as vesículas menores, que possuem entre 40 a 150nm de diâmetro (Colombo et al. 2013). O ponto em comum entre todas as microvesículas é a estrutura de sua membrana: uma bicamada lipídica, com a mesma orientação topológica da membrana plasmática (Trajkovic et al. 2008).

É possível isolar sEV de quase todo fluido corporal humano: plasma, soro, leite materno, sêmen, saliva e urina (Eriksen et al. 2001). São produzidas e secretadas de maneira constitutiva e por serem fontes de antígenos virais e produtos celulares, e em muitos casos refletirem o que está acontecendo no microambiente, são muito úteis como biomarcadores e/ou alvos terapêuticos (Samimi et al. 2010).

Essas vesículas transportam compostos biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, receptores de membranas entre outros, que podem ser captados e internalizados por outra célula próxima ou, em tecidos distantes. O conteúdo transportado pode desencadear uma cascata de eventos na célula receptora, e dessa forma desempenhar uma importante função

biológica na comunicação entre as células (Culley 2009). Componentes comumente encontrados em sEV estão ilustrados na Figura 2.

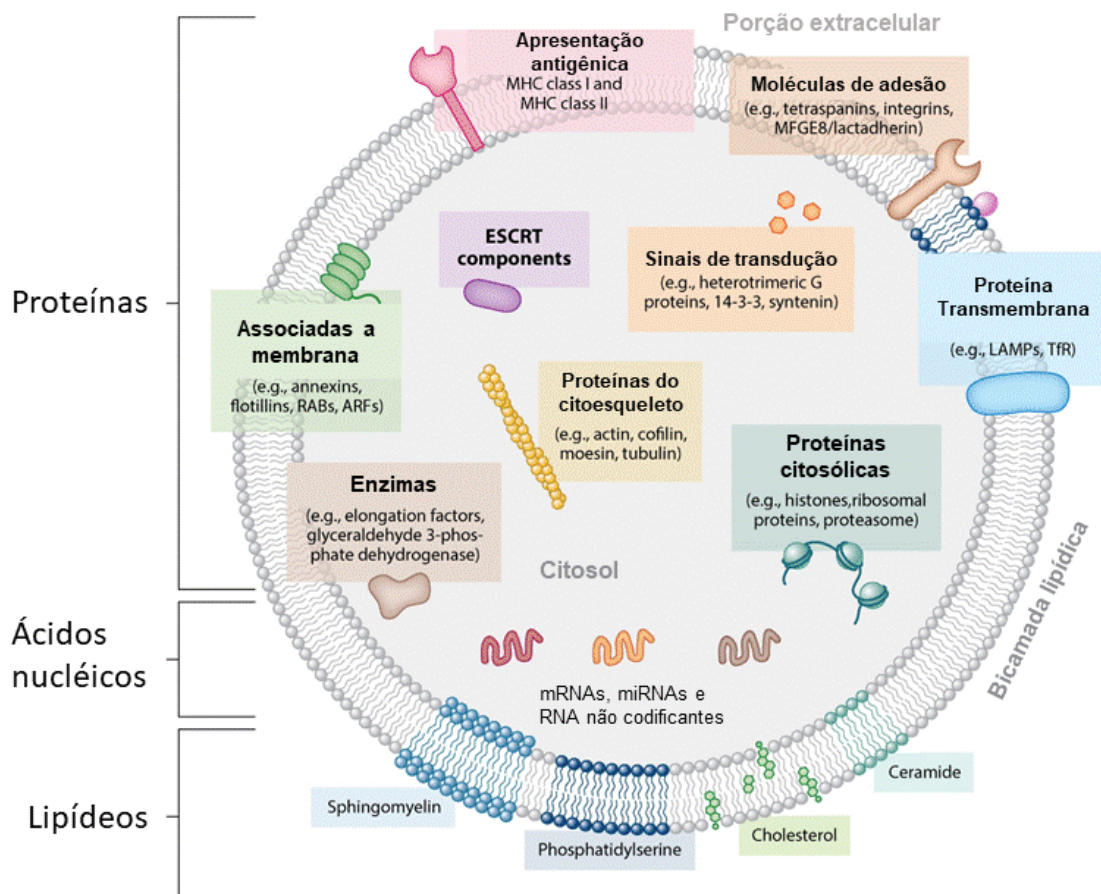


Figura 2. Esquema de conteúdo básico de nanovesículas. Adaptado de Colombo (Colombo, Raposo and Théry 2014).

As sEV podem ser secretados por células imunes ou não imunes e afetam tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, incluindo apresentação de antígeno, diferenciação e ativação celular, regulação e supressão imune, entre outros. Em geral, os marcadores de superfície e conteúdo das sEV, bem como as funções dessas sEV, estão intimamente relacionados às propriedades pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias das células secretoras (Colombo et al. 2014).

A comunicação intercelular por sEV está implicada em processos fisiológicos e patológicos, especialmente em neoplasias (Perez-Villar et al. 1996). São um modo de comunicação intercelular no câncer que pode mediar a transferência de oncogenes e proteínas entre diferentes tipos celulares (Théry, Ostrowski and Segura 2009). Embora diversos tipos celulares secretem sEV de maneira fisiológica, a produção por células tumorais é, ao menos, 10

vezes maior do que células saudáveis (Shao et al. 2016). Existem diversos relatos sobre o potencial modulador de sEV derivadas de células tumorais (Li et al. 2022).

No tumor, as sEV podem atuar como moléculas imunomoduladoras promovendo um balanço favorável para o crescimento/proliferação das células tumorais de diversas formas (Liu, Gu and Cao 2015). Lyden e colaboradores mostraram em estudo publicado em 2015 que nanovesículas derivadas de diferentes células tumorais tem participação central na formação de nichos pré-metastáticos em modelo animal (Hoshino et al. 2015).

Estudos indicam que sEV também tem participação na patogênese de doenças inflamatórias na pele (Shao et al. 2020). Estudo recente sugere que sEV são mediadores essenciais na patogênese da psoríase ao constatar que sEV derivadas de mastócitos são capazes de induzir a geração de células T auto-reativas após transferência de fosfolipase A2 (Cheung et al. 2016). Outro estudo recente demonstrou que queratinócitos estimulados por citocinas características de lesão psoriática secretam sEVs que podem ser captados por neutrófilos. Os neutrófilos por sua vez produzem maior quantidade de NETs (do inglês *Neutrophil extracellular traps*) e citocinas pró-inflamatórias, o que exacerbaria a inflamação local (Jiang et al. 2019).

A dermatite atópica (DA) é outra doença inflamatória comum, caracterizada por inflamação e comprometimento da barreira cutânea (Roediger and Schlapbach 2022). Assim como no LCCT, os pacientes com DA são suscetíveis à infecção por *S. aureus*, que por sua vez agrava a inflamação associada à DA. Estudos apontam que sEV derivados de *S. aureus* podem exacerbar a inflamação da DA ao transportar moléculas efetoras bacterianas às células hospedeiras, agravando assim as respostas inflamatórias. sEV de *S. aureus* induzem maior produção dos mediadores pró-inflamatórios IL-6 e TSLP em fibroblastos (Hong et al. 2011), estimulam queratinócitos a produção exacerbada das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-18, IL-6 e MIP-1 α (Jun et al. 2017) e induzem ativação de células endoteliais e recrutamento de monócitos (Kim et al. 2019). Além disso, foi demonstrado que a α -hemolisina transportada em *S. aureus*-EVs induziu morte celular de queratinócitos, exacerbando tanto a ruptura da barreira cutânea quanto a inflamação da pele (Hong et al. 2014).

Recentemente, dois estudos investigaram sEV no LCCT. Moyal e colaboradores, relatam que sEV derivados das células tumorais expressam o microRNA-155 e facilitam a motilidade de células tumorais (Moyal et al. 2021). Kirsi Laukkanen e colaboradores, evidenciam a presença de HERV-W e seus receptores em sEV derivadas de linhagens tumorais LCCT e sugerem que essas

moléculas podem mediar a captação das sEV em células receptoras (Laukkanen et al. 2020). Ainda não há relatos da relação de sEV e o comprometimento da barreira cutânea no LCCT.

Assim, é possível perceber o quanto as nanovesículas impactam em vários cenários, ora atuando na comunicação celular e modulando a resposta imune, e colaborando com a patogênese tumoral, ou ainda, sendo exploradas como biomarcadores de resposta terapêutica, ou progressão de doença. Sabe-se que pacientes com LCCT apresentam uma inflamação crônica da pele e uma disfunção da barreira cutânea. Entretanto, as causas das alterações morfológicas e das características histopatológicas da doença na pele são desconhecidas.

Assim, através de modelos tumorais imortalizados, este trabalho visa auxiliar na compreensão da patogênese dos LCCT e verificar a contribuição das nanovesículas para a disfunção de barreira e o processo inflamatório observado na pele dos pacientes.

2. OBJETIVOS

Obter e caracterizar nanovesículas extracelulares derivadas de linhagens tumorais de Linfoma T cutâneo. Avaliar o efeito das nanovesículas extracelulares em queratinócitos imortalizados pelo perfil transcricional.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de protocolo para obtenção de nanovesículas derivadas de meio de cultura condicionado de linhagens LCCT;
- Validação do protocolo de obtenção nanovesículas-LCCT pela presença de marcadores proteicos, tamanho e morfologia compatíveis;
- Análise do conteúdo proteico das nanovesículas-LCCT;
- Avaliação da captação e internalização das nanovesículas-LCCT por queratinócitos imortalizados;
- Estudo do efeito no perfil transcricional em queratinócitos imortalizados tratados com nanovesículas-LCCT;

3. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O projeto foi estruturado em três etapas: (I) obtenção e validação das nanovesículas (sEV), (II) caracterização das sEV quanto ao conteúdo proteico e (III) avaliação do efeito das sEV em queratinócitos imortalizados. O esquema descrito na Figura 3, adaptada de López-Pacheco (López-Pacheco et al. 2021).

Os experimentos foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Anders Woetmann, no laboratório LEO Foundation Skin Immunology Research Center, na Universidade de Copenhaga, Dinamarca, durante doutorado sanduíche com apoio financeiro Capes-Print.

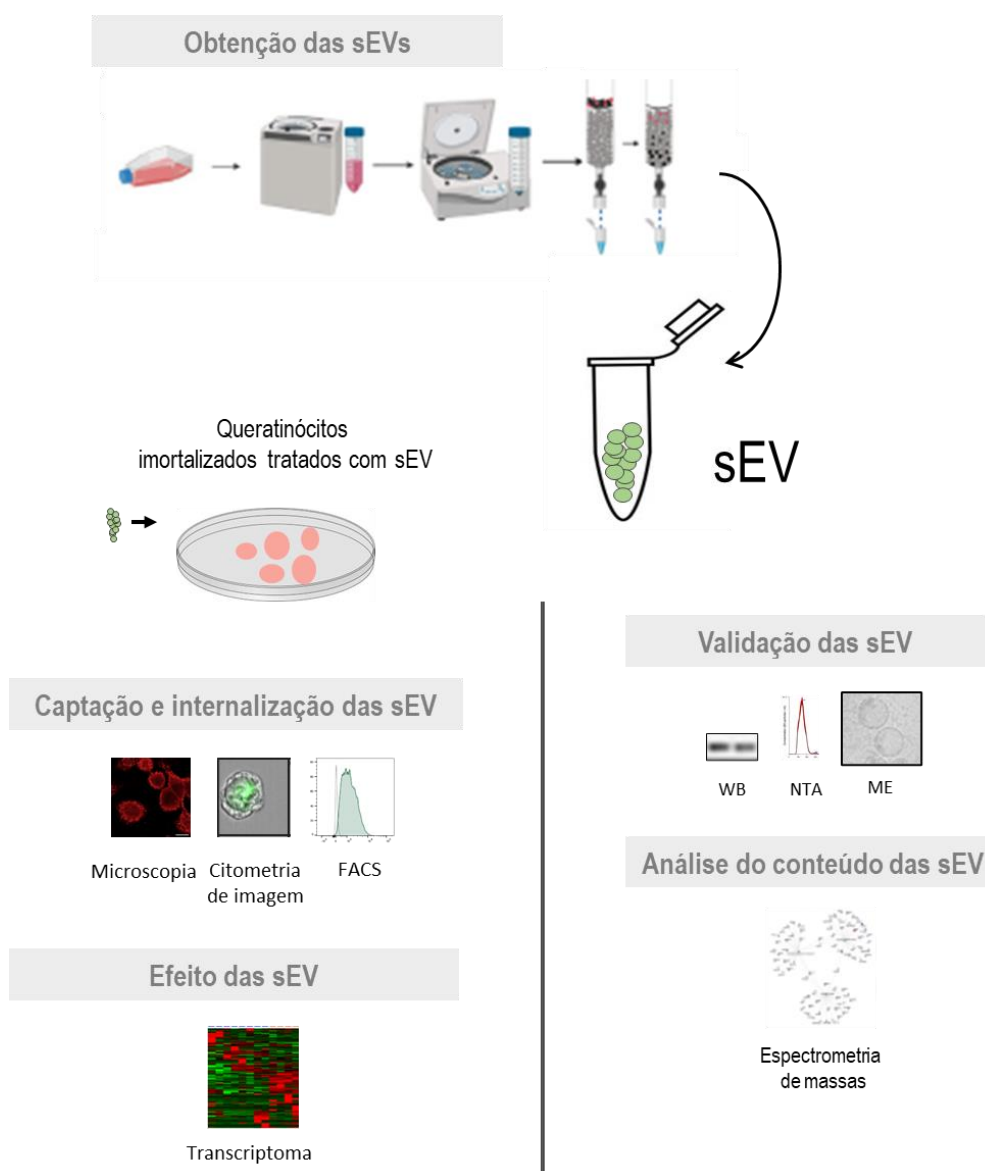


Figura 3. Delineamento do estudo. Nanovesículas (sEV) foram obtidas de meio condicionado de linhagens de LCCT por protocolo derivado de diferentes técnicas e, validadas quanto ao tamanho, morfologia e marcadores proteicos específicos. O conteúdo proteico foi avaliado por espectrometria de massa. Na etapa final, a captação, internalização e efeito das sEV, foi analisado em queratinócitos imortalizados por microscopia confocal, citometria de imagem, citometria convencional e análise do transcriptoma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens de linfoma de células T cutâneo (Modelos celulares tumorais utilizados)

Linhagens celulares derivadas de pacientes com tumores são indispensáveis e amplamente utilizadas na pesquisa como modelos robustos e reprodutíveis no estudo de tumores. De onze linhagens derivadas de pacientes LCCT disponíveis atualmente (Gill et al. 2022), duas linhagens foram selecionadas para a investigação: Myla 2059 e Hut78. As duas linhagens foram gentilmente concedidas pelo Prof. Dr. Niels Odum, da LEO Foundation Skin Immunology Research Center, na Universidade de Copenhague, Dinamarca.

A linhagem linfocítica Myla 2059 é modelo *in vitro* de MF avançada, desenvolvida em 1992 a partir de biópsia de pele de indivíduo de 82 anos do sexo masculino, caucasiano e diagnosticado com micose fungoide estágio IIA (Kaltoft et al. 1992). No período da biópsia o paciente encontrava-se com extensa área corporal lesionada (comprometimento de aprox. 80%) e extensa linfadenopatia. Infelizmente, o paciente foi a óbito após a progressão da doença. Durante a autópsia não foi encontrado comprometimento de órgãos internos (Kaltoft et al. 1992). Como modelo representativo *in vitro* da variante leucêmica de LCCT síndrome de Sézary, a linhagem celular de escolha foi Hut78, obtida em 1990 a partir do sangue periférico de indivíduo de 53 anos do sexo masculino, também caucasiano, diagnosticado com síndrome de Sézary com estadiamento IVA, com acometimento na pele, sangue, linfonodos e fígado (Gazdar et al. 1980).

Além de excelentes modelos *in vitro* para investigação de tumores, a utilização de linhagens celulares traz vantagem especial em estudos com vesículas extracelulares: é possível ampliar a produção de vesículas ao trabalhar com volumes maiores de cultivo celular, o que definitivamente seria um obstáculo com células primárias que apresentam expansão e viabilidade em cultivo celular por tempo limitado.

4.2 Cultura de células

As linhagens celulares de LCCT, Myla 2059 e Hut78, foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Biological Industries, Cromwell, CT, EUA) com 1% de penicilina /Estreptomicina (Sigma) a 37°C com 5% de CO₂ em frascos de 175cm² (ThermoFisher). Para os experimentos de obtenção de vesículas extracelulares (sEV) as linhagens de células foram cultivadas em meio AIM-V (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) sem suplementação de soro. A linhagem celular de queratinócitos

imortalizados HaCaT foi cultivada no meio DMEM, high glucose, GlutaMAX™ (ThermoFisher, # 10566016) suplementado com 10% de FBS com 1% de penicilina /Estreptomicina em frascos de 175cm² a 37°C com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada com o corante trypan blue (Bio-rad, Hercules, California, EUA) a cada 72h e as linhagens foram testadas regularmente para contaminação por mycoplasma com o kit MycoAlert PLUS (Lonza, Gampel, Gampel-Bratsch, Suíça).

4.3 Protocolo de Obtenção de sEV a partir de meio de celular condicionado

O meio condicionado (CM) de linhagens LCCT mantidas na concentração celular 1x10⁶/mL foi coletado a cada 48 h e mantido a 4°C para posterior purificação de sEV. As sEV a partir de CM de 48 h, foram obtidas por protocolo baseado em centrifugação diferencial, ultrafiltração e cromatografia de exclusão por tamanho. Durante a etapa inicial de centrifugações (500g por 5', 2000g por 30' e 10.000g por 30') a 4°C, as células mortas, o *debris* celular e vesículas maiores foram descartados. Em seguida, o CM foi filtrado a vácuo em membrana PES de 0,45 µm (ThermoFisher) e armazenado em 4°C.

Após 18 horas, o CM foi concentrado em até 200x com auxílio de filtros para centrifuga Amicon de 100 kDa (Millipore Sigma, MA, EUA). Por fim, as sEV foram isoladas por cromatografia de exclusão por tamanho em colunas (IZON, Medford, MA, USA), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, o concentrado de 0.5 mL de CM foi inserido no topo das colunas previamente lavadas e com o pH estabilizado. Os primeiros 3 ml (*void*) foram descartados e 9 frações de 0,5 ml seguintes foram coletadas. As frações 2, 3 e 4, que contém as vesículas extracelulares, foram homogeneizadas e concentradas com filtros para centrifuga.

4.4 Validação das nanopartículas: Análise de rastreamento de nanopartículas

Para determinar a concentração e o tamanho das partículas, as amostras de sEV foram diluídas em PBS e analisadas por um Nanosight LM10 (Malvern Panalytical, Reino Unido) munido de laser de 405 nm. As diluições foram determinadas de acordo com a variação recomendada do aparelho de 1x10⁸ a 1x10⁹ com o limite mínimo de 50 partículas por *frame*. Cinco vídeos de 30 s de cada amostra foram capturados e processados usando o software NTA versão 3.2 (Malvern Panalytical). A temperatura foi monitorada durante as leituras e o nível de câmera para a aquisição foi 12.

4.5 Validação das nanopartículas: *Western blotting*

As amostras de sEV foram incubadas com a solução de lise RIPA (Thermo Scientific, #89900) suplementado com coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Thermo Scientific, #78443) no gelo por 60 minutos e centrifugados a 12000 rpm por 10 min a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante com as proteínas sEV foi transferido para um tubo e armazenado a -80°C. A concentração de proteína foi determinada pelo Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23235).

Os seguintes anticorpos primários foram usados para análises proteicas: anti-RAB5 (1:100, ThermoFisher, #PA5-29022), anti-HSP70 (1:500, Cell Signaling, Danvers, MA, # 4876S), anti-CD81 (1:500, Cell Signaling, Danvers, #56039) e controles negativos de EV, anti-GM130 (1:500, Cell Signaling, #12480T) e anti-calnexina (1:500, Abcam, Cambridge, UK, #ab22595). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-camundongo (1:2000, #P0260) e anti-coelho (1:1000, #P0217), ambos fornecidos pela Dako (Agilent/Dako, Glostrup, Dinamarca). No caso da análise de CD81, o experimento foi realizado em condições não redutoras, com o tampão de amostra Pierce™ LDS Sample Buffer (Thermo Scientific, #84788) para a corrida. O total de 12 µg de proteína sEV e 5 µg de proteína de lisado celular foram usados para a técnica.

A preparação das amostras, extração de proteínas celulares e detalhes do ensaio de *western blotting* foram realizados de acordo com o descrito previamente (Krejsgaard et al. 2006).

4.6 Validação das nanopartículas: criomicroscopia eletrônica de transmissão

As amostras sEV foram concentradas e processadas para criomicroscopia eletrônica de transmissão (Crio-TEM) na *cryo chamber* Vitrobo™ Mark IV (Thermo). Essa câmera, específica para congelamento rápido, impede que cristais de gelo formem artefatos na imagem. Após transferência para a grade de cobre específica para TEM, foram transportadas em nitrogênio líquido para aquisição das imagens no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 20 TWIN (FEI Company, Hillsboro, OR) com imagens capturadas a 200 kV. As imagens foram obtidas no *Core Facility for Integrated Microscopy* (CFIM) na Universidade de Copenhagen, Dinamarca, com auxílio do especialista Tillmann Pape e do Prof. Dr. Klaus Qvortrup.

4.7 Análise do conteúdo proteico das nanovesículas

Para o estudo do conteúdo proteico vesiculado, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa (LC-MS/MS) com método de aquisição independente de dados (DIA). Para tal, as amostras foram lisadas com o tampão de lise tiocianato de guanidina (6 M GdCl, 10

mM TCEP, 40 mM CAA, 50 mM HEPES pH8.5). Os reagentes foram procedentes da Sigma (cloridrato de guanidínio (#G3272), 2-Cloroacetamida (#C0267), HEPES (#H3375) e Cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina (#C4706)). A seguir, as proteínas foram precipitadas com solução de acetona 100% por 18 horas a -20°C (concentração final de 80%). O pellet de proteínas foi ressuspenso na mesma solução tampão e quantificado pelo método de microBCA (ThermoFisher). O lisado de proteínas foi diluído na concentração 2mg/ml e submetido à etapa de digestão proteica para posterior dessalinização de amostras antes de ser avaliado por MS. O ensaio foi executado pela empresa Biogenity (Alborg, Dinamarca) no espectrofotômetro Orbitrap Exploris™480 (ThermoFisher).

4.8 Avaliação da captação e incorporação das nanovesículas por queratinócitos imortalizados

Células da linhagem de queratinócitos imortalizados HaCaT foram distribuídas em placas de 24 poços (Corning, Somerville, MA, USA), 1×10^5 de células por poço, e incubadas durante a noite a 37°C com 5% de CO₂. No dia seguinte, foram tratadas com sEV previamente marcadas ou não, em diferentes concentrações e tempos de incubação. Passado o tempo de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados com PBS 1x gelado e as células foram incubadas por 5 minutos a 37°C com solução enzimática TrypLE™ Express Enzyme (Thermo, # 12604013) para gentil remoção da placa. As células então foram lavadas com meio DMEM e posteriormente com PBS 1x, fixadas e imediatamente avaliadas por citometria de fluxo ou citometria de fluxo por imagem quanto à captação de sEV.

4.9 Marcação das nanovesículas para experimentos com fluorescência

As sEV foram marcados com CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher, #C34557) ou CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (ThermoFisher, #C34554) na concentração final de 10 μ M ou 20 μ M, respectivamente. O conteúdo de RNA vesiculado foi marcado com SYTO™ RNASelect™ Green Fluorescent cell Stain (ThermoFisher, #S32703) na concentração final de 10 μ M. Em alguns ensaios de citometria foi realizada a incubação com anticorpos anti-annexin-V (BD, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, United States; #556421) e anti-CLA (BD, #563961) simultâneas com os reagentes permeáveis à membrana celular. Brevemente, sEV foram incubadas por 60 minutos a 37°C com os reagentes de marcação. Em seguida, foram submetidas a cromatografia de exclusão por tamanho e ultrafiltração para remoção do excesso de reagente de marcação. Essa etapa é crucial para garantir a remoção do reagente de marcação

que não foi integrado as sEV (Figura 4) e reduzir a emissão de falso sinal positivo nos ensaios de captura de sEV por células. As sEV então foram imediatamente utilizadas em ensaios com células HaCaT ou foram acopladas a esferas de látex (*beads*) e avaliadas por citometria de fluxo.

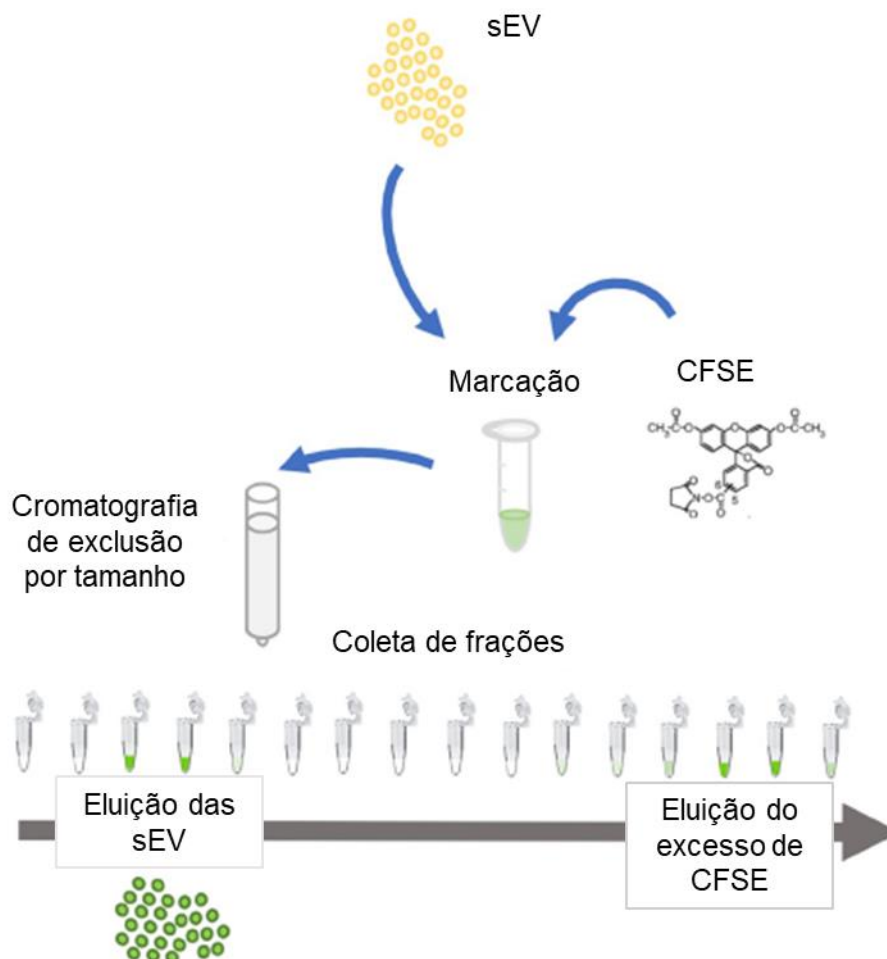


Figura 4. Remoção do excesso do reagente de marcação por cromatografia de exclusão por tamanho. Ilustração do protocolo de marcação e remoção do excesso de marcação cromatografia de exclusão por tamanho. Adaptado de (Morales-Kastresana et al. 2017).

4.10 Avaliação das sEV marcadas por citometria de fluxo

Após a remoção do excesso de anticorpo ou dos fluoróforos permeáveis a membrana plasmática, as sEV foram acopladas a esferas de látex de tamanho 3 μm (Thermo) por 15 minutos em temperatura ambiente (TA), com homogeneização constante por rotação. As esferas foram diluídas em proporção de 10x. A seguir, os espaços livres das esferas foram bloqueados com 1 mL de soroalbumina bovina (BSA, Sigma, #A9418) na concentração final de 10 mM, por 15 minutos à TA, sob constante homogeneização. Um mL de PBS 1x foi adicionado à solução e incubado por mais 15 minutos, TA, sob agitação constante. A solução foi centrifugada (580 g, 5

minutos, TA) e as esferas foram ressuspensas em 1 mL de glicina (100 mM). Uma nova etapa de bloqueio (30 minutos, TA, rotação constante) foi realizada. Por fim, a solução foi lavada com PBS 1x gelado por centrifugação e ressuspensa em tampão para aquisição em placa de 96 poços no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD). Ao menos 50.000 eventos foram adquiridos por amostra.

Para evitar sinais de anticorpos/agregados proteicos inespecíficos acoplados às esferas, as amostras de sEV/beads foram incubadas com diferentes soluções de detergente por 45 minutos a TA e a amostra foi adquirida novamente. O tratamento de lise foi realizado com solução de PBS 1x de Triton™ X-100 na concentração final de 1% (Sigma-Aldrich, #T8787), NP-40 na concentração final de 1% (ThermoFisher, #85124) ou Tween 20% (ThermoFisher, #13484259).

Todos os experimentos de citometria foram desenvolvidos no Flow Cytometry & Single Cell Core Facility, na Universidade de Copenhague, Dinamarca.

4.11 Análise da captação de sEV por citometria de fluxo e citometria de fluxo multiespectral por imagem

A captação das sEV por células HaCaT foi avaliada por citometria convencional e citometria multiespectral de imagem. Resumidamente, as células fixadas foram transferidas para microplacas de 96 poços de fundo em U (Sigma, # BR701330), volume de 200 µl. A leitura foi feita no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD) com aproximadamente 50.000 eventos adquiridos por amostra. A análise foi feita no software FlowJo v10.8 (BD). Como estratégia de análise, selecionamos as amostras únicas por FSC-H e FSC-A e sem seguida, a população de interesse por tamanho e granulosidade, SSC e FSC.

A leitura da amostra por citometria de fluxo multiespectral de imagem foi realizada no equipamento Amnis® ImageStream®XMk II (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). As imagens foram adquiridas no modo com alta resolução high gain (HG) com a amplificação máxima do equipamento, de 60x. Ao menos 500 eventos únicos e em foco (estratégia de análise) foram adquiridos por amostra. A análise foi feita no software IDEAS (Luminex).

4.12 Análise da captação de sEV por microscopia confocal de fluorescência

Para avaliar se as nanovesículas poderiam ser internalizadas por queratinócitos, 50x10³/poço de células HaCaT foram plaqueadas em lâminas de vidro (*Nunc™ Lab-Tek™ II CC2™ hamber Slide System*, ThermoFisher, # 154941) por 24 h prévias ao tratamento de sEV. O meio então foi substituído por 200 µl de suspensão de aproximadamente 1.5x10⁹ sEV previamente

marcadas com CellTrace™ Violet diluídos em meio de cultura, durante 3h30 à 37°C com 5% de CO₂. Utilizamos dois controles negativos do ensaio: apenas o tampão PBS e controle da lavagem (solução de marcação CellTrace™ Violet submetida ao mesmo processo de marcação e lavagem que as nanovesículas, porém sem conter as nanovesículas).

Após a incubação, cada poço foi lavado com solução de PBS 1x gelado e fixado com solução de paraformaldeído 4% a 37°C por 15 minutos. A seguir, as células foram lavadas com a solução de *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (ThermoFisher, #14025134) e marcadas com 100 µl (5µg/mL, 10 minutos em TA), por poço, do reagente *Wheat Germ Agglutinin (WGA) Texas Red™-X Conjugate* (ThermoFisher, # W21405).

Passado o tempo de incubação, a lâmina foi lavada mais uma vez com o tampão HBSS e coberta com o meio de montagem específico para imunofluorescência ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermofisher, #P36961) e armazenada a 4°C no escuro. Análise foi realizada no microscópio confocal de varredura a laser modelo Carl Zeiss LSM 980 acoplado com Airyscan 2 localizado no *Core Facility for Integrated Microscopy* (CFIM) na Universidade de Copenhague, Dinamarca, com auxílio do especialista Thomas Hartig Braunstein.

4.13 Avaliação do efeito funcional de sEV em queratinócitos imortalizados

Para a análise do efeito de sEV na expressão genica, queratinócitos HaCaT foram distribuídos em placas de 24 poços (Corning), 1×10^5 de células por poço, e incubadas por 18 horas a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, foram adicionadas 4×10^{10} ou 8×10^{10} de sEV por 4 h ou 24 h, sendo o volume final do poço de 250 µl. Após incubação, o sobrenadante foi removido e as células aderidas ao poço foram lavadas com PBS 1x gelado três vezes. Todo o líquido foi removido e a placa armazenada a -20°C para os ensaios de expressão de RNA.

4.14 Expressão gênica

A avaliação dos transcritos em células HaCaT foi realizada por sequenciamento de RNA (transcriptoma) e PCR em tempo real (RT-qPCR). A extração de RNA total foi obtida com o kit RNeasy Plus Kit (Qiagen, #74034) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA foi mensurada com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). Para obtenção de DNA complementar a partir do RNA total purificado foi utilizado o kit High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, #4368814) de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação e detecção de fluorescência foi feita no termociclador Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA). O sequenciamento

de RNA foi executado pela BGI (Beijing Genomics Institute), alocado em Hong Kong, na China. A análise foi realizada em parceria com o bioinformata Prof. Thomas Litman, *LEO Foundation Skin Immunology Research Center*, na Universidade de Copenhague.

4.15 Expressão de microRNAs por qPCR em tempo real

A avaliação da expressão de microRNA em células HaCaT e nanovesículas foi realizada por qPCR em tempo real (RT-qPCR). O cDNA foi sintetizado a partir de 5 ng de amostra com auxílio do kit de transcrição reversa de miRNA TaqMan® (Applied Biosystems, #4366596) de acordo com instruções do fabricante. O *small nuclear* (do inglês: snRNA) U6 RNA foi usado como referência para os miRNAs de interesse. A PCR quantitativa foi realizada através do kit miRNA TaqMan® (Applied Biosystems, #4427975) seguido de amplificação e detecção de fluorescência em tempo real no termociclador Mx3005P (Agilent Technologies). As sondas TaqMan utilizadas nos ensaios são provenientes da Life Technologies: hsa-miR-21-5p (#000397), hsa-miR-155-5p (#4440886), U6 snRNA (#001973), hsa-miR -378a-5p (#000567) e let-a (#000377).

4.16 Análise estatística

Cada conjunto de dado foi verificado quanto a adesão a curva da normalidade com o teste estatístico Shapiro-Wilk (Royston 1982). Para análise por espectrometria de massa, utilizamos o teste T paramétrico na comparação entre as amostras sEV com distribuição normal e o teste estatístico não paramétrico Mann Whitney entre as amostras sEV sem distribuição normal. Para análise de células HaCaT tratadas com sEV, utilizamos o teste T paramétrico na comparação entre as amostras com distribuição normal ou o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon (Wilcoxon 1945) entre as amostras sem distribuição normal. Na análise de correlação utilizamos o teste estatístico paramétrico Pearson para conjunto de dados com distribuição normal ou o teste estatístico não paramétrico Spearman para conjunto de dados sem distribuição normal. Os gráficos foram desenvolvidos no software Graph Prism versão 8.3. $p < 0,5$ foi considerado diferente estatisticamente.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção e caracterização das nanovesículas extracelulares

A fonte para obtenção de vesículas mais comumente utilizada é o meio de cultura condicionado (Gardiner et al. 2016), de acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV). O soro fetal bovino (SFB), adicionado como suplemento na cultura, é fonte de contaminação em estudos de sEV derivadas de meio condicionado. Assim, optamos por utilizar nas culturas para obtenção de sEV o meio de cultura AIM-V específico para cultura de linhagens linfocíticas que não necessita de suplementação de soro.

Assim, as linhagens celulares foram mantidas em cultura na concentração $1 \times 10^6/\text{mL}$ e o sobrenadante foi coletado a cada 48h por centrifugação e substituído por meio fresco. O meio condicionado foi mantido em 4°C por no máximo 24h. O número máximo de 6 passagens foi utilizado para obtenção de nanovesículas por cultura. A viabilidade das células foi acompanhada durante todo o período de coleta pelo corante trypan blue, sendo o mínimo aceitável de 85% de células viáveis. As linhagens foram testadas regularmente para contaminações por mycoplasma.

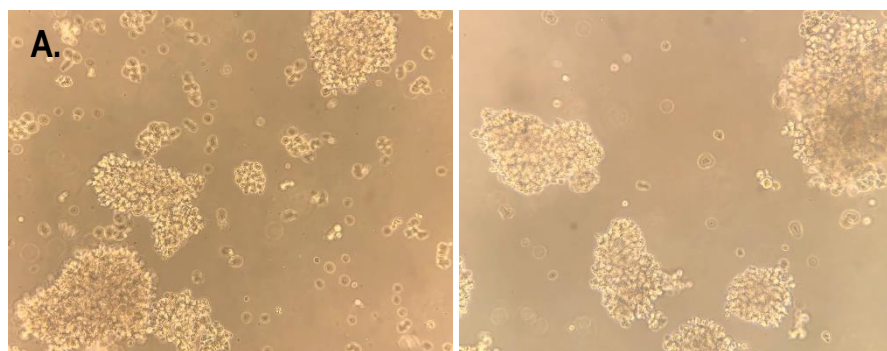


Figura 5. Linhagens de linfoma T cutâneo em cultura. Microscopia óptica das linhagens LCCT Myla 2059 (A) e Hut78 (B) em suspensão após 72h de cultura. Aumento de 40x.

As nanovesículas produzidas, espontaneamente, foram obtidas do meio celular condicionado por protocolo baseado em centrifugação sequencial, ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho, Figura 6.

Outro contaminante frequente nos preparados de sEV é a albumina (Shu et al. 2021, Pietrowska et al. 2019), importante componente nos meios de cultura *in vitro*, comumente purificada juntamente com as sEV. Com o intuito de reduzir essa contaminação, utilizamos o filtro de centrifugação de 100 kDa MWCO na etapa de ultrafiltração do protocolo de obtenção de sEV,

eliminando assim a albumina, cujo peso molecular é 66kDa, e, também, outras proteínas solúveis de peso molecular inferior a 100kDa, como a maioria das citocinas (Shu et al. 2020).

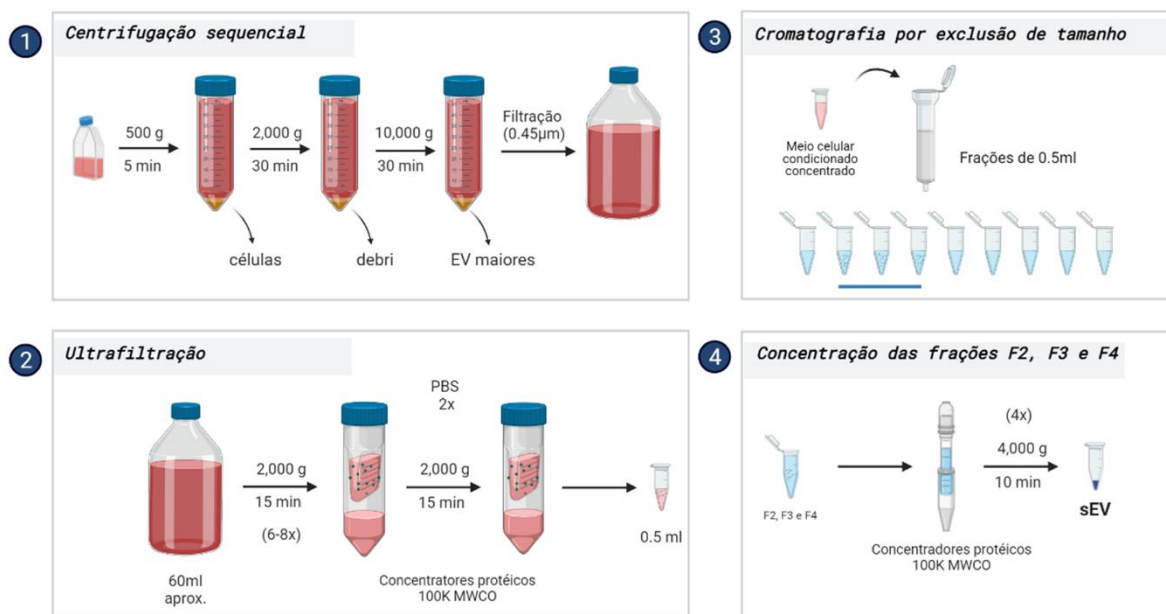


Figura 6. Protocolo de obtenção de nanovesículas partir de meio condicionado. O protocolo adotado para obtenção de sEV consta de três etapas: (I) centrifugação sequencial, para remoção de *debris* celular e vesículas maiores, (II) ultrafiltração, para redução do volume do meio condicionado e remoção de agregados proteicos de peso molecular inferior a 100kDa, e (III) cromatografia por exclusão de tamanho, etapa em que as vesículas são purificadas e separadas de proteínas filtradas junto com meio condicionado concentrado na etapa anterior. Opcionalmente é possível realizar uma segunda filtração para reduzir o volume de sEV obtido. Ilustração criada com Biorender.com.

A cromatografia por exclusão, última etapa do protocolo de obtenção de EV, resultou na coleta de nove frações de 0,5mL. A concentração de proteínas, realizado pelo método de BCA, e as partículas, por rastreamento de nanopartículas (NTA), foram analisadas nas nove frações coletadas Figura 7A. Detalhes e princípio da técnica NTA estão descritos na seção seguinte 5.2. validação por rastreamento de nanopartículas.

Observa-se na Figura 7A que as frações tardias tiveram maior rendimento proteico e menor rendimento de partículas, enquanto o inverso foi observado nas frações iniciais, F2, F3 e F4. Tal padrão indica que as vesículas se concentram nas frações iniciais e proteínas solúveis nas frações tardias, em acordo com instruções do fabricante e estudos prévios (Shu et al. 2020). O ensaio de western blotting do marcador HSP-70, proteína enriquecida em vesículas extracelulares pequenas, detectou também banda, ligeiramente, mais intensa nas frações F2 e F3 em comparação com as demais, Figura 7B.

Os achados avaliados, em conjunto, indicam que as frações F2, F3 e F4 contêm as nanovesículas extracelulares (sEV).

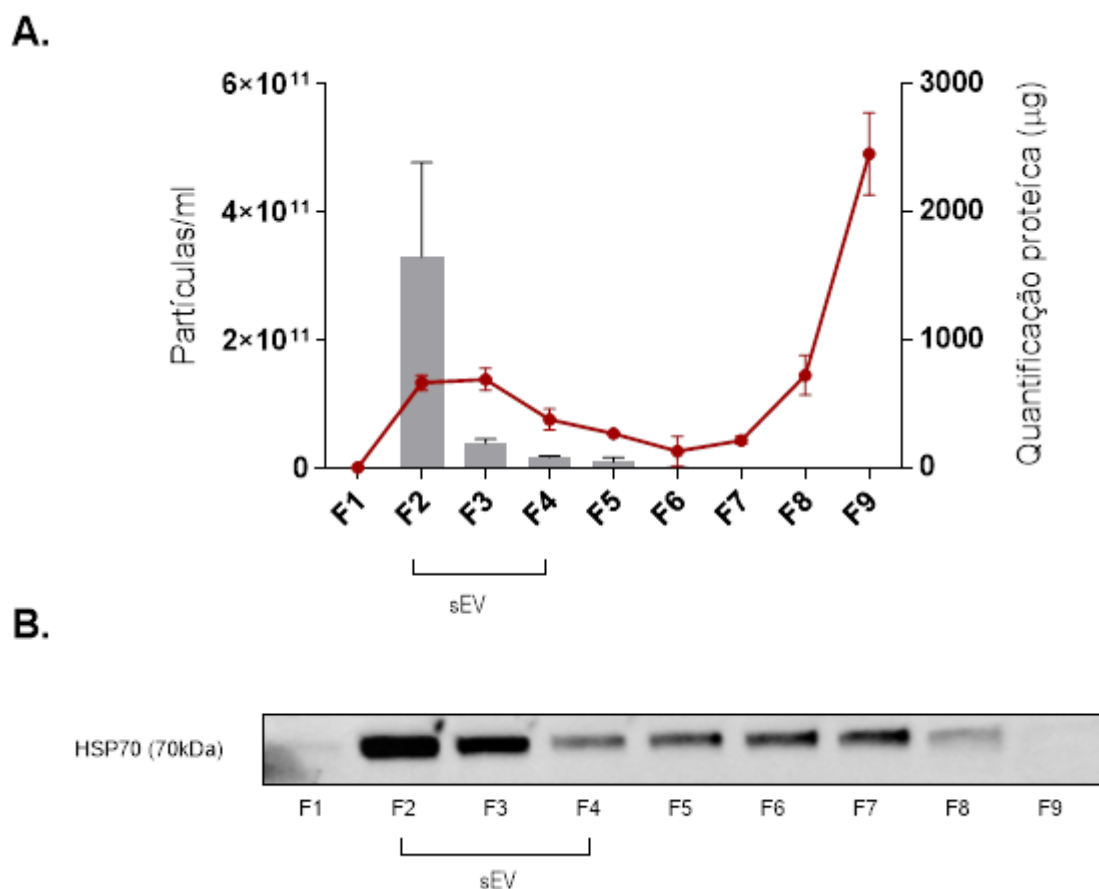


Figura 7. Caracterização das nove frações obtidas da cromatografia por exclusão de tamanho. As nove frações de 0,5mL coletadas na última etapa do protocolo de obtenção de sEV foram caracterizadas quanto a (A) quantidade de partículas por rastreamento de nanopartículas (NTA) e quantidade de proteínas pelo método de BCA e (B) expressão de HSP-70 por western blotting. As barras representam mediana dos valores de NTA e os dot spot em vermelho representam os valores de mediana da quantificação de proteínas (n=3).

Em seguida, o preparado de sEV foi validado por três abordagens técnicas distintas: tamanho médio compatível, evidência de perfil proteico típico de sEV e avaliação da morfologia em análise por microscopia, conforme as diretrizes (ISEV)(Théry et al. 2018).

5.2 Validação das sEV: distribuição média de diâmetro

As vesículas foram avaliadas quanto ao tamanho e concentração através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) no aparelho Nanosight. Brevemente, o espalhamento de luz emitido pelo aparelho sobre a amostra permite a visualização das partículas em movimento browniano. O equipamento então grava pequenos vídeos que são analisados pelo software posteriormente. Durante a análise dos vídeos, partículas menores são distinguíveis de partículas maiores por apresentarem movimentos mais rápidos. Assim, a observação individual das partículas permite uma análise de alta resolução. O software gera um gráfico de distribuição média do tamanho das partículas das cinco leituras de cada amostra, ilustrado na Figura 8A do lado

esquerdo, e a média das cinco leituras ao lado direito. A Figura 8B mostra captura de tela dos vídeos analisados e as setas indicam partículas em movimento. Uma leitura exata e reprodutível depende também do ajuste de certos parâmetros no momento da aquisição. Os parâmetros aplicados durante a aquisição estão descritos na seção Metodologia.

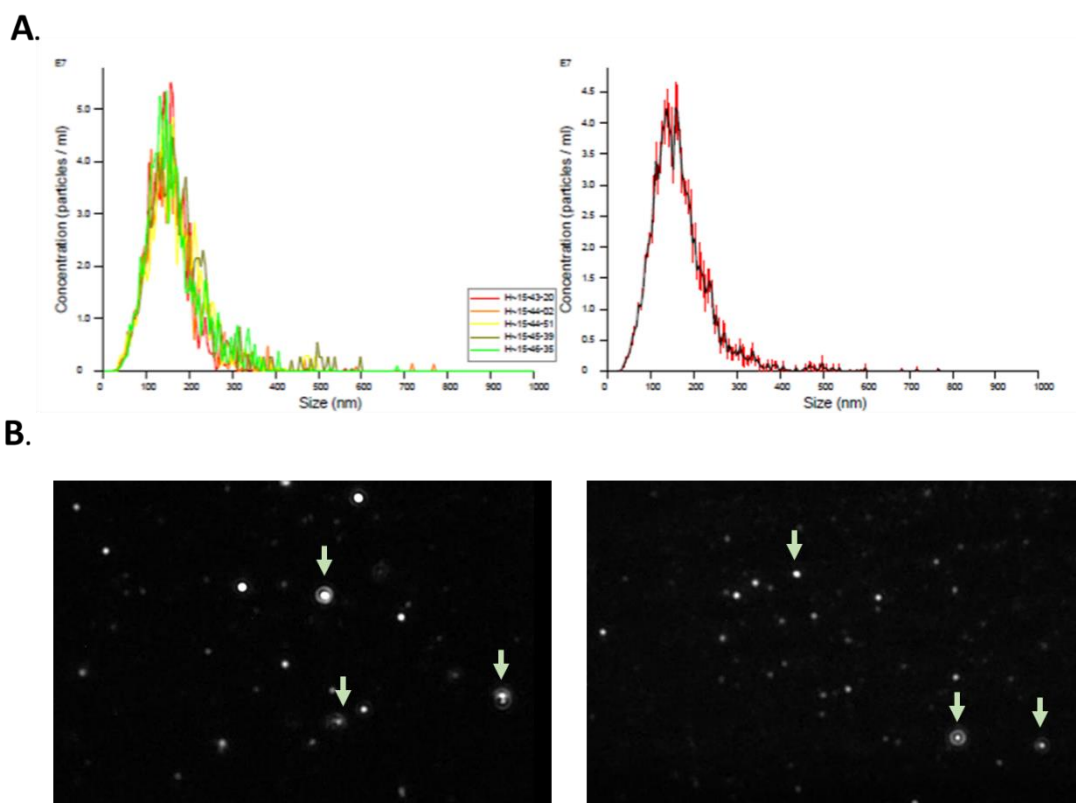


Figura 8. Análise da distribuição de tamanho por rastreamento de nanopartículas (NTA). Preparado de sEV-Hut78 foi diluído 2000x em PBS para aquisição no aparelho Nanosight. (A) Imagens extraídas do relatório gerado pelo software mostram distribuição média de tamanho provenientes de 5 leituras diferentes da mesma amostra e, ao lado, média das mesmas leituras. (B) capturas de tela de dois dos vídeos analisados, setas indicam partículas em movimento.

A Figura 8 mostra os resultados da análise de rastreamento de nanopartículas do grupo amostral sEV-Myla 2059 e sEV- Hut78. As médias de tamanho das sEV de ambos os grupos foram 167.52 ± 7.08 e 159.05 ± 3.23 , das amostras sEV-Myla 2059 e sEV- Hut78 respectivamente. As médias foram similares e ambas estão dentro do esperado de sEV, entre 100nm e 200nm. As

amostras sEV assemelham-se também nas modas, 144.76 ± 9.42 e 141.93 ± 5.66 , sEV-Myla 2059 e sEV- Hut78, respectivamente.

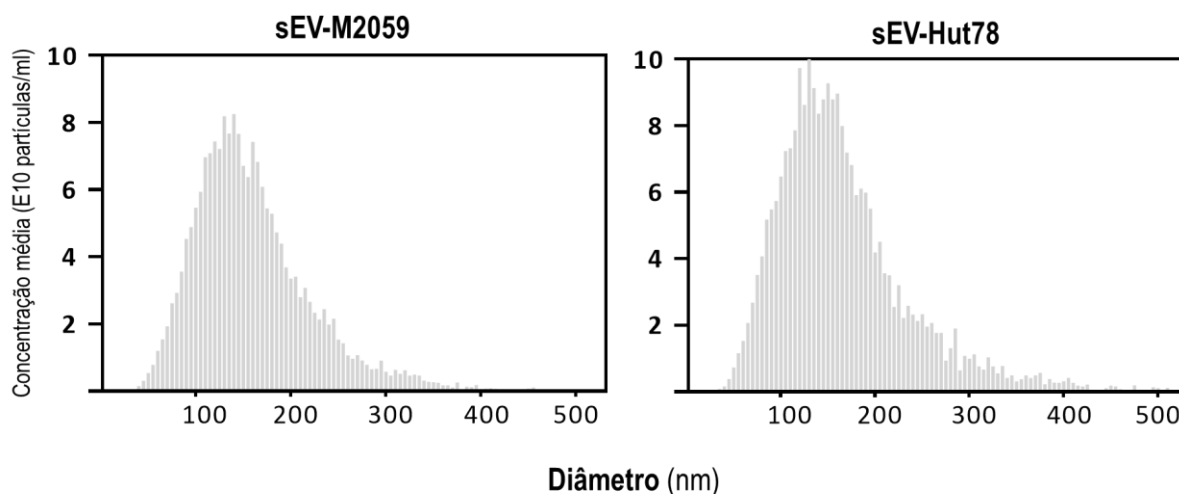


Figura 9. Distribuição média de diâmetro das amostras sEV-Myla 2059 e sEV-Hut78. As sEV foram diluídas em PBS e o tamanho das partículas foi avaliado por NTA. Estão representados no gráfico resultados de 5 amostras do grupo sEV-Myla 2059 e 6 amostras do grupo sEV-Hut78 obtidas em pelo menos três experimentos independentes.

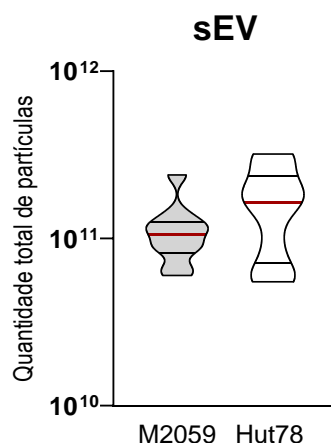


Figura 10. Quantificação total de partículas por NTA. As sEV foram diluídas em PBS e a quantidade total de partículas foi avaliada nas amostras por NTA (sEV-Myla2059, $n=10$; sEV-Hut78, $n=14$). Os dados mostram mediana e quartis em vermelho. Os resultados foram obtidos em pelo menos três experimentos independentes.

Os resultados apontam também que a produção de partículas entre as linhagens é semelhante, Figura 9. O rendimento médio de partículas a partir de 60 mL de MC, foi 1.1×10^{11} para as amostras sEV-Myla 2059 e 1.6×10^{11} para as amostras sEV-Hut78 (Figura 10). As análises de NTA permitem concluir que as amostras mostram tamanho compatível com sEV de acordo com a literatura científica (Théry et al. 2018).

5.3 Validação das sEV: perfil proteico

Antes de validar o protocolo, de acordo com o perfil proteico das sEV, avaliamos se a produção de sEV diferia em quantidade entre as linhagens. Assim, sEV foram preparadas a partir de 60 mL de MC e quantificadas quanto a massa proteica. Observamos que os amostras sEV-Myla 2059 e sEV-Hut78 não diferem quanto a carga proteica, Figura 11, apesar da maior dispersão no grupo amostral das sEV-Myla 2059.

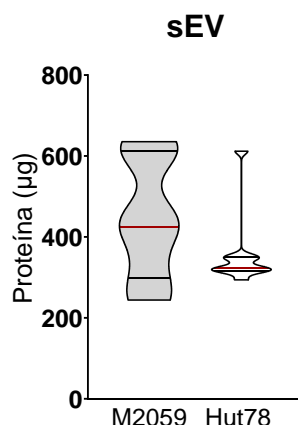


Figura 11. Rendimento proteico dos preparados de sEV. As amostras sEV foram lisadas com o reagente RIPA e sua carga proteica foi quantificada pelo método BCA, (sEV-Myla2059, n=10; sEV-Hut78, n=10). Gráficos de violino incluem quartis e a mediana em vermelho. Os resultados foram obtidos em pelo menos três experimentos independentes.

O perfil proteico dos lisados de sEV, juntamente com lisados celulares das linhagens foi determinado por *western blotting*. As proteínas que selecionamos para comprovar o perfil proteico são: CD81 (receptor de membrana plasmática), HSP-70 e RAB5 (proteínas presentes no citosol). A ISEV instrui ainda o emprego de marcadores chamados de negativos para sEV - proteínas que não apresentam relação com vesículas, mas presentes nas células podendo ser purificadas em conjunto com as sEV no preparado como indicadores de contaminação por resíduo celular. Como controle negativos selecionamos GM-130 e a calnexina.

Os ensaios de caracterização proteica por *western blotting* revelaram presença dos marcadores de sEV HSP-70, RAB5, CD81 nas amostras de nanovesículas e nos lisados celulares das células de origem enquanto que os marcadores negativos GM-130 e calnexina foram expressos somente nos lisados celulares, Figura 12. Os resultados são considerados adequados para validação do perfil proteico das sEV.

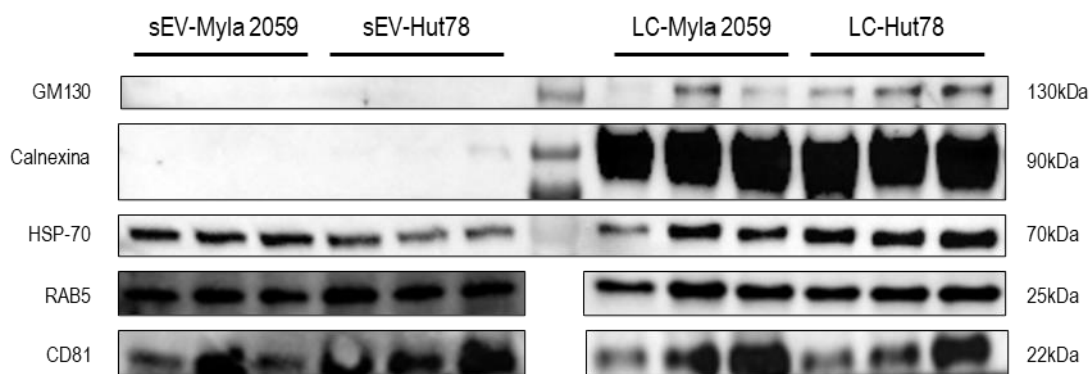


Figura 12. Expressão de marcadores típicos de EV em lisado proteico celular e de amostras sEV. Lisado proteico de sEV e de linhagens LCCT foram avaliados por western blotting quanto a expressão dos marcadores HSP-70, RAB5 e CD81 e dos controles negativos GM130 e calnexina. Foram utilizados 10 μg de amostra sEV e 12 μg das amostras de lisado celular.

5.4 Validação das sEV: morfologia

A última etapa de validação das sEV foi a análise morfológica por crio-microscopia eletrônica. A morfologia típica de sEV das amostras sEV-Myla2059 pode ser observada na Figura 13, e na Figura 14, para amostras sEV-Hut78.

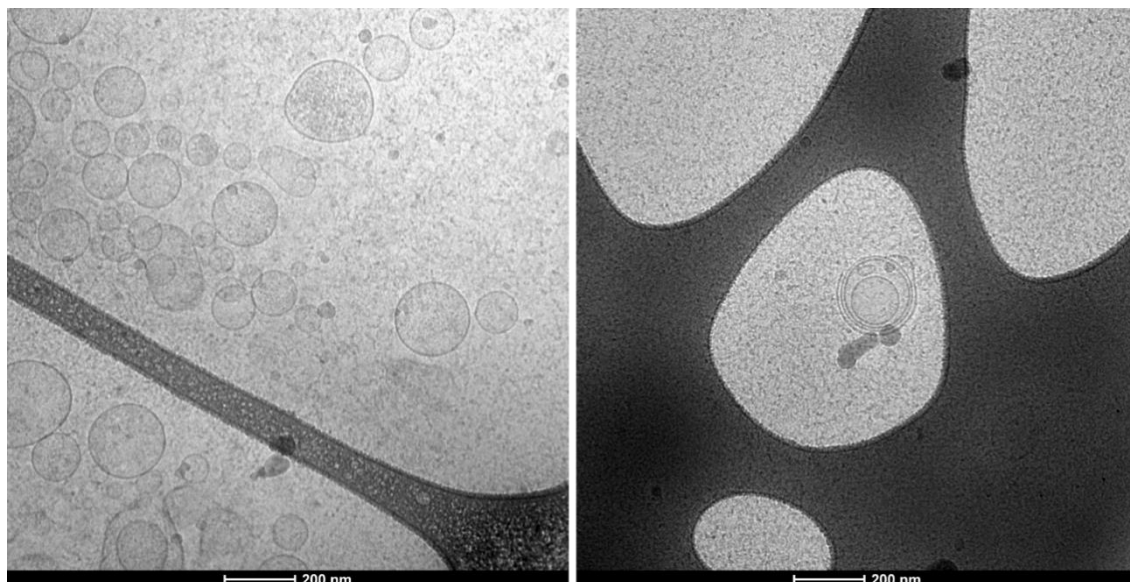


Figura 13. Visualização da morfologia das nanovesículas sEV-Myla2059. Os preparados de sEV foram ultracongelados no equipamento Vitrobbtm Mark IV e imediatamente analisados no microscópio de transmissão eletrônica Tecnai G20 TWIN.

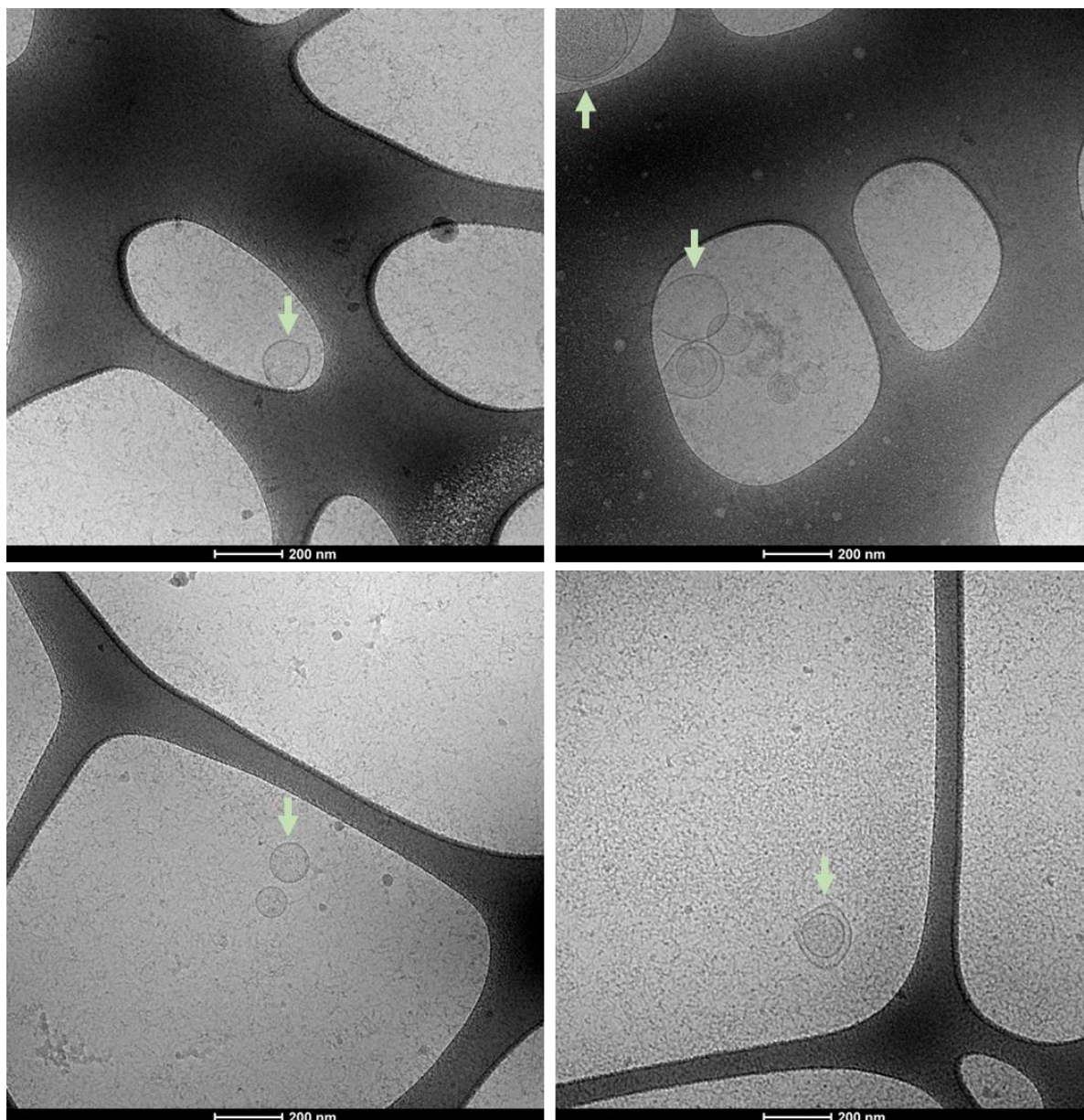


Figura 14. Visualização da morfologia das nanovesículas sEV-Myla Hut78. Os preparados de sEV foram ultracongelados no equipamento Vitrobbtm Mark IV e imediatamente analisados no microscópio de transmissão eletrônica Tecnai G20 TWIN. Setas nas imagens indicam exemplos de nanovesículas.

Em ambos os casos é possível observar vesículas dentro de vesículas maiores, tal fenômeno pode ser decorrente das sucessivas centrifugações durante a etapa de ultrafiltração. Nota-se também a heterogeneidade nos tamanhos, evento também observado na análise por NTA. Também, as imagens sugerem que o tamanho das vesículas observadas condiz com o resultado obtido das análises por NTA. As imagens de microscopia eletrônica confirmam morfologia condizente com sEV.

5.5 Conteúdo protéico das nanovesículas LCCT

Após a validação das nanovesículas, vinte preparados de nanovesículas (replicatas experimentais) derivadas das linhagens Myla 2059 e Hut78 foram analisadas quanto ao conteúdo proteico por espectroscopia de massa. Os dados de intensidade de expressão das proteínas com ao menos dois peptídeos foram transformados (\log_2) em etapa prévia a análise. Também foram removidas amostras identificadas como *outliers* (1 do grupo sEV-Hut78 e 3 do grupo sEV-Myla 2059).

Identificamos o total de 620 proteínas (646 se considerarmos as diferentes isoformas da mesma proteína) descritas no Anexo A, sem a presença de proteínas exclusivas em um dos grupos. Não foi identificado citocinas nas amostras de sEV, o que indica que as etapas do protocolo de obtenção de sEV foram eficientes na remoção de citocinas, que são frequentes no meio condicionado de células tumorais.

A seguir comparamos o grupo de proteínas obtidos das sEV-LCCT com as 100 proteínas mais frequentemente encontradas em estudos com sEV, de acordo com a base de dados Vesiclepedia (Pathan et al. 2019, Kalra et al. 2012) ilustradas na Figura 15.

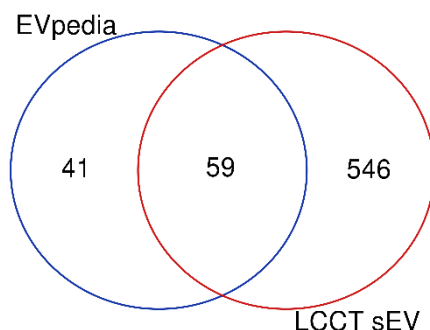


Figura 15. As sEV-LCCT contêm 59 entre as 100 proteínas mais frequentemente encontradas em sEV. Diagrama de Venn entre as proteínas encontradas nas sEV-LCCT (total de 649, cor vermelha) e as 100 proteínas mais frequentes em estudos com sEV de acordo com a base de dados EVpedia (Vesiclepedia) representado na cor azul.

As 59 proteínas presentes nas sEV-LCCT constituem uma parte das 100 mais frequentes elencadas pela Vesiclepedia estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1: 59 proteínas expressas nas sEV-LCCT entre as 100 mais frequentemente encontradas em sEV

TLN1	C3	CD81	LGALS3BP	PPIA	EEF1A1
EEF2	CFL1	HSPA8	LDHA	KPNB1	HSP90AA1
YWHAG	YWHAQ	AHCY	KRT10	GAPDH	RAB7A
MSN	CCT2	ACTB	TUBB4B	TFRC	PGK1
UBA1	MYH9	ENO1	CAP1	GNB2	
FASN	CCT8	CCT4	PFN1	ALDOA	
A2M	PRDX1	ANXA6	CDC42	FLNA	
KRT1	EZR	GSN	GNB1	CLIC1	
RAP1B	HSP90AB1	TCP1	ACLY	CCT6A	
EIF4A1	CCT3	ITGB1	RAB10	CLTC	
TPI1	SLC3A2	PKM	ALB	RAN	

Observa-se proteínas *heat shock* (HSPA8, HSP90AB1 e HSP90AA1), tetraspaninas (CD81) e proteínas da família anexina (ANXA6), todas reconhecidas com frequência em sEV, utilizadas como marcadores de sEV. Dentre as frequentemente expressas, também há proteínas relacionadas a adesão celular (RAP1B, ITGB1), matrix celular (ACTB e TUBB4B), enzimas catalizadoras (FASN e LDHA), chaperonas (CCT3, CCT4, CCT6A, CCT2 e CCT8) e componentes do sistema complemento (C3).

Identificamos a presença de diversas integrinas e moléculas de adesão celular nas amostras de sEV, Tabela 2. Comparando as sEV-Hut78 com as sEV-Myla2059 detectamos maior abundância de 8 das 12 integrinas e moléculas de adesão ($p > 0.05$, CD166, CD146, CD54, LAMP2, ITGB1, ADGRG6 e ITGB2) nas EV-Hut78.

Tabela 2: Integrinas e proteínas relacionadas a adesão celular

Proteínas (IDs)	Símbolo oficial do gene	sEV-Hut78	sEV-M2059	Valor de p
P15151	PVR (CD155)	13.2760	12.9881	0.2701
Q13740	ALCAM (CD166)	13.1989	12.8755	0.0023
P43121	MCAM (C146)	12.9092	12.5110	0.0030
P14151	SELL (CD62L)	12.5096	12.3826	0.2112
P12830	CDH1 (CD234/LCAM)	12.2089	11.6709	0.0954
P16070	CD44	12.7938	10.6397	0.0002
P05362	ICAM1 (CD54)	11.2523	11.6314	0.0467
P13473	LAMP2 (CD107b)	11.8331	10.4933	0.0179
P05556	ITGB1 (CD29)	11.5150	10.3754	0.0159
P08195	SLC3A2 (CD98)	11.5487	9.3395	0.0007
Q86SQ4	ADGRG6	10.8221	9.7152	0.0160
P05107	ITGB2 (CD18)	11.2644	8.4081	0.0001

Valores de intensidade log₂ (média) de cada grupo de sEV;

Detectamos também 23 proteínas relacionadas ao processo de progressão tumoral, descritas na Tabela 3. Destas, nove foram mais abundantes na amostra sEV-Hut78 (CD70,

PDGFRB, RAB7A, RAB10, ACACA, MYOC, LGALS3BP, IL6ST e CSF1R) e somente três foram mais abundantes nas amostras sEV-Myla 2059 (CACYPB, FSCN1 e LGALS1). Apesar das proteínas da família RAB estarem muito relacionadas com carcinogênese, também são frequentes em preparados de sEV, enfatiza a qualidade dos métodos selecionados para o isolamento de sEV.

Tabela 3: Marcadores relacionados a tumorigênese

Proteínas (IDs)	Símbolo oficial do gene	sEV-Hut78	sEV-M2059	Valor de p
P09619	PDGFRB (CD140B)	13.0123	12.0555	0.0006
P10721	KIT (c-kit)	12.6041	12.4922	0.2024
P32970	CD70 (CD27L)	13.6319	12.9312	0.0494
P68871	HBB	13.5351	13.5622	0.7727
P69905	HBA1, HBA2	13.6815	13.8405	0.1281
P51149	RAB7A	10.8442	9.9464	0.0005
P61026	RAB10	11.4471	10.7282	0.0052
P62491	RAB11A	10.9852	10.7248	0.6577
Q8WZ75	ROBO4	11.7360	11.5426	0.3795
Q9HB71	CACYBP (S100A6BP)	8.3217	9.6679	0.0004
Q53EL6	PDCD4	8.7010	8.2346	0.1391
Q12906	ILF3 (MMP4)	8.5104	7.8099	0.2164
Q12913	PTPRJ (CD148)	14.7442	14.6959	0.6229
Q13085	ACACA	10.7282	9.0963	0.0002
Q16658	FSCN1	11.9662	12.7777	0.0001
Q16853	AOC3 (VAP-1)	11.4832	11.2007	0.0852
Q99972	MYOC	10.0589	8.4070	0.0087
Q08380	LGALS3BP	13.3354	8.6922	0.0001
P09382	LGALS1	8.5292	9.8812	0.0459
P12821	ACE (CD143)	11.9596	11.7529	0.1578
P40189	IL6ST (CD130)	12.6961	12.2532	0.0402
P07333	CSF1R	12.6222	11.6815	0.0001
Q9UBG0	MRC2 (CD280)	11.4822	10.8177	0.1347

Valores de intensidade \log_2 (média) de cada grupo de sEV;

Conforme esperado, as sEV-LCCT expressam também diversos marcadores de células T, descritos na Tabela 4. Dos 9 marcadores de células T encontrados, a expressão de DPP4 (CD26), ICOSLG e BST1 foi mais abundante nas amostras sEV-Hut78 enquanto que para sEV-Myla 2059 foram a expressão de EBI3, CD40LG e IL1R2.

Tabela 4: Marcadores comuns em células T

Proteínas (IDs)	Símbolo oficial do gene	sEV-Hut78	sEV-M2059	Valor de p
P27930	IL1R2	8.6051	11.2171	0.0052
Q9NPH3	IL1RAP	12.2127	12.3385	0.2728
P29965	CD40LG	8.7104	11.4853	0.0008
Q10588	BST1 (CD157)	12.2710	11.4878	0.0182
Q14213	EBI3 (IL27b)	8.6288	14.2081	0.0002
P08637	FCGR3A (CD16)	15.5404	15.6512	0.5235
Q12913	PTPRJ (CD148)	14.7442	14.6959	0.6229
O75144	ICOSLG	14.0801	13.6858	0.0084
P27487	DPP4 (CD26)	12.3131	11.7900	0.0038

Valores de intensidade \log_2 (média) de cada grupo de sEV;

Identificamos também 7 citoqueratinas (KRT) expressas similarmente entre amostras de sEV avaliadas, descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Citoqueratinas

Proteínas (IDs)	Símbolo oficial do gene	sEV-Hut78	sEV-M2059	Valor de p
P04264	KRT1	9.7070	9.7098	0.9914
P35527	KRT9	9.6132	9.7962	0.6079
P13645	KRT10	9.7366	9.4101	0.3606
P02533	KRT14	9.4669	9.4327	0.9258
P35908	KRT2	9.7024	9.1729	0.3131
P13647	KRT5	8.6522	8.3112	0.1431
P02538	KRT6A	9.3070	8.9683	0.3593

Valores de intensidade \log_2 (média) de cada grupo de sEV;

Apesar de não termos encontrado contaminantes como resíduos celulares nos preparados de sEV pela técnica de *western blotting*, detectamos a presença das apolipoproteínas APO1, APO2 e albumina nos preparados de sEV (Tabela 6).

Tabela 6: Marcadores não comuns em sEV

Proteínas (IDs)	Símbolo oficial do gene	sEV-Hut78	sEV-M2059	Valor de p
P02768	ALB	14.5385	14.5813	0.7105
P02647	APOA1	11.8052	11.8406	0.8456
P02652	APOA2	12.5285	12.9510	0.0101
P02654	APOC1	11.9461	12.4724	0.0370
P02655	APOC2	12.3215	11.9390	0.2071
P02656	APOC3	14.9018	13.5830	0.0554

Valores de intensidade \log_2 (média) de cada grupo de sEV.

Esses componentes não são conhecidos ser componentes de EVs e provavelmente são derivados do meio de cultura utilizado para obtenção de nanovesículas.

5.6 Captação e incorporação das nanovesículas por queratinócitos imortalizados

O passo seguinte foi avaliar se as sEV possuem relação com a patogênese da doença na pele no LCCT. Assim, foi analisado se as sEV são captadas e internalizadas por células epiteliais em ensaios de co-cultivo. Para tal, o primeiro passo foi marcar as sEV com agente fluorogênico.

5.6.1 Marcação de nanovesículas e verificação por citometria de fluxo

Considerando que não há marcadores exclusivos de sEV, adotamos a estratégia de marcar as sEV com reagentes que se ligam a componentes genéricos carregados por sEV, como RNA ou proteínas. O corante não fluorescente diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster (CFSE-DA) difunde-se passivamente através das membranas celulares por conta dos grupos acetatos aderidos à molécula CFSE. Uma vez dentro do citosol, os grupos acetatos são clivados pelas esterases intracelulares e o corante clivado torna-se fluorescente (agora em sua forma CFSE). A remoção dos grupos acetatos reduz drasticamente a permeabilidade da membrana plasmática. O corante, fluorescente, no citosol liga-se covalentemente a porção amina de proteínas intracelulares através do seu grupo éster de succinimidilo (Parish 1999). Pelo fato de esterases também serem carregadas por sEV, o mesmo princípio se aplica a nanovesículas (Morales-Kastresana et al. 2017).

As sEV-Myla 2059 foram incubadas com CFSE, com anticorpos anti-anexina e anti-CLA (antígeno de linfócitário cutâneo). As proteínas anexinas atuam na fusão e transporte de membranas intracelulares, são enriquecidas em nanovesículas e frequentemente utilizadas como marcadores de sEV (Osteikoetxea et al. 2015). A avaliação da expressão de CLA foi realizada na linhagem Myla 2059, pois expressam esse marcador em sua membrana plasmática.

O excesso de CFSE e anticorpos foi removido com cromatografia de exclusão de tamanho e ultrafiltração, conforme descrito anteriormente (Morales-Kastresana et al. 2017). Devido ao tamanho das sEV não ser detectável por citometria convencional, as sEV foram acopladas a *beads* (esferas) de látex de tamanho 3.8 μm . Como controles negativos do ensaio, utilizamos sEV sem marcação e o pool de anticorpos e CFSE sem as sEV. Todas as amostras foram processadas da mesma maneira, inclusive durante as etapas de lavagem por SEC e UF, e incubadas com as *beads*

para posterior aquisição em citômetro de fluxo, Figura 16. A estratégia de análise está ilustrada na Figura 16A.

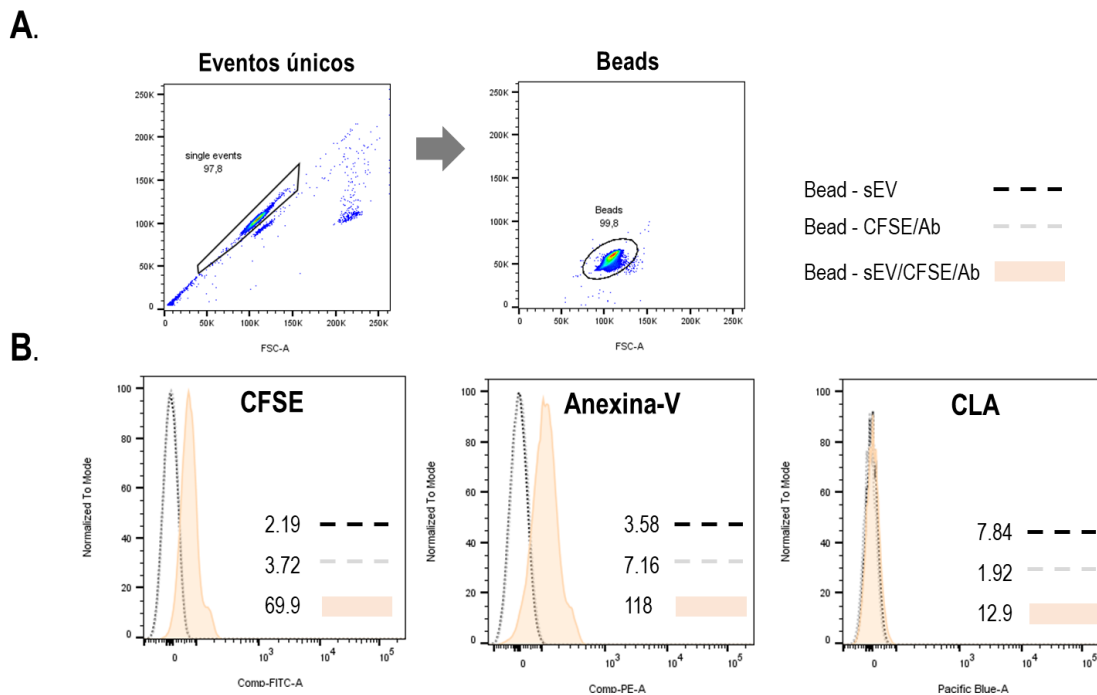


Figura 16. sEV-Myla 2059 marcadas com CFSE, Anexina-V e CLA e avaliadas por citometria de fluxo.

Os preparados de sEV-Myla 2059 foram marcados com CFSE, Anexina-V e CLA simultaneamente, e lavados por SEC e UF para remoção do excesso de CFSE e anticorpos. Como controles do ensaio foi utilizado sEV sem a incubação dos reagentes de marcação e os reagentes de marcação sem sEV. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de lavagem e posteriormente incubadas com beads para análise por citometria de fluxo. (A) estratégia de análise; (B) Amostra sEV e controles em histograma para cada fluorescência avaliada. Histograma de cor preta com linha tracejada representa o controle negativo do ensaio sEV sem marcação acoplada as beads, o histograma de cor cinza com linha tracejada representa os reagentes utilizados para marcação (CFSE e anticorpos) sem a presença de sEV e o histograma preenchido de cor laranja representa a amostra sEV devidamente marcada. A mediana da intensidade de fluorescência (MFI) encontra-se escrita ao lado dos histogramas.

A Figura 16B mostra a intensidade de fluorescência de cada marcador em forma de histograma, que incluem sEV marcadas com CFSE e o pool de anticorpos (Bead – sEV/CFSE/Ab), sEV sem marcação (Bead – sEV) e, os marcadores CFSE e pool de anticorpos (Bead – CFSE/Ab), como controle de remoção do excesso de reagente pelos processos de lavagens. Confirmamos a marcação de CFSE e Anexina-V na amostra com sEV (Figura 16B), os valores de MFI encontram-se descritos na figura. Em ambos os casos não foi observada fluorescência nos controles negativos, sugerindo a completa remoção do excesso de reagente pelo protocolo de lavagem. A expressão de CLA não foi detectada na amostra sEV.

A membrana que delimita as nanovesículas são compostas pela mesma bicamada lipídica da membrana plasmática das células que as derivam. Dessa forma, por conta da composição lipídica, as membranas plasmáticas são suscetíveis a lise induzida por detergentes enquanto que contaminantes proteicos não vesiculados podem permanecer praticamente inalterados (Osteikoetxea et al. 2015, Tian et al. 2020). Para então averiguar a presença de contaminantes no preparado de sEV utilizamos diferentes tratamentos a base de detergentes nas amostras sEV previamente marcadas com CFSE e anexina-V, Figura 17.

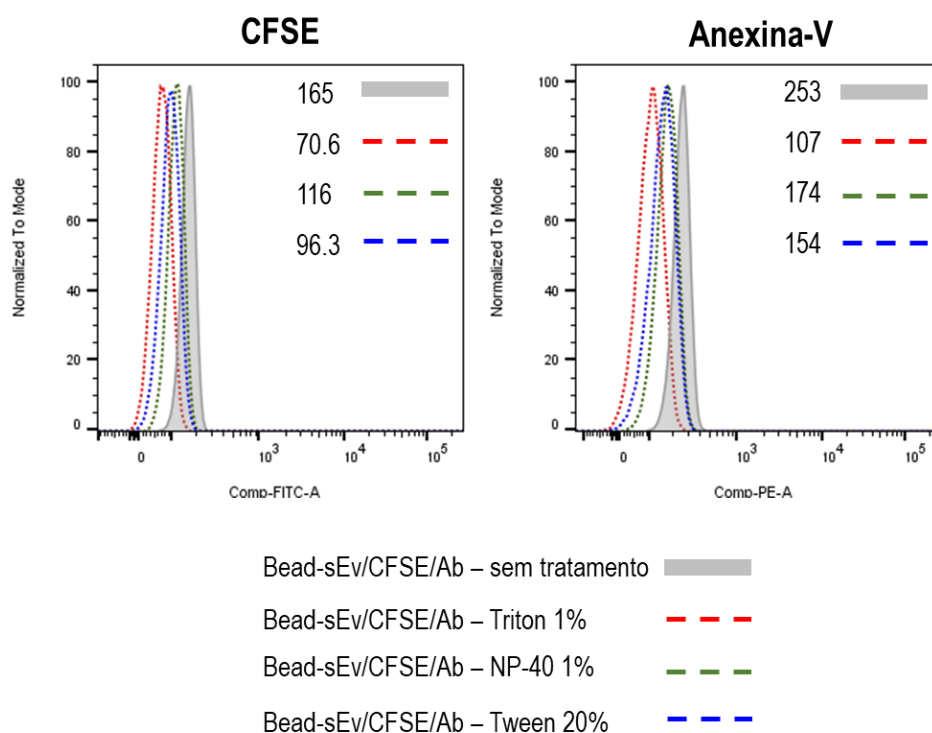


Figura 17. sEV-Myla 2059 marcadas com CFSE e Anexina-V após tratamento à base de diferentes detergentes. Os preparados de sEV-Myla 2059 foram marcados com CFSE e anexina-V e acoplados a beads. Em seguida, as amostras foram tratadas com diferentes soluções à base de detergentes por 60 minutos a temperatura ambiente e imediatamente avaliadas no citômetro de fluxo. A intensidade de fluorescência é ilustrada em histograma com a MFI descrita na imagem. Os diferentes tratamentos estão representados por tracejados coloridos com identificação na legenda. O histograma preenchido de cinza claro corresponde a amostra não tratada.

O deslocamento do histograma após o tratamento com detergentes é visível para ambas marcações CFSE e anexina-V. Nota-se também a redução da MFI, em 57% após o tratamento com Triton para ambos os parâmetros analisados, em 29% para CFSE e 31% para anexina-V após o tratamento à base de NP-40 e 41% para CFSE e 39% para anexina-v após o tratamento à base de *Tween*. O tratamento à base de detergentes indica que o sinal positivo de CFSE e anexina-V é proveniente de material vesiculado e não de agregados extracelulares.

5.7 Avaliação da captação das nanovesículas por citometria de fluxo convencional e por citometria de fluxo por imagem

Para avaliar se as sEV são capturadas e internalizadas por células epiteliais, queratinócitos imortalizados da linhagem HaCaT foram incubados por 24 h com diferentes quantidades de sEV-Myla 2059 marcadas com CFSE, fixados e avaliados, por citometria de fluxo e de imagem, quanto à captação e absorção das sEV.

A citometria de fluxo de imagem multiespectral (IFC) é uma técnica que incorpora aspectos visuais e espaciais que a microscopia oferece com a análise precisa das intensidades de sinal fluorescente característica da citometria de fluxo. Dessa forma, a detecção de fluorescência é combinada com imagens de alta resolução espacial em nível celular individual (Phanse et al. 2012), característica interessante no estudo de captação de vesículas.

Como na citometria de fluxo convencional, é necessário delimitar bem a população de interesse a ser analisada (Figura 18). Primeiramente determinamos a seleção de células únicas para excluir agregados celulares, debris e *doublets* da análise. Esse primeiro *gate* foi desenhado com base na análise da circularidade dos eventos totais adquiridos, produzida pela combinação dos parâmetros *brightfield area* x *brightfield aspect ratio*. Células únicas adquiridas normalmente tem *aspect ratio* próximo de 1, enquanto agregados celulares tem *aspect ratio* igual ou menor que 0.5. Os limites da área selecionada foram determinados por checagem e visualização individual dos eventos (ilustrado ao lado do gate, Figura 18A). Em seguida, selecionamos as células em foco a partir do histograma do *brightfield gradient RMS*, também com checagem visual individual dos eventos. O parâmetro *brightfield gradient RMS* representa a nitidez da imagem que, de maneira geral, exibem altos valores de pixels e, conseqüentemente, maior *brightfield gradient RMS*. Por fim, selecionamos os queratinócitos HaCaT que incorporaram o fluoróforo CFSE combinando detecção da intensidade do CFSE x Max. Pixel do CFSE, Figura 18B. Para a delimitação da área dessa população nos baseamos também na amostra de controle negativo, células HaCaT tratadas com CFSE “lavado” sem as nanovesículas.

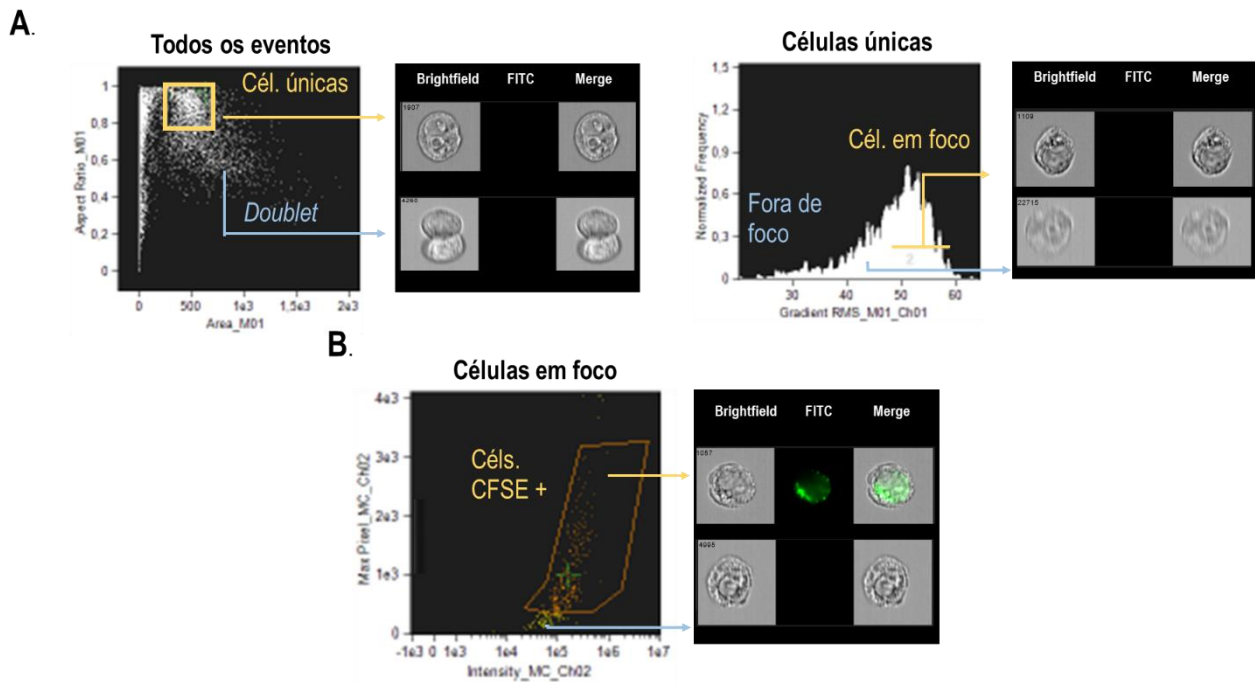


Figura 18. Estratégia de análise por citometria de fluxo de imagem (IFC). Células HaCaT foram tratadas com sEV-Myla 2059 previamente marcados com CFSE e analisadas por citometria de fluxo de imagem. A morfologia celular foi avaliada pelo canal 1 (Ch-1, 425-480nm, *brightfield*), a detecção da fluorescência emitida pelo CFSE foi avaliada no canal 2 (Ch-2, 480-560nm, FITC) e as imagens foram sobrepostas (*merge*). Para definir a população de interesse, agregados celulares, *doublets* e *debris* celulares foram separados de células adquiridas como únicos eventos pela avaliação da combinação dos parâmetros *area* x *aspect ratio*, ambos do Ch01. Em seguida, as células em foco foram selecionadas a partir do *gradient RMS* também do Ch01, em forma de histograma (A). Com a população de interesse estabelecida, avaliamos células positivas para a fluorescência CFSE por meio do gate de intensidade de fluorescência do Ch02 x Max. Pixel Ch02 (B).

A estratégia de análise adotada na análise por citometria de fluxo convencional foi seleção das células únicas, exclusão das células mortas, seleção das células HaCaT e, por fim, posicionamento de *gate* em células HaCaT-CFSE+ para avaliação percentual, Figura 19. O MFI de HaCaT-CFSE(+) foi calculado no *gate* de células HaCaT.

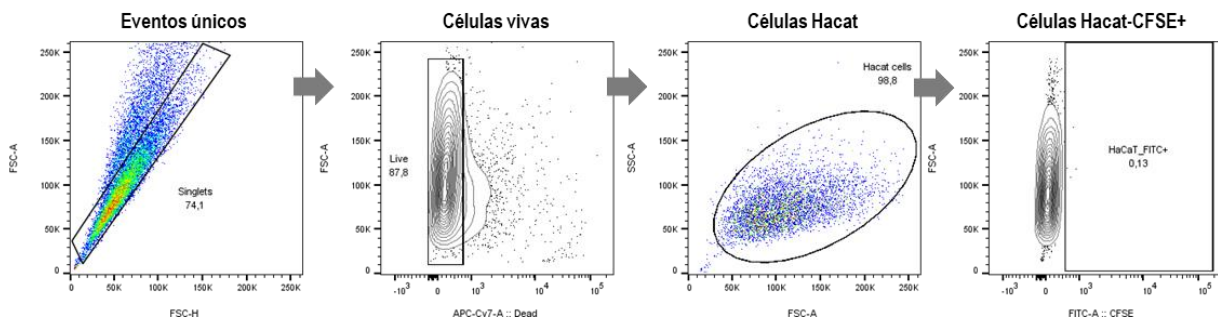


Figura 19. Estratégia de análise por citometria de fluxo (FACS). Células HaCaT foram tratadas com sEV-Myla 2059 previamente marcados com CFSE e analisadas por citometria de fluxo. Para a análise foi feita a seleção de células únicas, exclusão das células mortas, exclusão de debris celular e por fim, avaliação da fluorescência FITC.

Detectamos sinal de fluorescência emitido pelo CFSE em células HaCaT incubadas com sEV–CFSE, o que evidencia captação e absorção das nanovesículas. O ensaio de tratamento de células HaCaT com diferentes quantidades de sEV apontam que a captação é dose dependente, conforme ilustrado pelo percentual de células HaCaT-CFSE+ e também pelo MFI (Figura 20A). Resultados similares foram obtidos dos ensaios de IFC (Figura 20B). Não observamos alteração na viabilidade celular entre as diferentes doses de tratamento, avaliada por citometria de fluxo (dado não mostrado).

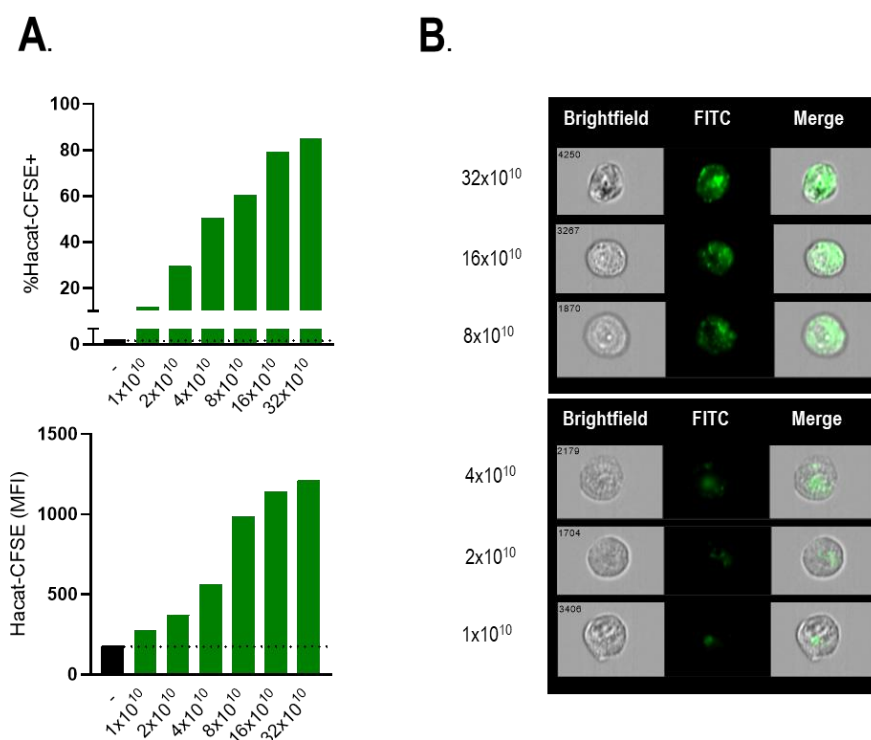


Figura 20. Avaliação da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT por citometria de fluxo e citometria de imagem. Células HaCaT foram tratadas com diferentes quantidades de sEV-Myla 2059 previamente marcadas com CFSE por 24 h e analisadas por citometria de fluxo e de imagem. O percentual de células HaCaT-CFSE e a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) de CFSE foi gerada por FACS (A) e imagens representativas foram obtidas por citometria de fluxo de imagem (B). O gráfico em barra ilustra a mediana. A linha tracejada indica o controle negativo (CFSE sem sEV).

Nanovesículas interagem e são absorvidas pelas células de várias maneiras, como endocitose mediada por receptor, fagocitose, micropinocitose ou fusão direta com a membrana plasmática, processos dependentes ou não de energia celular (Ginini et al. 2022). Para investigar se a via de captação é via fusão direta com a membrana plasmática ou via endocitose, processo ativo dependente de energia, repetimos o tratamento das células HaCaT com sEV com incubação em baixas temperaturas (4°C) com o intuito de atenuar a atividade celular das células HaCaT (Figura 21 e Figura 22).

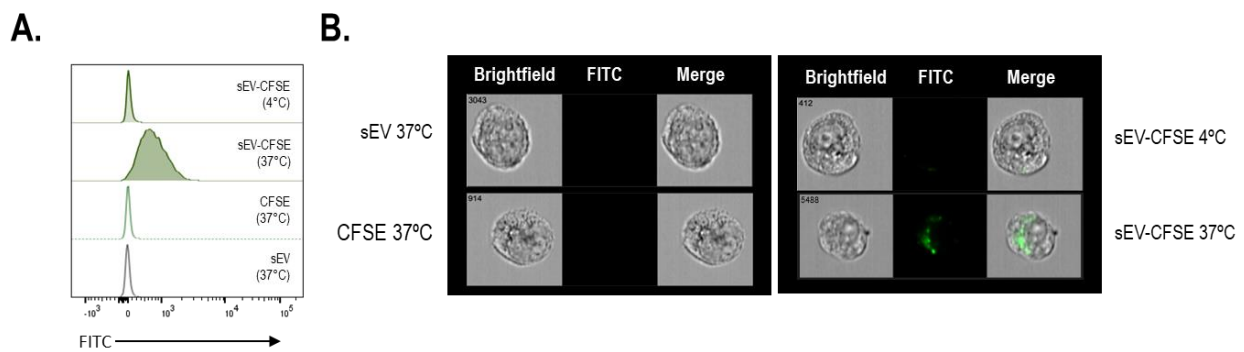


Figura 21. Resultados ilustrativos da inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas. Células HaCaT foram tratadas sEV-Myla 2059 previamente marcados com CFSE por 3 h a 37°C ou 4°C e analisadas por citometria de fluxo e de imagem. (A) Intensidade de fluorescência de CFSE em células HaCaT representado por histograma. (B) Imagens de células HaCaT tratadas com sEV a 37°C ou 4°C e dos os controles do ensaio, tratamento com sEV sem marcação e tratamento com CFSE “lavado”. O tratamento encontra-se ao lado das imagens.

Observamos que nos grupos tratados a 37°C 46% das células HaCaT foram FITC (+), enquanto que os grupos tratados a 4°C o percentual de células HaCaT FITC (+) foi de 0.1%, Figura 22. Os dados de MFI coincidem com os achados percentuais, sendo a mediana de 394 e 121 referente aos grupos tratados a 37°C ou a 4°C, respectivamente.

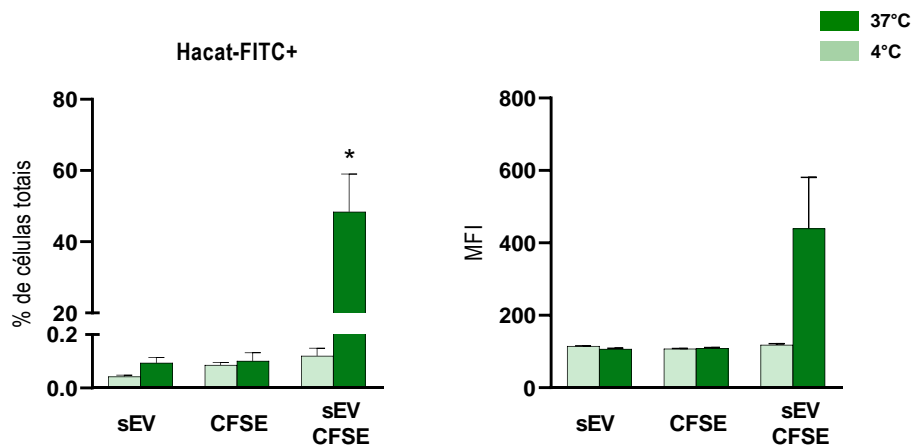


Figura 22. Inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas. Células HaCaT foram tratadas com 1×10^{10} de sEV-Myla 2059 marcados com CFSE, sEV sem marcação ou apenas o CFSE por 3h a 37°C ou 4°C e analisadas por citometria de fluxo. Valores absolutos do percentual e de MFI dos ensaios representados em gráficos de barra. As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. * = $p > 0.05$.

Apesar dos valores brutos de MFI não serem estatisticamente significantes, a razão entre o MFI da amostra sEV marcada com CFSE (sEV CFSE) e a amostra controle da remoção de excesso de CFSE durante a marcação das sEV (CFSE), na incubação a 37°C foi de 3.7 e 1.1 na

incubação a 4°C (Figura 23). A razão dos valores percentuais de células HaCaT foi similar, sendo 526 maior que seu controle negativo a 37°C enquanto que apenas 1.2 com o ensaio a 4° C (Figura 23).

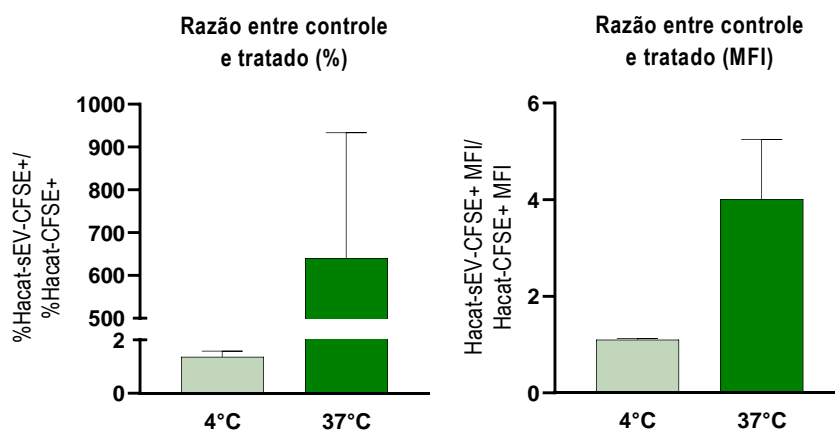


Figura 23. Inibição da captação de sEV-Myla 2059 por células HaCaT a baixas temperaturas. Células HaCaT foram tratadas sEV-Myla 2059 previamente marcadas com CFSE ou apenas o CFSE por 3h a 37°C ou 4°C e analisadas por citometria de fluxo. Valores relativos à amostra controle do percentual e de MFI representados em gráficos de barra. As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes.

Em conjunto, os resultados mostram que as células HaCaT captam e absorvem as sEV-Myla 2059 via processo ativo dependente de energia, compatível com o processo de endocitose.

5.8 Avaliação da incorporação das nanovesículas por microscopia confocal

Apesar das evidências de captação pelas células HaCaT, é possível que as sEV estejam aderidas ao lado externo na membrana plasmática. As imagens obtidas por IFC mostradas na seção anterior são projeções 2D, sem a perspectiva de profundidade da célula. Assim não permitem visualizar se a localização das nanovesículas encontra-se no citosol celular, o que indicaria internalização das vesículas, ou se apenas encontram-se depositadas na superfície celular do lado externo. Portanto, optamos por analisar em microscopia de fluorescência confocal.

Para tal, células HaCaT foram tratadas com sEV previamente marcadas com CellTrace™ Violet, reagente fluorescente com especificidade para proteínas. Para possibilitar a visualização da membrana plasmática das células HaCaT por microscopia, as células foram marcadas com lectinas fluorescentes (*Wheat Germ Agglutinin Texas Red™-X Conjugate* – WGA). Como controle do ensaio as células HaCaT foram tratadas também com sEV sem marcação prévia (HaCaT + sEV) ou com o reagente CellTrace Violet sem a presença das sEV (HaCaT + PBS-BV421). As amostras de controle foram submetidas ao mesmo processo de lavagem por SEC e UF, conforme descrito nas seções anteriores.

A Figura 24 mostra a co-localização das sEV com as células HaCaT cultivadas com amostra sEV-BV421, imagens ampliadas na Figura 25, com setas que destacam a localização das sEV.

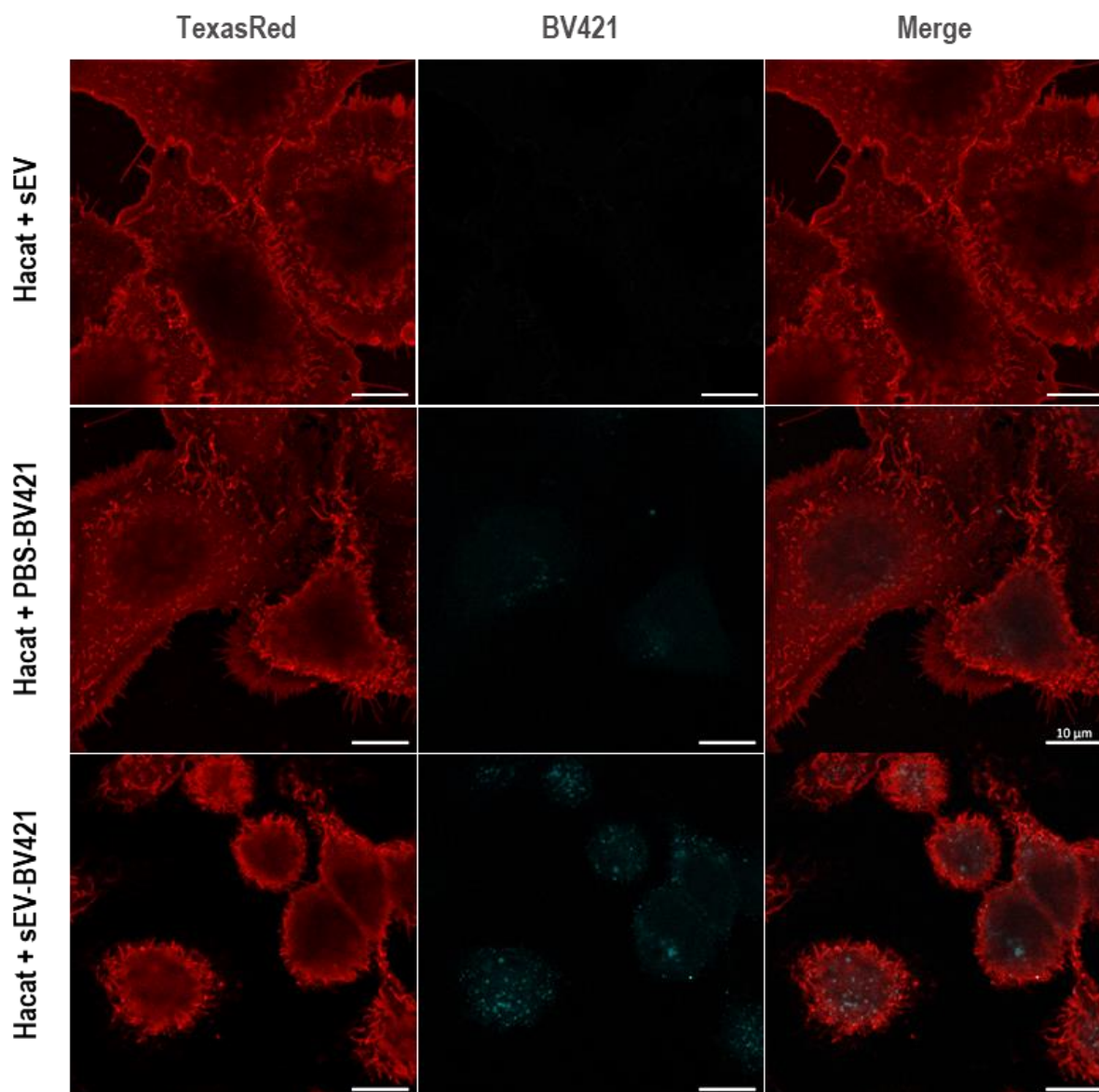


Figura 24. Queratinócitos imortalizados captam nanovesículas *in vitro*. Queratinócitos imortalizados (HaCaT) foram tratados com sEV previamente marcadas com CellTrace™ Violet por 4h, fixados e marcados com WGA Texas Red™ processados para análise por microscopia de fluorescência. sEV sem marcação foi utilizado como controle negativo do ensaio e PBS-BV421 como controle de lavagem das sEV. Imagens representativas de três experimentos realizados. As barras de escala representam 10μm. Aquisição em objetiva 63x com óleo de imersão. Células HaCaT estão representadas em vermelho e sEV em azul.

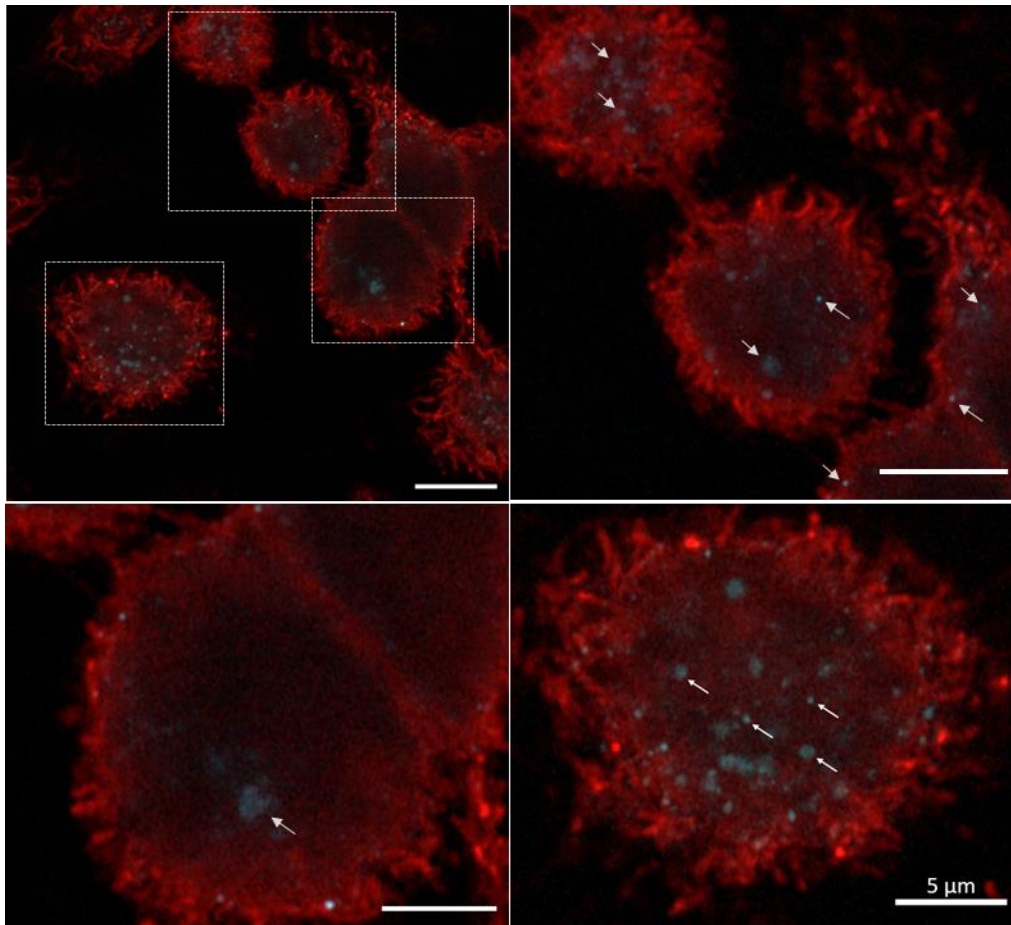


Figura 25. Áreas de co-localização de nanovesículas e queratinócitos ampliadas. Queratinócitos imortalizados HaCaT foram tratados com sEV previamente marcadas com CellTrace™ Violet por 4h, fixados e marcados com WGA para análise de microscopia de fluorescência. Na imagem superior à esquerda células HaCaT que apresentam co-localização com sEV estão destacadas. As áreas em destaque estão ampliadas nas imagens seguintes com setas indicando as nanovesículas. As barras de escala representam 5μm.

Os valores de MFI confirmam a captação e retenção das sEV pelas células HaCaT, Figura 26. Apesar de sinal positivo sutil para o marcador de sEV na amostra do controle negativo PBS-BV421 (Figura 24), o processo de remoção do excesso do marcador das sEV se mostrou eficiente de acordo com os valores de MFI obtido das imagens de microscopia, Figura 26, entre as amostras sEV e PBS-BV421 (medianas: 14 e 16, respectivamente).

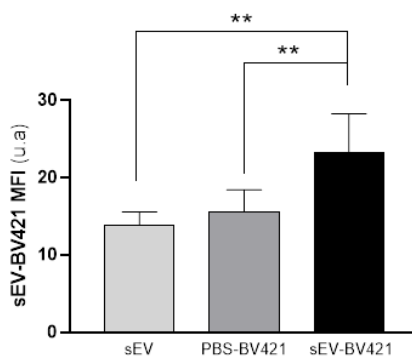
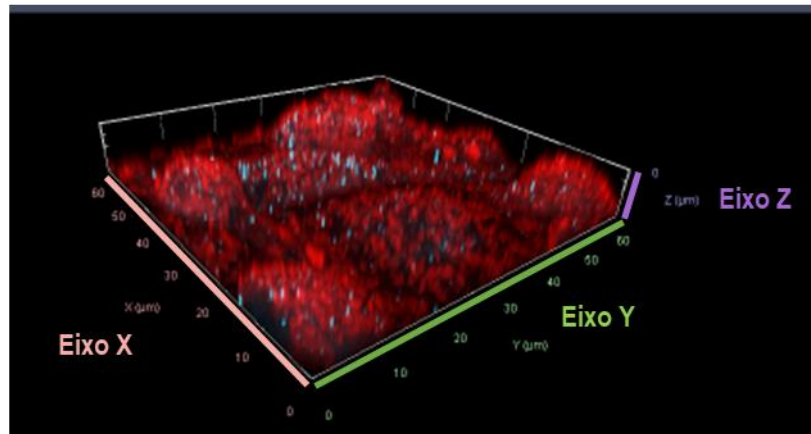


Figura 26. Intensidade mediana de fluorescência das imagens obtidas por microscopia confocal. Representação gráfica da intensidade mediana de fluorescência (MFI) de BV-421/CellTrace Violet foi calculada em capturas de imagens (n=3-20) com o software Zen 3 Blue Edition V. 3.5. e apresentados em gráfico de barra com representação da mediana. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$; u.a = unidade arbitrária.

Assim, o sinal detectado pelos sensores BV-421 na amostra sEV-BV421 é derivado de nanovesículas e não de marcador em excesso não removido.

Após a identificação de áreas de co-localização das sEV com células HaCaT, investigamos se havia de fato a internalização por microscopia confocal, técnica que permite a construção de projeção tridimensional da imagem. Para a captação das imagens com o parâmetro de profundidade em relação à base da lâmina, delimita-se o ponto mínimo (superfície imersa no óleo) e máximo (superfície aderida a lâmina) do eixo Z e a quantidade de capturas desejadas nesse intervalo. Após selecionarmos a área de interesse, estipulamos 65 capturas na resolução máxima. O empilhamento das imagens obtidas com variações no eixo z (do inglês “z-stack”) permite a construção da projeção tridimensional ilustrada na Figura 27A. Análise Z-stack possibilita a visualização espacial da nanovesícula em destaque em relação à membrana plasmática da célula HaCaT, para cada sEV, conforme ilustrado na Figura 27B. A avaliação por microscopia confocal mostra a incorporação das sEV pelas células HaCaT, Figura 28.

A.



B.

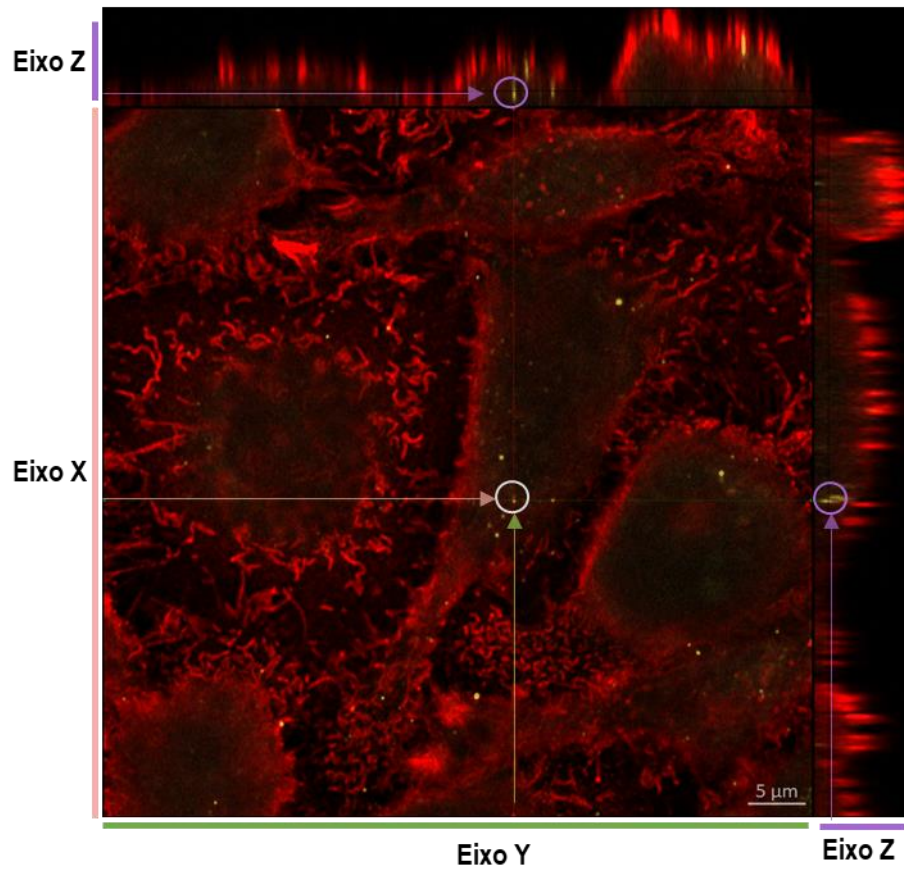


Figura 27. Ilustração da análise de reconstrução tridimensional em queratinócitos tratados com nanovesículas. Queratinócitos imortalizados HaCaT foram tratados com sEV marcadas e analisados por microscopia confocal de fluorescência. Imagens foram captadas na opção Z-stacking para análise espacial tridimensional. (A) Projeção tridimensional criada a partir da reconstrução do empilhamento de imagens captadas em série (65 camadas) em área pré-determinada nos eixos XY, mas com variações no eixo Z. As sEV estão representadas na cor azul e a membrana plasmática das células HaCaT na cor vermelha. (B) sEV co-localizada com célula HaCaT estão em destaque com círculo de cor clara, e sua representação espacial em relação à membrana plasmática da célula HaCaT no eixo Z encontra-se demarcada com círculo de cor violeta. A barra de escala representa 5 μm.

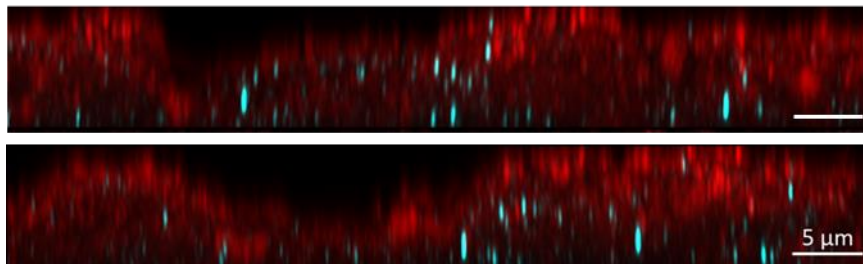


Figura 28. Nanovesículas incorporadas por queratinócitos imortalizados. Queratinócitos imortalizados HaCaT foram tratados com sEV previamente marcadas e analisados por microscopia confocal de fluorescência. Imagens foram captadas na opção Z-stacking para análise espacial tridimensional. Projeções criadas a partir da reconstrução do empilhamento de imagens capturas em série (65 camadas) em áreas de co-localização de sEV e células HaCaT. sEV estão representadas na cor azul e a membrana plasmática das células HaCaT na cor vermelha. A barra de escala representa 5 μ m.

A captação e incorporação das sEV derivadas de linhagens tumorais LCCT por células HaCaT foi caracterizada e evidenciada por citometria convencional, de imagem e microscopia de fluorescência confocal.

5.9 Transferência de RNA vesiculado para queratinócitos imortalizados

Os ensaios até o momento evidenciam a captação, *in vitro*, de nanovesículas por células epiteliais através da marcação de conteúdo proteico vesiculado. Porém, além dos componentes proteicos, diversos estudos evidenciam a importância de ácidos nucleicos transportados por sEV, principalmente fragmentos curtos reguladores, os microRNAs (Wu et al. 2022, Zhao et al. 2022). No linfoma LCCT, o perfil de expressão de microRNAs tem sido extensivamente estudado e um grande número de artigos relatam um padrão de expressão desregulado (Matsuda et al. 2022, Wen, Xie and Wang 2021, Di Raimondo et al. 2021, Han et al. 2022, Moyal et al. 2021, Gluud et al. 2021, Gluud et al. 2020, Lindahl et al. 2016). Assim, diante da importância de microRNAs na patogênese do LCCT, nos questionamos se os microRNAs transportados pelas nanovesículas LCCT eram absorvidos e transferidos para as células HaCaT. Para tal, avaliamos a captação de RNA vesiculado por sEV-Myla 2059 por células HaCaT com sEV previamente marcadas com RNAsyto, reagente permeável à membrana plasmática que cora seletivamente RNA.

Em acordo com os ensaios anteriores, a detecção do sinal de fluorescência em células HaCaT tratadas com sEV indicam a captação e absorção de RNA vesiculado, Figura 29, de forma dependente de temperatura. A mediana de células HaCaT-FITC+ foi de 95% no tratamento a 37°C em comparação a 0.5% de células HaCaT-FITC+ a 4°C nas células HaCaT tratadas com amostra

(sEV RNAsyto), Figura 29C. O mesmo ocorreu com os valores de MFI, sendo 2060 para o tratamento a 37°C e 139 quando conduzido a 4°C.

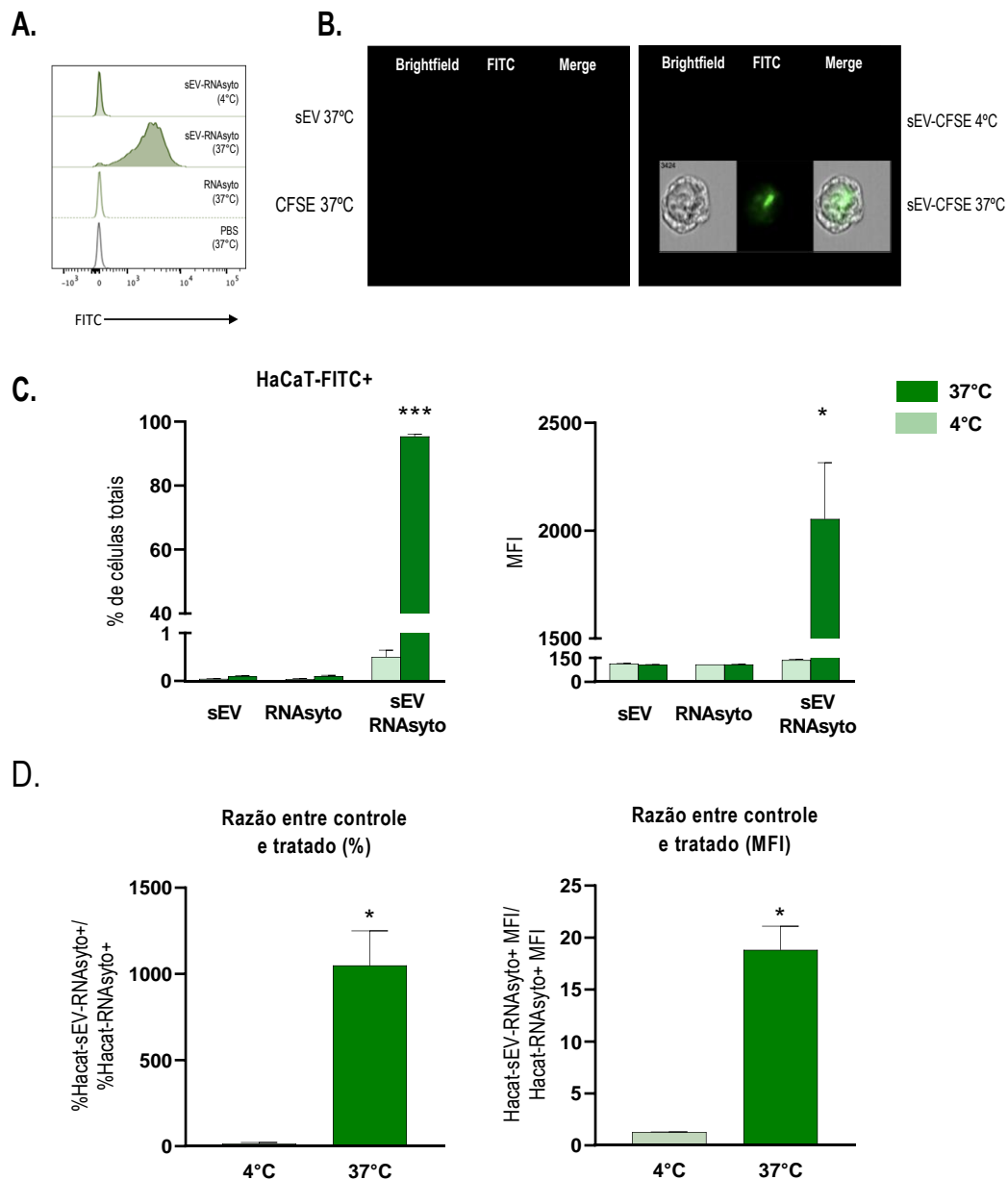


Figura 29. Captação de RNA vesiculado por queratinócitos é dependente da temperatura. Células HaCaT foram tratadas sEV-Myla 2059 previamente marcados com RNAsyto, sEV sem marcação ou apenas o RNAsyto por 3h a 37°C ou 4°C e analisadas por citometria de fluxo (FACS, A) e de imagem (IFC, B). (C) Valores absolutos do percentual e de MFI dos ensaios. (D) Valores, de percentual e de MFI, relativos à amostra controle. As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ entre o mesmo tratamento conduzido a 37°C ou 4°C.

Os controles do ensaio, amostras sEV sem marcação e RNAsyto marcação sem amostra sEV, evidenciaram a especificidade do sinal positivo à amostra sEV marcada, sEV-RNAsyto. A inibição da captação por baixas temperaturas é evidenciada pela razão entre controle e tratado

dos valores de MFI (mediana: 18 para o tratamento a 37°C *versus* 1.2 para 4°C) e percentual (mediana: 1075 para o tratamento a 37°C *versus* 17 para 4°C) de células HaCaT-FITC+, Figura 29D.

Com a intenção de avaliar se microRNAs (miRs) vesiculados são transferidos para células HaCaT, verificamos a expressão de quatro diferentes miRs nas sEV e em células HaCaT após o tratamento de sEV por RT-qPCR. Selecionamos os miRs 155 e 21 ambos conhecidos pelo envolvimento na patogênese de LCCT (Moyal et al. 2021, Moyal et al. 2017, Kopp et al. 2013a, Kopp et al. 2013b) e os miRs 378 e let-7a até o momento sem relatos no LCCT, mas com envolvimento em outros cânceres. Posteriormente, confirmamos a expressão dos microRNAs nas amostras de sEV (Figura 30).

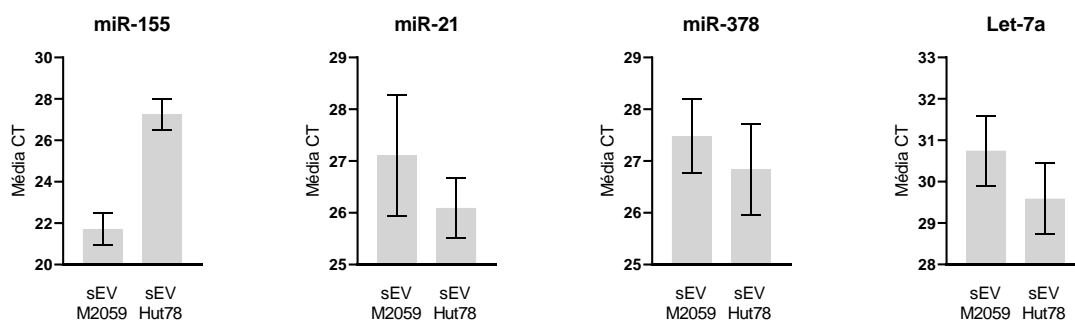


Figura 30. Expressão dos miR-155, miR-21, miR-378 e Let-7a em amostras de sEV-LCCT. A expressão de miRnas foi analisada por RT-qPCR nas sEV-Myla2059 e sEV-Hut78 (n=5). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. CT = tempo de ciclagem.

Para a normalização da expressão dos miRs nas células HaCaT optamos por dois genes internos: U6 e miR205. As células HaCaT foram tratadas com duas doses diferentes de sEV-Myla 2059 4×10^{10} e 8×10^{10} durante 4 h ou 24 h. Detectamos aumento da expressão do microRNA-155 em células HaCaT tratadas por 24 h com sEV-Myla 2059 (Figura 31A). O efeito é observado em ambas as análises (valores de mediana com os valores relativos a U6 foram: 1.93 e 1.40 para o tratamento de sEV 4×10^{10} e 8×10^{10} por 24h e valores de mediana com os valores relativos a miR-205: 1.16 e 2.00 para o tratamento de sEV 4×10^{10} e 8×10^{10} por 24h). Observamos aumento na expressão do microRNA-21 e do microRNA-378 no tratamento de 24h, Figura 31B e Figura 32A.

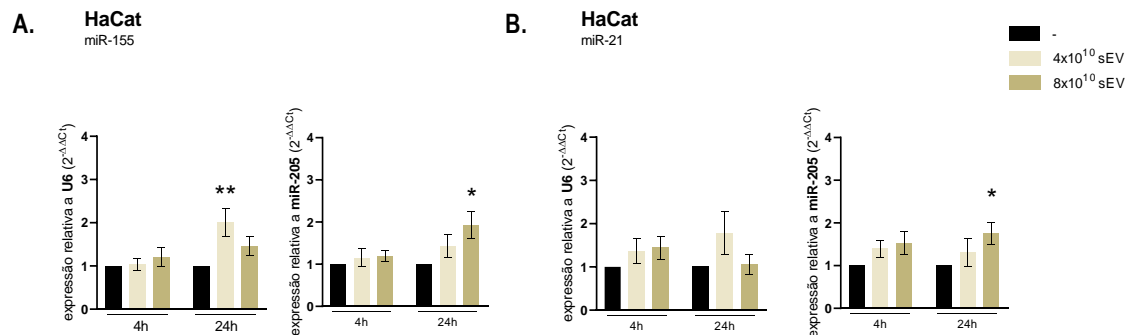


Figura 31. Expressão de miR-155 e miR-21 em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão dos miR-155 (A) e miR-21 (B) foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 por 4 h ou 24 h (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ quando comparado com o controle sem tratamento.

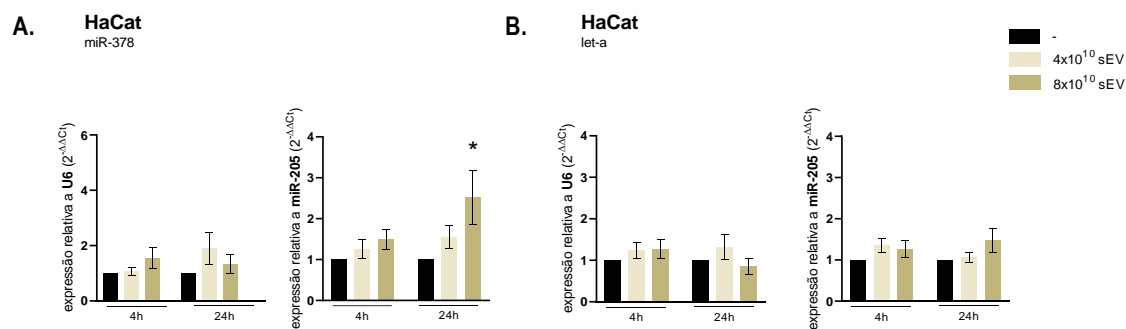


Figura 32. Expressão de miR-378 e let-a em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão dos miR-378 (A) e let-a (B) foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 por 4 h ou 24 h (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes. * $p < 0.05$ quando comparado com o controle sem tratamento.

5.10 Efeito das nanovesículas em células epiteliais

A epiderme fornece uma barreira física importante contra agressões externas. Há diversas evidências da expressão alterada de marcadores relacionados a integridade da barreira cutânea no LCCT (Nickoloff and Griffiths 1990, Fried and Cerroni 2012, Thode et al. 2015). Desta forma, nos propusemos a averiguar se as sEV derivadas das linhagens LCCT podem contribuir com algum dano na barreira cutânea. Para tal, avaliamos a expressão de transcritos de moléculas

envolvidas com a manutenção e integridade da barreira cutânea em células HaCaT tratadas com sEV-LCCT por RT-pPCR.

O tratamento com sEV-Myla 2059 foi capaz de diminuir a expressão de filagrina e loricina de células HaCaT, Figura 33. No caso da filagrina, a expressão foi regulada negativamente após tratamento de 4h (redução de 40% na mediana, para ambas as doses). A redução da expressão da loricrina foi de 78% e 81% nas incubações de 4h e 51% e 60% nas incubações de 24h, para as doses de 4 ou 8×10^{10} sEV, respectivamente. Assim, observamos que a regulação desses transcritos ocorre em período de 4h, com aparente recuperação na expressão da filagrina após 24h.

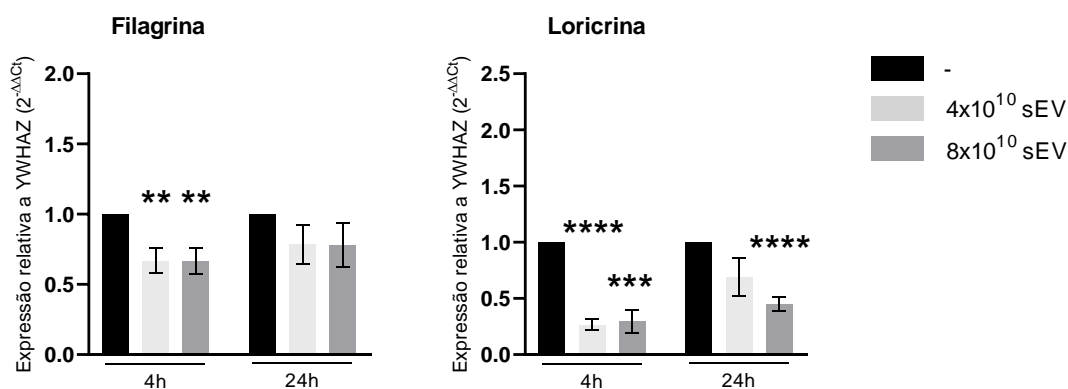


Figura 33. Expressão de filagrina e loricina em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão dos transcritos filagrina e loricina foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001 comparados com os grupos não tratados.

Devido ao papel das citoqueratinas (KRT) na estrutura da epiderme avaliamos o impacto das sEV na expressão das KRT 1, 5, 10 e 19, em células HaCaT tratadas com sEV Myla 2059, Figura 34. A incubação das HaCaT com as sEV foi capaz de diminuir a expressão das quatro KRT avaliadas. Contudo, o efeito das sEV na expressão das KRT foi mais tardio, com maior impacto no tratamento de 24h (redução de 89% e 95% para KRT1, 62% e 74% para KRT10, 28% e 34% para KRT5 e 31% e 63% para KRT19, nas doses 4 ou 8×10^{10} sEV respectivamente). Observamos também que o efeito foi dose dependente para as quatro KRT. Apesar da regulação negativa de diferentes proporções entre as KRT avaliadas, o efeito biológico foi consistente.

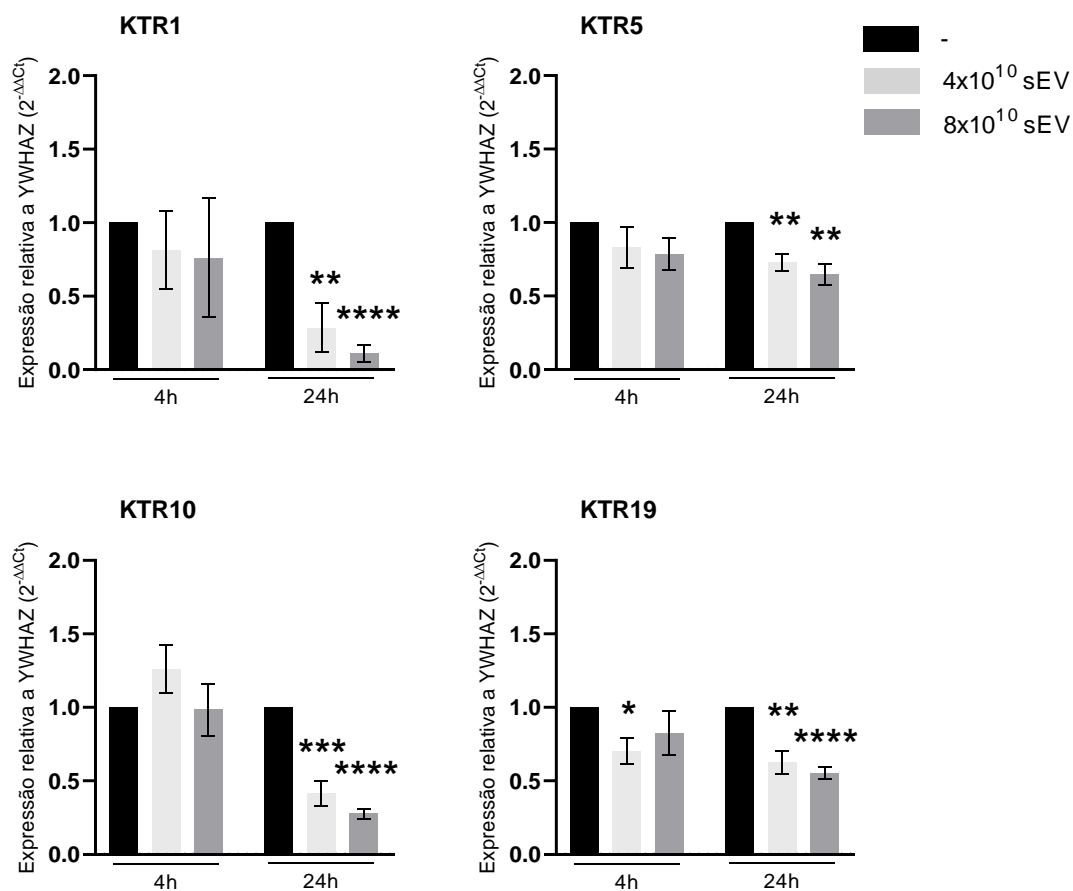


Figura 34. Expressão das citoqueratinas 1, 5, 10 e 19 em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão dos transcritos de KRT1, 5, 10 e 19 foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ entre os grupos tratados e não tratado;

Os queratinócitos da camada basal da epiderme estão unidos entre si por estruturas de adesão intercelulares, os desmossomos. Os desmossomos se unem aos filamentos de queratina e são subdivididas em duas subfamílias – as desmogleínas e as desmocolinas (Rivitti 2018, Murata et al. 2022). Avaliamos a expressão desses componentes dos desmossomos, a desmogleína-1 (DSG-1), a desmocolina-1 (DSC1) e desmocolina-3 (DSC3), Figura 35. Também incluímos na avaliação a expressão da claudina-1 (CLDN1), componente das junções de oclusão às estruturas de adesão intercelulares encontradas na epiderme.

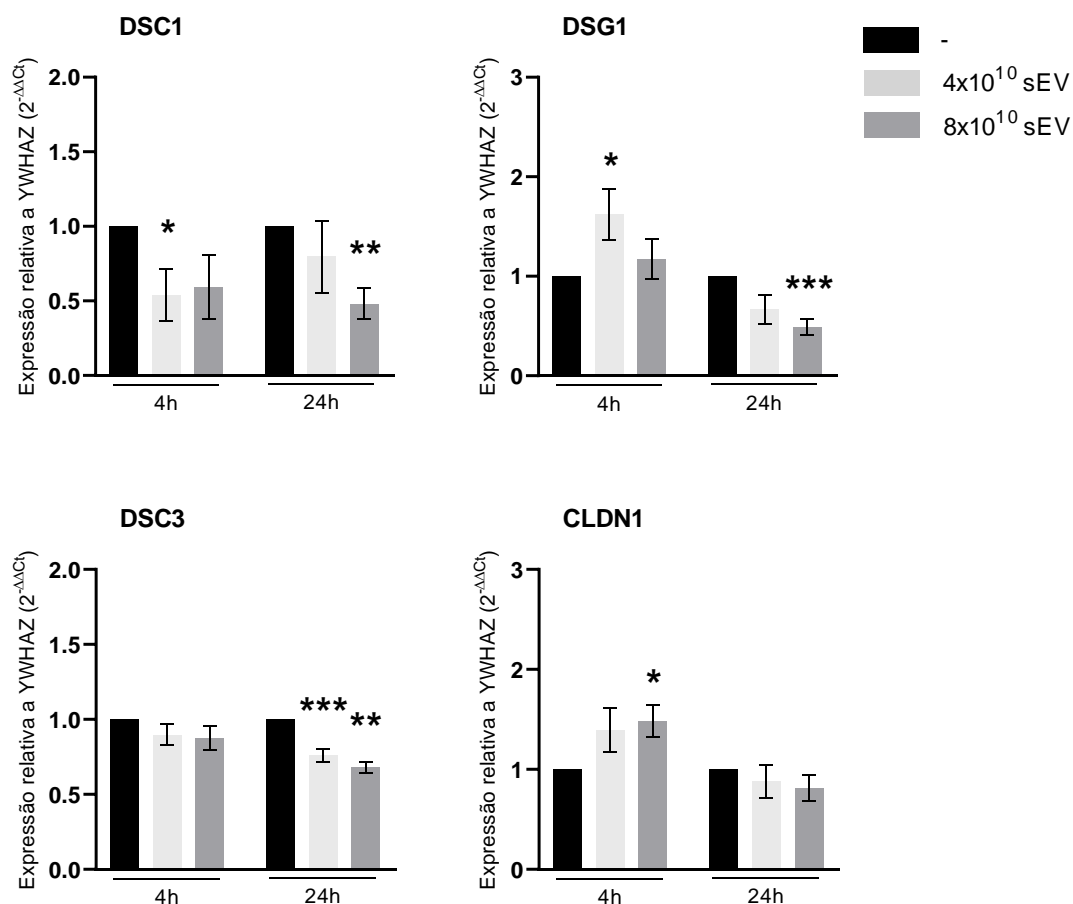


Figura 35. Expressão de componentes dos desmossomos e junções de oclusão em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão das desmogleína-1 (DSG-1), desmocolina-1 (DSC1), desmonolina-3 (DSC3) e claudina-1 (CLDN1) foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. * representa $p < 0.05$, ** representa $p < 0.01$, *** representa $p < 0.001$ e **** representa $p < 0.0001$ entre os grupos tratados e não tratado;

As sEV-Myla 2059 induziram regulação negativa na expressão da DSG1 (56%), DSC1 (53%) e DSC3 (29%) em células HaCaT com a dose de 8×10^{10} e na expressão de DSC3 (28%) também na dose de menor de sEV, de 4×10^{10} , nas incubações de 24h. Os valores em parênteses indicam a mediana do percentual de regulação negativa. É interessante observar que apesar da regulação negativa no DSG1 no tempo de incubação maior, identificamos regulação positiva (50%) na incubação de 4h. Ao contrário do observado nos componentes dos desmossomos, a expressão da CLDN1 foi induzida (regulação positiva de 25% e 36% para as doses de sEV de 4×10^{10} e 8×10^{10} , respectivamente) no tratamento de menor duração e se mostrou estável após 24 h do tratamento.

Além da manutenção da integridade da pele dos pacientes, outro fator de relevância na patogênese da doença é o processo de angiogênese. Com o intuito de investigar se as

nanovesículas derivadas de células tumorais influenciariam a produção do VEGF-A, fator relacionado a angiogênese em queratinócitos, avaliamos a expressão de VEGF-A em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059.

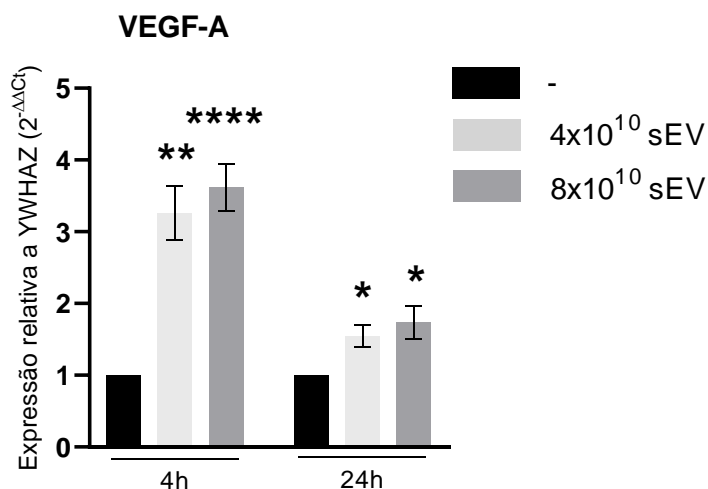


Figura 36. Expressão de VEGF-A em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8). As barras evidenciam média e desvio padrão dos grupos. Resultados obtidos a partir de três experimentos independentes. * representa $p < 0.05$, ** representa $p < 0.01$, *** representa $p < 0.001$ e **** representa $p < 0.0001$ entre os grupos tratados e não tratado;

Identificamos aumento no transcrito VEGF-A nas células HaCaT tratadas com sEV em todas as condições avaliadas (aumento de 360% e 380% nas incubações de 4h e 172% e 197% na incubação de 24h, respectivamente nas doses 4×10^{10} e 8×10^{10}).

Nos questionamos se a expressão dos transcritos avaliados estaria relacionada com a quantidade de nanovesículas captadas e internalizadas pelas células HaCaT. Para responder a essa questão investigamos se havia correlação entre os valores de expressão dos transcritos e a expressão dos miRNAs altamente expressos nas sEV, nos ensaios anteriores das células HaCaT tratadas com as nanovesículas.

De fato, em alguns casos, há correlação negativa entre a expressão do transcrito e dos miRNAs. É o caso da expressão da filagrina (FLG) ou da citoqueratina 10 (KRT10) com o miR-155 no tratamento de sEV com 8×10^{10} durante 24 h, Figura 37.

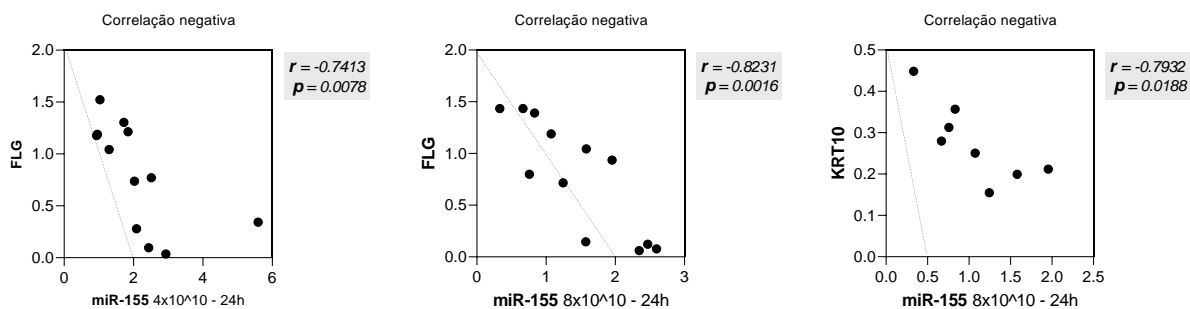


Figura 37. Correlação negativa entre a expressão dos transcritos FLG e KRT10 e o miR-155 em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão da filagrina (FLG), citoqueratina-10 (KRT10) e do miR-155 foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8-14). Os gráficos ilustram a correlação desses valores. Valor de p e de r baseado no teste estatístico de correlação paramétrica Pearson ou não paramétrica Spearman.

O mesmo fenômeno foi observado entre valores de expressão da FLG, KRT10 ou DSC3 em relação a expressão do miR-21, após o tratamento de 8x10¹⁰ sEV-Myla 2059 durante 24 h (Figura 38).

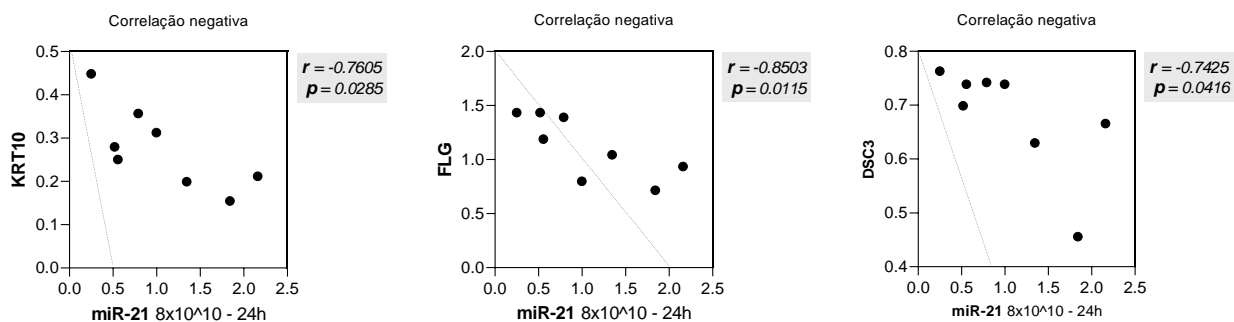


Figura 38. Correlação negativa entre a expressão dos transcritos KRT10, FLG e DSC3 e o miR-21 em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão da filagrina (FLG), citoqueratina-10 (KRT10), desmocolina-3 (DSC3) e do miR-21 foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8-14). Os gráficos ilustram a correlação desses valores. Valor de p e de r baseado no teste estatístico de correlação paramétrica Pearson ou não paramétrica Spearman.

Os dados também se relacionam de maneira positiva, como no caso da expressão de DSC1, FLG e LOR com a expressão do miR-155 após o tratamento de 8x10¹⁰ sEV-Myla 2059 durante 4h (Figura 38).

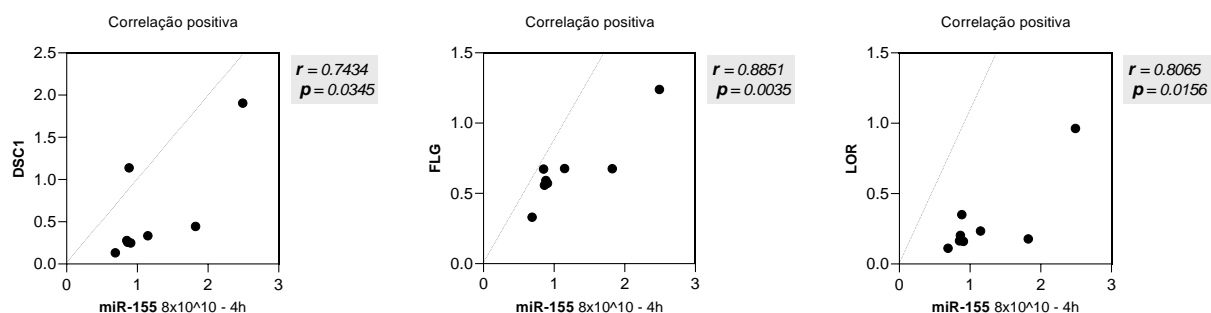


Figura 39. Correlação positiva entre a expressão dos transcritos DSC1, FLG e LOR e o miR-155 em células HaCaT tratadas com sEV. A expressão da filagrina (FLG), loricrina (LOR), desmocolina-1 (DSC1) e do miR-155 foi analisada por RT-qPCR em células HaCaT tratadas com sEV-Myla 2059 (n=8-14). Os gráficos ilustram a correlação desses valores. Valor de p e de r baseado no teste estatístico de correlação paramétrica Pearson ou não paramétrica Spearman.

O cálculo da correlação entre os valores de expressão de cada um dos transcritos e dos miRNAs estão descritos nas Tabelas 7 e 8. Observamos diversos casos com significância estatística (vermelho), entretanto é preciso analisar funcionalmente para avaliar a relevância biológica. A expressão de alguns transcritos, como a filagrina e a loricrina, correlacionaram-se com a expressão de miR-155 e miR-21 em quase todos os tratamentos testados, fato não observado na mesma magnitude com os outros transcritos. Ressaltamos que apesar de estatisticamente significantes ($p > 0.05$) a correlação não indica relação de casualidade.

Tabela 7: Correlação entre a expressão dos transcritos e dos miRs 155 e 21

miR	miR-155/U6				miR-21/U6			
	4h		24h		4h		24h	
Tempo	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰
sEV-M2059								
FLG	0.0013	0.0035	0.0078	0.0016	0.0032	0.0332	0.8820	0.0115
LOR	0.0087	0.0156	0.9512	0.7975	0.0020	0.0294	0.0205	0.3913
VEGF-A	0.5008	0.3874	0.1150	0.2035	0.3268	0.9909	0.0279	0.0209
DSC3	0.7406	0.3248	0.6667	0.0519	0.7432	0.3534	0.3777	0.0416
DSC1	0.2272	0.0345	0.3921	0.7815	0.0478	0.0205	0.2725	0.8797
DSG1	0.4365	0.929	0.5105	0.1786	0.6402	0.8205	0.5480	0.0842
CLDN1	0.6748	0.5211	0.4279	0.5098	0.3451	0.3525	0.7033	0.8256
KTR1	0.9418	0.7376	0.8196	0.3782	0.4640	0.8493	0.9099	0.7485
KTR5	0.9800	0.7723	0.2513	0.0921	0.6280	0.8851	0.7052	0.1033
KTR10	0.5778	0.3225	0.9526	0.0188	0.5565	0.3245	0.2275	0.0285
KTR19	0.5821	0.0962	0.7033	0.6823	0.5364	0.0576	0.5364	0.9069

Valores de $p < 0.05$ estão destacados na cor vermelha; Correlação de Pearson ou correlação de Spearman

Tabela 8: Correlação entre a expressão dos transcritos e os miRs 378 e let-7a

miR	miR-378/U6		miR-378/U6		Let-a7/U6		Let-a7/U6	
	4h		24h		4h		24h	
	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰	4x10 ¹⁰	8x10 ¹⁰
FLG	0.3518	0.0219	0.2675	0.0237	0.0675	0.1536	0.2220	0.0115
LOR	0.5745	0.0675	0.0103	0.4877	0.1923	0.1486	0.0011	0.018
VEGF-A	0.2162	0.5065	0.1323	0.2350	0.3894	0.5694	0.0084	0.0127
DSC3	0.5380	0.3938	0.3055	0.0740	0.0714	0.0574	0.6397	0.5886
DSC1	0.8348	0.0827	0.2772	0.9604	0.0055	0.0460	0.0921	0.1156
DSG1	0.9300	0.6605	0.4340	0.3935	0.6859	0.4011	0.4729	0.0102
CLDN1	0.8546	0.5493	0.3894	0.6009	0.0086	0.0324	0.1433	0.0437
KTR1	0.8063	0.8049	0.7811	0.5187	0.0184	0.1585	0.7098	0.0646
KTR5	0.5498	0.7375	0.3827	0.0926	0.0413	0.2418	0.8472	0.4692
KTR10	0.6746	0.4263	0.2279	0.0780	0.6145	0.9016	0.3631	0.5537
KTR19	0.882	0.0279	0.7520	0.5019	0.9768	0.0022	0.5886	0.2658

Valores de $p < 0.05$ estão destacados na cor vermelha; Correlação de Pearson ou correlação de Spearman.

Diante da evidência do potencial de regulação das sEV-Myla 2059 nas células HaCaT, prosseguimos a avaliar outras vias que poderiam ser moduladas sEV. Para analisar essa questão optamos por uma abordagem de investigação ampla: análise do conjunto completo dos transcritos (transcriptoma). Enfatizamos que a análise completa dos dados se encontra em curso, e os resultados apresentados são preliminares.

Doze amostras de células HaCaT (04 replicatas de amostras sem tratamento, tratadas com 8×10^{10} de sEV-Myla 2059 por 4 h ou 24 h) foram analisadas por sequenciamento de RNA. O sequenciamento das amostras foi realizado em corrida única, com o mínimo de 20,5 milhões de leituras (média de 21 milhões) por amostra (Figura 40).

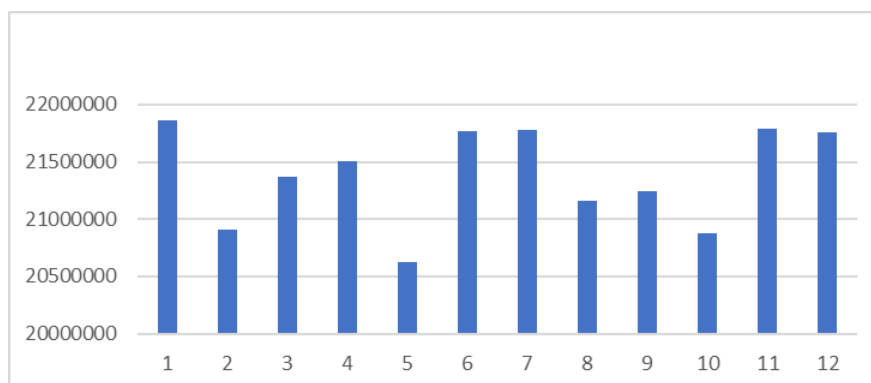


Figura 40. Total de leituras por amostra. Células HaCaT tratadas com 8x1010 sEV-Myla 2059 por 4 h ou 24 h ou sem tratamento foram submetidas ao sequenciamento de RNA. Os gráficos de barra indicam quantidade de leituras por amostra.

O total de 28.938 genes foram identificados em pelo menos uma amostra. Duas amostras foram consideradas *outliers* e removidas da análise por baixa correlação com o resto do grupo de tratamento. Os dados estão ilustrados na análise de componentes principais (PCA) e correlação de Pearson entre os grupos de tratamento (Figura 41A e Figura 41B, respectivamente).

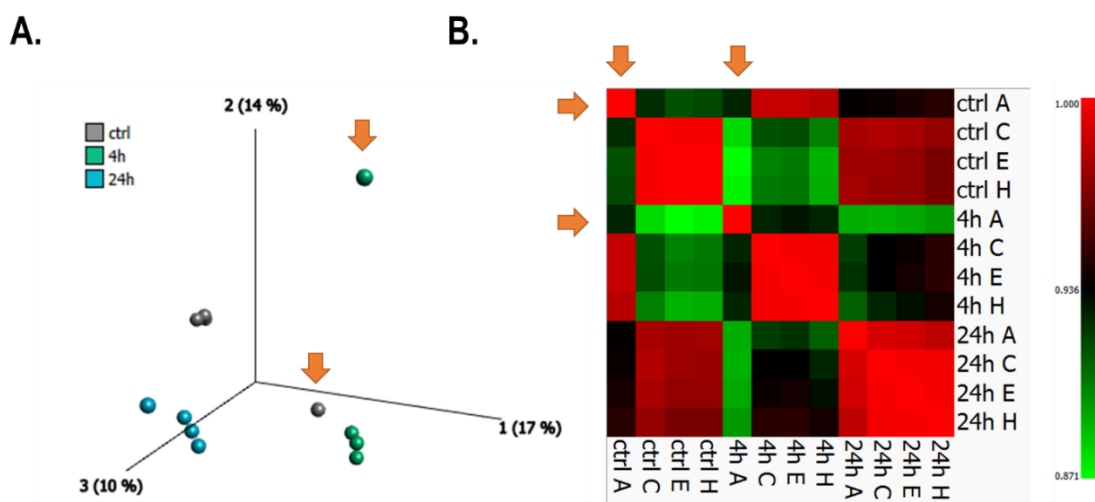


Figura 41. Correlação entre as amostras. Células HaCaT tratadas com 8x1010 sEV-Myla 2059 por 4 h ou 24 h ou sem tratamento foram sequenciamento de RNA. (A) análise de componente principal dos 4377 genes mais variáveis e (B) *heat-map* de correlação de Pearson. As setas indicam duas amostras (CTRL-A e 4h-A) com baixa correlação com o grupo de tratamento.

A seguir avaliamos os genes diferencialmente expressos (DEG) entre os grupos tratado e controle nos dois tempos de tratamento, 4 h e 24 h. Identificamos 1950 DEG entre as amostras controle e tratado por 4 h e 641 DEG entre as amostras controle e tratado por 24 h, ilustrados em *heat map* nas Figuras 42. A descrição completa dos DEGs está nos Anexos B e C.

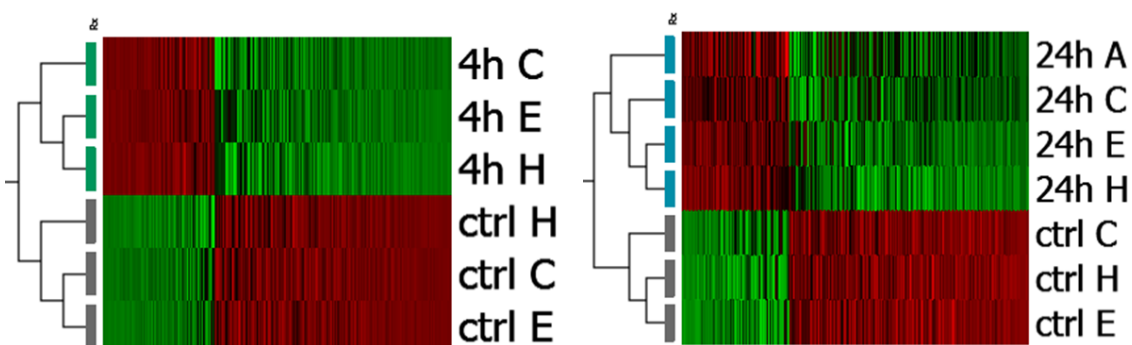


Figura 42. Análise de expressão diferencial de células HaCaT tratadas com sEV-Myla2059. Células HaCaT sem tratamento ou tratadas com 8x1010 sEV-Myla 2059 por 4 h, 24 h foram analisadas por sequenciamento

de RNA (10 amostras, A, E, C e H; controle = ctrl; 4h = tratamento por 4h; 24h = tratamento por 24h). Análise de expressão diferencial (Var>0.1, p<0.05, q=0.15, >2-fc) identificou 1950 genes após o tratamento de 4 h (heat map da esquerda) e 641 genes após o tratamento de 24 h (heat map da direita).

Os 20 DEGs com maior variância (positiva e negativa) para os tratamentos de 4 h e 24 h estão descritos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: 20 DEGs com maior variância após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene		Valor de p	Fold Change
CSF2	<i>Colony Stimulating Factor 2</i>	0.0007	7.1927
CXCL8	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>	0.0001	6.9068
KRTAP2-3	<i>Keratin Associated Protein 2-3</i>	0.0005	6.1016
SPRR2D	<i>Small Proline Rich Protein 2D</i>	<0.0001	6.0106
SPRR2A	<i>Small Proline Rich Protein 2A</i>	<0.0001	5.6613
ESM1	<i>Endothelial Cell Specific Molecule 1</i>	0.0031	5.5602
CREB5	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 5</i>	0.0021	5.5297
MMP20	<i>Matrix Metalloproteinase 20</i>	0.0018	5.5253
HSPA6	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6</i>	0.0043	5.2833
SERPINB2	<i>Serpin Family B Member 2</i>	<0.0001	4.9075
ISLR2	<i>Immunoglobulin Superfamily Leucine Rich Repeat 2</i>	0.0032	-4.7217
MPIG6B	<i>Megakaryocyte And Platelet Inhibitory Receptor G6b</i>	0.0003	-4.7818
NAP1L3	<i>Nucleosome Assembly Protein 1 Like 3</i>	0.0194	-4.7977
BMF	<i>Bcl2 Modifying Factor</i>	0.0000	-4.8374
PCDH18	<i>Protocadherin 18</i>	<0.0001	-4.8867
TXNIP	<i>Thioredoxin Interacting Protein</i>	<0.0001	-4.9943
VAV3	<i>Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3</i>	<0.0001	-4.9958
PPARGC1A	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>	0.0021	-5.3229
SEMA6D	<i>Semaphorin 6D</i>	<0.0001	-5.5731
LEXM	<i>Lymphocyte Expansion Molecule</i>	<0.0001	-5.7128

Tabela 10: 20 DEGs com maior variância após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene		Valor de p	Fold Change
HSPA6	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6</i>	0.0008	5.1943
S100A8	<i>S100 Calcium Binding Protein A8</i>	0.0200	4.7155
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	0.0218	4.6112
SPRR2A	<i>Small Proline Rich Protein 2A</i>	0.0355	4.0629
GPR85	<i>G Protein-Coupled Receptor 85</i>	0.0001	3.7002
SERPINB4	<i>Serpin Family B Member 4</i>	0.0112	3.4375
HLA-DRA	<i>Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha</i>	0.0040	3.4201
CXCL3	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 3</i>	0.0457	3.3034
MFAP2	<i>Microfibril Associated Protein 2</i>	0.0011	3.2235
GZMB	<i>Granzyme B</i>	0.0071	3.1730
KRT77	<i>Keratin 77</i>	0.0075	-3.4726
LCE1E	<i>Late Cornified Envelope 1E</i>	0.0041	-3.4995
RNF225	<i>Ring Finger Protein 225</i>	0.0271	-3.5000
CLEC3A	<i>C-Type Lectin Domain Family 3 Member A</i>	0.0090	-3.5486
GLULP4	<i>Glutamate-Ammonia Ligase Pseudogene 4</i>	0.0033	-3.6378
ADAMTS18	<i>ADAM Metallopeptidase;Thrombospondin 1 Motif 18</i>	0.0000	-3.7622
C1QTNF8	<i>Complement C1q Tumor Necrosis Factor-Related 8</i>	0.0000	-3.7622
CCN5	<i>Cellular Communication Network Factor 5</i>	0.0180	-3.9447
KRT1	<i>Keratin 1</i>	0.0012	-4.1542
ADAMTS5	<i>ADAM Metallopeptidase; Thrombospondin 1 Motif 5</i>	0.0054	-4.6942

Os DEGs com maior variância após o tratamento com sEV-LCCT em sua maioria estão relacionados com processo inflamatório. Por meio da análise diferencial observamos também diversos DEGs relacionados com adesão celular, descritos nas Tabelas 11 e 12.

Em acordo com o observado por RT-qPCR, os dados de RNA-seq mostram que o tratamento de sEV alterou a expressão de diferentes citoqueratinas (KRT). O perfil de regulação das KRT diferencialmente expressas foi diferente entre os dois tempos de tratamento: tendência de regulação positiva (aumento na expressão de KRT23, KRT17, KRT16, KRT6A e redução na expressão de KRT71 e KRT74) após 4 h de tratamento e tendência de regulação negativa (diminuição da expressão de KRT13, KRT3, KRT4, KRT77 e KRT1) após 24 h de tratamento.

Tabela 11: DEGs relacionados a adesão celular após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene		Valor de p	Fold Change
CLDN6	<i>Claudin 6</i>	0.0049	3.1297
CLDN4	<i>Claudin 4</i>	<0.0001	2.3916
CLDN8	<i>Claudin 8</i>	0.0034	-1.3368
ITGB6	<i>Integrin β6</i>	0.0003	1.7289
ITGA2	<i>Integrin α2</i>	<0.0001	1.5314
PCDHGA7	<i>Protocadherin Gamma-A7</i>	0.0369	-1.3774
PCDHGA10	<i>Protocadherin Gamma-A10</i>	0.0166	-1.4491
PCDHB11	<i>Protocadherin Beta 11</i>	0.0240	-2.6957
CDH10	<i>Cadherin 10</i>	0.0060	-2.9514
PCDH18	<i>Protocadherin-18</i>	<0.0001	-4.8866
LAMA3	<i>Laminin α3</i>	<0.0001	1.6194
LAMA2	<i>Laminin α2</i>	0.0076	1.4018
LAMC2	<i>Laminin γ2</i>	0.0001	1.2027
LAMA4	<i>Laminin α4</i>	0.0014	-1.0154
PLEC	<i>Plectin</i>	0.0061	1.5481
FERMT2	<i>Kindlin</i>	0.0003	1.4592
KRT23	<i>Keratin 23</i>	0.0051	4.1973
KRT17	<i>Keratin 17</i>	<0.0001	2.7656
KRT16	<i>Keratin 16</i>	0.0002	1.9027
KRT6A	<i>Keratin 6A</i>	<0.0001	1.4432
KRT71	<i>Keratin 71</i>	0.0259	-1.8823
KRT74	<i>Keratin 74</i>	0.0069	-2.5179

Tabela 12: DEGs relacionados a adesão celular após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene		Valor de p	Fold Change
DSG4	<i>Desmoglein 4</i>	0.0042	-2.0407
DSCAM	<i>DS cell adhesion molecule</i>	0.0014	2.0293
ITGA11	<i>Integrin α11</i>	0.0015	-1.5387
CDH19	<i>Cadherin-19</i>	0.0243	2.7110
PCDH18	<i>Protocadherin-18</i>	0.0017	-1.3616
LAMB4	<i>Laminin β4</i>	0.0293	-1.6690
KRT13	<i>Keratin 13</i>	0.0001	-1.1953
KRT3	<i>Keratin 3</i>	0.0146	-2.3514
KRT4	<i>Keratin 4</i>	0.0004	-2.9469
KRT77	<i>Keratin 77</i>	0.0075	-3.4726
KRT1	<i>Keratin 1</i>	0.0012	-4.1542

Notamos DEGs relacionados com a diferenciação celular e manutenção do envelope cornificado, estão descritos nas Tabelas 13 e 14.

Observa-se também a regulação negativa do gene codificador da involucrina, marcador de diferenciação celular em queratinócitos (Watt 1983), de maneira consistente nos dois tempos de tratamento (o *foldchange* de -1.22 e -2.73 para 4 h e 24 h, respectivamente).

Identificamos a expressão alterada de moléculas envolvidas na adesão intercelular da epiderme, como as claudinas (CLDN4, CLDN6 e CLDN8) e subunidades das integrinas (ITGB6, ITGA2, ITGA11) em ambos os tempos de tratamento. Alguns componentes moleculares relacionados aos desmossomos como as subunidades da laminina (LAMA3, LAMA2, LAMC2, LAMA4 e LAMB4), a desmogleína 4 (DSG4) e a plectina (PLEC) foram regulados, em sua maioria positivamente. Observamos também o aumento na expressão das “*small proline-rich proteins*” (SPRs; SPRR2D, SPRR2F, SPRR2A e SPRR1B), proteínas estruturais da camada granulosa como a involucrina (Watt 1983), em ambos os tempos de tratamento.

Tabela 13: DEGs relacionados a manutenção do envelope cornificado após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene		Valor de p	Fold Change
SPRR2D	<i>Small Proline Rich Protein 2D</i>	<0.0001	6.0106
SPRR2F	<i>Small Proline Rich Protein 2F</i>	0.0015	2.5465
SPRR2A	<i>Small Proline Rich Protein 2A</i>	<0.0001	5.6613
SPRR1B	<i>Small Proline Rich Protein 1B</i>	0.0006	2.5436
HRNR	<i>Homerin</i>	0.0061	-2.4366
IVL	<i>Involucrin</i>	0.0004	-1.2286
S100A5	<i>S100 Calcium Binding Protein A5</i>	0.0018	-1.4708
SATB1	<i>SATB Homeobox 1</i>	0.0002	-1.5329
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>	0.0060	4.6857

Tabela 14: DEGs relacionados a manutenção do envelope cornificado após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene		Valor de p	Fold Change
LCE1E	<i>Late Cornified Envelope 1E</i>	0.0041	-3.4995
S100A8	<i>S100 Calcium Binding Protein A8</i>	0.0200	4.7155
SPRR1B	<i>Small Proline Rich Protein 1B</i>	0.0087	1.1483
SPRR2A	<i>Small Proline Rich Protein 2A</i>	0.0355	4.0629
IVL	<i>Involucrin</i>	<0.0001	-2.7344
BMP6	<i>Bone Morphogenetic Protein 6</i>	0.0263	2.4814

As enzimas proteolíticas metaloproteinases são capazes de degradar componentes da matriz extracelular e por essa razão estão relacionadas com a progressão de diversos tumores (Vacca et al. 1997, Li et al. 2013, Fromme and Zigrino 2022, Tune et al. 2022, Łukaszewicz-Zajac,

Paćzek and Mroczko 2022). Observamos regulaćão na expressãõ de diversas enzimas dessa família de proteínas, descritas nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15: DEGs relacionados com a síntese de metaloproteínas após o tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene	Valor de p	Fold Change
ADAMTS9 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS9</i>	0.0038	4.0467
ADAM19 <i>Disintegrin and Metalloproteinase 19</i>	<0.0001	3.1084
ADAMTS15 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 15</i>	0.0009	2.4939
ADAM8 <i>Disintegrin and Metalloproteinase 8</i>	<0.0001	1.9919
ADAMTS14 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 14</i>	0.0263	1.4434
ADAM32 <i>Disintegrin and Metalloproteinase 32</i>	0.0082	1.4078
ADAMTS6 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 6</i>	0.0047	1.0808
ADAM1B <i>Metalloproteinase 1B</i>	0.0446	-1.6798
ADAMTS5 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 5</i>	0.0081	-4.0229
MMP20 <i>Metalloproteinase 20</i>	0.0018	5.5253
MMP9 <i>Metalloproteinase 9</i>	0.0396	1.3305
MMP13 <i>Metalloproteinase 13</i>	0.0016	-1.2017
MMP12 <i>Metalloproteinase 12</i>	0.0201	-1.6253
MMP11 <i>Metalloproteinase 11</i>	0.0168	-1.6441

Tabela 16: DEGs relacionados com a síntese de metaloproteínas após o tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene	Valor de p	Fold Change
ADAMTS14 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 14</i>	0.0098	1.2861
ADAM8 <i>Disintegrin and Metalloproteinase 8</i>	0.0030	1.2340
ADAM1B <i>Metalloproteinase 1B</i>	0.0499	-1.4195
ADAMTS18 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 18</i>	<0.0001	-3.7622
ADAMTS5 <i>Disintegrin and Metalloproteinase TS 5</i>	0.0054	-4.6942
MMP9 <i>Metalloproteinase 9</i>	0.0120	1.1917
MMP13 <i>Metalloproteinase 13</i>	<0.0001	-2.2743
MMP10 <i>Metalloproteinase 10</i>	0.0123	-2.4972
MMP12 <i>Metalloproteinase 12</i>	0.0024	-3.4249

As galectinas são lectinas com atuação em processos de inflamação e progressão tumoral, inclusive em cânceres hematológicos como LCCT (Giordano, Croci and Rabinovich 2013, Shi et al. 2022). Observamos regulaćão na expressãõ gênica dessas lectinas, descritos nas Tabelas 17 e 18. Nossos dados mostraram aumento da expressãõ da galectina-3 (Gal-3) e redućão da galectinas 7, 7B e 4 nas células HaCaT após o tratamento com sEV-Myla 2059.

Tabela 17: DEGs relacionados com a síntese de galectinas após tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene		Valor de p	Fold Change
LGALS2	<i>Galectin 3</i>	0.0455	1.6922
LGALSL	<i>Galectin like</i>	0.0001	1.3302
LGALS7B	<i>Galectin 7B</i>	0.0040	-1.1613
LGALS7	<i>Galectin 7</i>	0.0495	-1.5354
LGALS4	<i>Galectin 4</i>	0.0302	-4.2339

Tabela 18: DEGs relacionados com a síntese de galectinas após tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene		Valor de p	Fold Change
LGALS7B	<i>Galectin 7B</i>	0.0113	-1.7266
LGALS4	<i>Galectin 4</i>	0.0014	-2.0679

A associação entre o processo de angiogênese e o prognóstico no LCCT está bem estabelecida (Miyagaki et al. 2017, Miyagaki et al. 2012). Notamos a modulação na expressão de diversos fatores relacionados com a angiogênese após o tratamento com as sEV-LCCT, detalhados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19: DEGs relacionados com o processo de angiogênese após tratamento com as sEV-LCCT por 4 h

Gene		Valor de p	Fold Change
IGFALS	<i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein Acid Labile</i>	0.0209	-3.2141
FGF1	<i>Fibroblast Growth Factor 1</i>	0.0024	-1.8040
VEGFD	<i>Vascular Endothelial Growth Factor D</i>	0.0332	-1.5031
PDGFC	<i>Platelet Derived Growth Factor C</i>	0.0004	-1.3538
TGFB3	<i>Transforming Growth Factor Beta 3</i>	0.0470	-1.2380
VEGFC	<i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i>	0.0037	1.1035
IGF	<i>Insulin Growth Factor - 1</i>	0.0141	1.5261
VGF	<i>VGF Nerve Growth Factor Inducible</i>	0.0261	1.5690
FGF5	<i>Fibroblast Growth Factor 5</i>	0.0093	1.8700
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>	0.0003	2.0213
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	0.0141	2.3730
PDGFB	<i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>	0.0002	2.6214
TGFA	<i>Transforming Growth Factor Alpha</i>	0.0006	2.7921
HBEGF	<i>Heparin Binding EGF Like Growth Factor</i>	0.0006	2.9893
FGF19	<i>Fibroblast Growth Factor 19</i>	0.0019	3.3035

Tabela 20: DEGs relacionados com o processo de angiogênese após tratamento com as sEV-LCCT por 24 h

Gene		Valor de p	Fold Change
PGF	<i>Placental Growth Factor</i>	0.0008	1.9165
HBEGF	<i>Heparin Binding EGF</i>	0.0006	1.5870
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	0.0022	1.4501
TGFA	<i>Transforming Growth Factor Alpha</i>	0.0001	1.1476
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>	0.0013	1.1371

6. DISCUSSÃO

Nanovesículas são pequenas vesículas extracelulares que contêm proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, medeiam a comunicação célula-célula, influenciam microambientes locais e distantes. Até o momento há apenas dois estudos sobre nanovesículas no contexto de LCCT. Um dos estudos identificou os miRs 155 e 1246 carregados por nanovesículas derivadas de linhagens e do soro de pacientes LCCT (**Moyal et al. 2021**). Outro, relata que as nanovesículas derivadas de linhagens LCCT carregam partículas de retrovírus endógenos (HERV-W) (**Laukkanen et al. 2020**). O nosso estudo é o primeiro a avaliar a possível contribuição de nanovesículas tumorais na patogênese da doença na pele em pacientes com LCCT. A seguir iremos discutir em tópicos as etapas de obtenção e caracterização das sEV-LCCT, e a análise do efeito provocado após internalização por queratinócitos imortalizadas (linhagem HaCaT).

6.1 Obtenção, estudo do conteúdo proteico e ensaios de captação das sEV-LCCT

Todo o estudo foi baseado em sEV de linhagens imortalizadas. Essa escolha permitiu a execução de ensaios que requerem quantidades razoavelmente altas de sEV: caracterização proteica por espectroscopia de massas e visualização da internalização das sEV por células receptoras por diferentes ensaios de imagem. Por outro lado, a validação dos principais achados com sEV derivadas de células primárias ou de soro e/ou plasma de pacientes com LCCT é de grande importância.

O protocolo adotado para obtenção das sEV atende aos requisitos propostos pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), como o uso de duas técnicas diferentes no protocolo de obtenção de vesículas (Théry et al. 2018). Identificamos parâmetros compatíveis com sEV nas nossas amostras por ao menos três abordagens técnicas distintas, como preconiza a ISEV (Théry et al. 2018).

A validação de conteúdo proteico compatível com sEV, realizada por WB, confirmou a presença de CD81, HSP-70 e RAB5 nos nossos preparados de sEV. O marcador CD81 é um receptor ancorado na membrana plasmática de organismos eucarióticos (Kinoshita 2016), e a presença desse marcador no preparado de EV confirma a bicamada lipídica estrutural específica de EVs, independentemente da via de secreção das vesículas. O CD81 pertence à família das tetraspaninas e juntamente com outras proteínas dessa mesma família é considerado um dos principais marcadores de EVs (Andreu and Yáñez-Mó 2014). As proteínas *heat shock* (HSP), são outro tipo de marcador usual para sEV. São chaperonas presentes no citosol celular envolvidas

com diversos processos de homeostase celular. A confirmação de HSP no nosso preparado de vesículas indica que a estrutura de bicamada lipídica envolveu e carregou proteínas do citosol, como esperado em EVs. Também identificamos nos preparados de sEV a proteína RAB5, componente da família de proteínas RAB, envolvidas com importantes funções nas vias endolíticas, secretórias e no transporte intracelular vesicular. Proteínas RAB foram descritas em diversos estudos de sEV (Blanc and Vidal 2018, Alenquer and Amorim 2015), sendo, portanto, um bom controle positivo do preparado de sEV.

Como controles negativos, selecionamos a calnexina, proteína expressa no retículo endoplasmático (Bonsergent et al.) e GM-130, proteína associada a membrana do complexo de Golgi (Jones, Manioci and Russell 2022), ambos foram negativos nos nossos preparados de sEV e positivos para os lisados celulares, nos ensaios de WB. Pelo fato de serem proteínas que não apresentam relação com vesículas, mas estão presentes nas células e podem ser purificadas em conjunto com as sEV no preparado, são considerados indicadores de pureza nas amostras sEV. Dessa forma, excluímos contaminação por resíduo celular no nosso preparo de sEV.

Apesar das medidas adotadas para exclusão de contaminantes, identificamos albumina nos preparados de sEV pela análise de espectroscopia de massa (MS). Porém, diversos estudos relatam presença de albumina nos preparados de sEV (Théry et al. 2018, Jeppesen et al. 2019), estando inclusive entre as 100 proteínas mais detectadas de acordo com a Vesiclepedia (Tabela 1). Não devemos excluir também a possibilidade dessas proteínas estarem aderidas ou agregadas junto as vesículas, o que dificultaria a remoção do preparado de sEV.

O estudo do conteúdo proteico por MS identificou o total de 620 proteínas presentes em ambos preparados de sEV das duas linhagens LCCT, Myla 2059 e Hut78. Apesar de o conteúdo ser o mesmo em ambos preparados de sEV, com 100% de similaridade em termos qualitativos, estes diferem quantitativamente, ou seja, na abundância de cada proteína entre os preparados de sEV-Myla 2059 e sEV-Hut78. Apesar das duas linhagens serem representações distintas de uma doença espectral, Myla 2059 de MF avançada enquanto que Hut78 é representativa de SS, as linhagens diferem quanto a expressão de uma série de marcadores, sensibilidade a terapias farmacológicas e ao perfil de indução de tumor *ex vivo* (Netchiporouk et al. 2017, Gill et al. 2022). Assim, o comportamento distinto frente a esses fatores sugere que o conteúdo proteico seja diferente entre as linhagens. É, portanto, curioso o fato de termos encontrado sobreposição completa do conteúdo proteico entre os dois grupos de preparados de sEV. É possível que os parâmetros de escolha para o ensaio (*input* de amostra, e preparo, por exemplo) tenham

contribuído para um limite de detecção do ensaio para proteínas de baixa abundância (Pietrowska et al. 2019), o que explicaria a similaridade qualitativa entre as amostras.

Quanto ao conteúdo vesicular proteico, é importante destacar que a análise desses dados continua em curso, portanto os resultados são preliminares. Os dados estão sendo analisados quanto as abordagens de enriquecimento de vias, envolvimento com processos biológicos e funções moleculares através das análises *Gene Ontology* (GO) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Dentre as diferentes proteínas detectadas descrevemos alguns exemplos de integrinas, moléculas relacionadas a processos tumorigênicos e marcadores comumente encontrados em células T.

Nossos resultados apontam que a integrina do tipo $\beta 2$ (ITGB2) é uma das proteínas relacionadas à adesão celular carregadas pelas sEV-LCCT. É interessante o fato de a abundância ter sido significativamente maior nas sEV derivadas da forma leucêmica de LCCT (SS), sEV-Hu78, em comparação a variante MF, sEV-Myla 2059. Essas integrinas $\beta 2$ são indispensáveis para o extravasamento de células T ativadas através do endotélio vascular (**Grabbe et al. 2002**), função evidenciada em modelo murino *knockout* da molécula CD18/ITGB2 em células T, em que o extravasamento de células T CD18^{-/-} em lesões cutâneas eczematosas foi prejudicado. Esses resultados corroboram com o quadro clínico observado nos pacientes de SS, forma clínica de LCCT em que as células tumorais são encontradas no sangue periférico e em lesões cutâneas, indicando habilidade de extravasamento através do endotélio vascular. Assim, nossos resultados sugerem que as sEV derivadas das células tumorais Hut78 poderiam herdar a habilidade de atravessar o endotélio vascular por meio dessa molécula. Além disso, estudos indicam que a expressão de CD18/ITGB2 em sEV plasmáticas de pacientes sépticos é maior do que em indivíduos saudáveis e se correlaciona com dados clínicos de mal prognóstico (Kawamoto et al. 2019). Pacientes com SS em estado avançado da doença vão a óbito em sua maioria por sepse (Allen et al. 2020, Posner et al. 1981). Assim, é possível que sEV-ITGB2 estejam relacionadas em com o estado de inflamação sistêmica observados em pacientes sépticos no LCCT.

Assim como o caso da ITGB2, nossos resultados também mostram que as sEV-Hut78 transportam em maior abundância a integrina da família $\beta 1$ (ITGB1). Recentemente, ITGB1 foi proposto como possível alvo terapêutico na SS, pelo fato de ser um achado comum entre diferentes estudos de análises de expressão gênica em pacientes com SS (Cristofolletti et al. 2022). A imensa heterogeneidade entre as células tumorais de pacientes SS (Borcherding et al.

2022, Rassek and Izykowska 2020, Buus et al. 2018) tem sido um desafio no melhor entendimento da patogênese da doença.

Identificamos também outras moléculas de adesão nos preparados de sEV-LCCT, ALCAM/CD166 e MCAM/CD146, com maior abundância na amostra representativa da forma leucêmica SS, sEV-Hut78, em ambos os casos. As duas moléculas podem estar relacionadas com progressão tumoral no LCCT, visto que ALCAM/CD166, tem participação na internalização de sEV tumorais por células receptoras (Cardeñes et al. 2022) e a forma solúvel de MCAM/CD146, é relacionada com angiogênese e metástase, sendo considerada mau prognóstico em diversos cânceres (Du et al. 2022, Nollet et al. 2022, Sharma et al. 2022, Abu El-Asrar et al. 2021, Obu et al. 2021).

Dentre as proteínas detectadas nas sEV-LCCT relacionadas a processos de tumorigênese, o papel da LGALS3BP (*galectin 3 binding protein*) na progressão tumoral foi avaliada em diversos cânceres (Capone, Iacobelli and Sala 2021). De fato, nossos resultados mostram que LGALS3BP é expressa em maior abundância nas sEV-Hut78. A LGALS3BP está relacionada com o processo de metástase, pois induz degradação da molécula de adesão caderina E (CDH1), desestabilizando junções de aderência presente em células epiteliais, e facilitando a mobilidade de células tumorais (Park et al. 2017). Além disso, LGALS3BP também funciona como fator pró-angiogênico ao induzir a secreção de VEGF (Piccolo et al. 2013). Curiosamente, dentre os resultados de queratinócitos tratados com sEV-LCCT, apresentados na próxima seção, houve regulação positiva em diversas moléculas angiogênicas concomitantemente com uma redução na expressão de diferentes caderinas, moléculas de adesão no epitélio, inclusive CDH1. Assim, é possível que LGALS3BP, vesiculada pelas células tumorais LCCT, seja uma das moléculas envolvidas na regulação desses fatores.

Assim constatamos que as sEV-LCCT exibem um arsenal de moléculas com potencial imunomodulador que podem contribuir para o processo inflamatório e de angiogênese, observado nos pacientes com LCCT. Demonstramos então, por diferentes ensaios de imunofluorescência, citometria de fluxo e de imagem e microscopia confocal, que sEV tumorais são captadas e internalizadas de maneira ativa por células epiteliais. Dessa forma, o conteúdo proteico detectado nas sEV é absorvido por células epiteliais e pode modular a resposta das células alvo.

Para investigar os efeitos das sEV-LCCT induzidos em células epiteliais, avaliamos os transcritos por sequenciamento de RNA e RT-qPCR.

6.2 Efeito da captação das sEV-LCCT por queratinócitos

Apesar do progresso considerável em compreender os mecanismos moleculares envolvidos na transformação maligna das células T, as causas do comportamento disfuncional da barreira cutânea e comprometimento do epitélio ainda não foram completamente elucidadas. Ainda não há indícios suficientes para identificar quais fatores são mais importantes na indução das alterações observadas no epitélio seja indução direta pelas células T malignas, sinais de uma resposta antitumoral ineficaz ou eventos secundários à colonização bacteriana da pele afetada. Os nossos dados sugerem possível via de contribuição direta das células tumorais para as alterações observadas no epitélio via captação de componentes biológicos carregados por nanovesículas tumorais (sEV-LCCT) por células epiteliais.

Queratinócitos tratados com sEV foram avaliados por RT-qPCR e sequenciamento de RNA quanto à expressão gênica. Assim como os dados obtidos do ensaio de proteômica, as abordagens de enriquecimento de vias e análises de GO e KEGG estão em desenvolvimento, portanto os resultados são preliminares.

O LCCT compartilha muitas características clínicas e histológicas com outras doenças de pele inflamatórias como a dermatite atópica (DA) e a psoríase (Roediger and Schlapbach 2022). Além da apresentação clínica, acumulam também características imunológicas em comum e infiltração na pele por células T de origem cutânea (Miyagaki and Sugaya 2011, Suga et al. 2014). Diversos estudos evidenciam barreira cutânea prejudicada com diminuição de proteínas do envelope cornificado e peptídeos antimicrobianos na pele em DA, o que resulta em maior suscetibilidade à colonização por *Staphylococcus aureus* e infecções (Suga et al. 2014). Apesar de sepse, derivada de infecções cutâneas recorrentes, ser a maior causa de morbidade e mortalidade nos LCCT (Mirvish et al. 2011), ainda há poucos relatos sobre o perfil de expressão de proteínas do envelope cornificado ou moléculas relacionadas a integridade da barreira cutânea.

Nossos resultados apontam que o tratamento de sEV-LCCT em queratinócitos alterou a expressão de diversas moléculas relacionadas à formação da camada córnea, em sua maioria relacionadas ao complexo diferenciação epidérmica (do inglês, *epidermal differentiation complex* -EDC). Genes do EDC codificam proteínas precursoras da diferenciação da camada córnea (Wu et al. 2009), que incluem as duas maiores precursoras do envelope cornificado involucrina (IVL) e loricrina (LOR) (Steinert and Marekov 1995) e outras quatro famílias de proteínas: proteínas S100 (S100A1-9), pequenas proteínas ricas em prolina (*small proline-rich proteins*; SPRRs), proteínas

LCE (*late cornified envelope*; LCE) e as proteínas S100 SFTP (*fused-type proteins*; SFTPs) (Schäfer et al. 1995). Observamos alterações na expressão da maioria dos genes EDC, sendo modulação negativa na expressão de IVL, LOR e LCE e modulação positiva na expressão de S100A8 e diferentes SPRRs (SPRR2D, SPRR2F, SPRR2A e SPRR1B). Genes do complexo EDC são chaves no processo de queratinização do epitélio, essencial para o funcionamento da barreira cutânea. Em DA, diversos estudos demonstraram que alterações na expressão de diversas proteínas do envelope cornificado na pele impacta o desenvolvimento e o curso da doença (Trzeciak et al. 2020, Trzeciak et al. 2017b, Trzeciak et al. 2017a, Trzeciak et al. 2016). Assim como em DA, a suscetibilidade à infecção bacteriana cutânea pelos pacientes com LCCT pode estar relacionada com a integridade da barreira cutânea.

Nossos resultados mostraram também a regulação negativa da expressão de hornerina (do inglês, *hornerin*; HRNR) e de filagrina (FLG), ambas membras da família de proteínas S-100 SFTP do complexo EDC. A FLG é uma proteína epidérmica que agrega os filamentos de queratina e fornece citoesqueleto para o envelope cornificado. O mecanismo de funcionamento da HRNR foi pouco estudado, mas há indícios de que a sua função seja similar a FLG no epitélio (Henry et al. 2011, Thyssen et al. 2020). Camundongos incapazes de produzir HRNR apresentam comprometimento de fatores hidratantes naturais (NMF) e maior rigidez no epitélio (Thyssen et al. 2020). Assim como a FLG, estudos reportam mutações no gene codificante de HRNR em pacientes com DA (Wu et al. 2009, Elias and Wakefield 2014) e psoríase (Wu et al. 2009), porém ainda não há relatos da expressão desse gene no LCCT. A redução de HRNR e FLG é associada a defeitos na barreira cutânea, o que sugere a contribuição das sEV-LCCT para a comprometimento dessa barreira observado nos pacientes com LCCT.

Nossos resultados mostram a redução na expressão de LOR e FLG apenas nas avaliações por RT-qPCR e não nas avaliações por sequenciamento de RNA (transcriptoma). Acreditamos que a razão pela discrepância destes dados seja o número amostral avaliado (n=8-14 nos ensaios de RT-qPCR e n=3-4 nas avaliações por transcriptoma), porém a expressão de LOR mostrou-se mais específica para DA do que para LCCT em um estudo anterior (Suga et al. 2014, Trzeciak et al. 2020). Além disso, Suga et al. evidenciaram que a expressão de FLG e LOR, encontra-se reduzida em biopsias de pele lesionadas de pacientes LCCT, a nível proteico e transcricional (Suga et al. 2014). Apesar de poucos estudos terem investigado o perfil de expressão proteínas do envelope cornificado em pacientes com LCCT, os níveis de expressão de FLG correlacionaram-se negativamente com níveis séricos de marcadores de doença (Suga et al. 2014). Assim, o perfil

de expressão proteínicas do envelope cornificado parece estar relacionado com o funcionamento da barreira cutânea e as sEV-LCCT, ao alterar a expressão de genes do complexo EDC, pode contribuir para o comportamento disfuncional da barreira cutânea. Porém se faz necessário maiores investigações sobre o perfil e funcionamento desses genes no LCCT.

Algumas proteínas precursoras do envelope cornificado codificadas pelo EDC, como as S100A1-9, são peptídeos microbianos (do inglês, *antimicrobial peptides* - AMP). Nossos resultados também mostraram alteração na expressão de AMPs nos queratinócitos tratados, com redução na expressão de S100A5 e aumento na expressão de S100A8. Esse achado corrobora com a literatura, já que a expressão de S100A8 é aumentada em pacientes com LCCT avançado em comparação com a pele saudável (Suga et al. 2014).

Recentemente mostrou-se que as pequenas proteínas ricas em prolina (SPPRs) também atuam como AMPs (Zhang et al. 2022). Identificamos diversas SPRRs com expressão alterada nos queratinócitos após o tratamento com as sEV-LCCT: SPRR2D, SPRR2F, SPRR2A e SPRR1B. Em todos os casos a expressão foi regulada positivamente. Porém, é curioso que a expressão proteica de SPRRs na pele de pacientes com LCCT encontra-se reduzida (Trzeciak et al. 2020), o que vai de encontro com os nossos achados. É possível que esse seja um viés do protocolo de estímulo adotado por nós, ao termos optado por estímulo único das sEV-LCCT nos queratinócitos. Assim, talvez o efeito observado fosse diferente no caso de tratamento prolongado dos queratinócitos com sEV-LCCT, situação mais próxima da realidade em que células epiteliais estão sob constante influência das sEV tumorais. Estudos relatam a expressão alterada de AMPs em pele de pacientes com LCCT (Wehkamp et al. 2020, Nakajima et al. 2018, Suga et al. 2014). Tem sido proposto que esse fato pode ter relação com a alta incidência de infecções bacterianas observada no LCCT. É possível também que a mudança na expressão de AMPs pode ser devido as células tumorais, produzindo a inflamação e uma sinalização subsequentemente desregulada.

Nossos resultados também apontam que o tratamento dos queratinócitos com as sEV-LCCT induziu regulação negativa na expressão de Satb1. O gene Satb1 é descrito como regulador da transcrição de diversos genes EDC em queratinócitos (Moltrasio et al. 2022), com participação central nos mecanismos de regulação epigenética da diferenciação dérmica. Assim, pode ter participação direta com a alteração na expressão observada por nós dos diversos genes do complexo diferenciação EDC. De fato, a contribuição do Satb1 na patogênese do LCCT tem sido investigada no contexto de escape tumoral. A perda de Satb1 em células tumorais na síndrome de Sézary (SS) pode estar relacionada com a resistência das células tumorais a apoptose (Wang

et al. 2011). Na pele, a expressão de Satb1 em pacientes com MF é heterogênea (Gao et al. 2021), porém a diminuição da expressão foi correlacionada com o estágio de MF, sendo mais proeminente nos casos avançados de LCCT e considerada indicador de mau prognóstico (Fredholm et al. 2018, Grzanka et al. 2012, Grzanka et al. 2015). Assim, os resultados sugerem que o gene Satb1 pode estar intimamente envolvido com a regulação da diferenciação dérmica modulada pelas sEV-LCCT nos queratinócitos.

Para a barreira cutânea ser totalmente funcional os queratinócitos devem ser conectados uns aos outros por junções intercelulares, por exemplo os desmossomos. Notamos regulação na expressão das desmocolinas 1 e 3 (DSC1 e DSC3) e desmogleínas 1 e 4 (DSG1 e DSG4) após o tratamento com sEV-LCCT, ambas famílias de ancoragem presentes nas porções extracelulares dos desmossomos.

De fato, a alteração de desmossomos e suas estruturas foi evidenciada em queratinócitos após ensaios *in vitro* com meio condicionado de células tumorais LCCT (Thode et al. 2015). Thode et al., observaram redução na função dos desmossomos e perda de adesão entre as camadas de queratinócitos em cultura organotípica de pele. Além disso, relataram também redução de marcadores de diferenciação celular também observados em nosso estudo, como a involucrina (IVL), citoqueratina 10 (KRT10) e as moléculas de adesão celular integrinas (Thode et al. 2015). Thode et al., relata em seu estudo que ao depletar galectina-3 e galectina-1 do meio condicionado de células tumorais, os efeitos observados nos queratinócitos são revertidos (Thode et al. 2015). Apesar de não termos identificado galectina-3, apenas galectina-1, em nossos preparados de sEV-LCCT, galactinas são frequentes em sEV tumorais (Bänfer and Jacob 2020). É possível que parte dos achados observados seja de fato devido a ação de galactinas presentes nos preparados de sEV e que por limitação de detecção do ensaio não foram detectadas pela espectroscopia de massa. É possível também que haja outros fatores além de galectinas envolvidos na modulação desses componentes da barreira cutânea.

Citoqueratinas (KRT) são proteínas estruturais que formam filamentos intermediários no epitélio e medeiam a ligação entre os desmossomos. Estudos apontam a relevância da expressão das KRT em doenças de pele inflamatórias (Zhang et al. 2019), entretanto até o momento não há a descrição do perfil de expressão dessas proteínas em pacientes com LCCT. Nossos resultados mostram redução na expressão de diversas citoqueratinas (KRTs) e aumento na expressão de KRT23, KRT6, KRT16 e KRT17. As KRT6, KRT16 e KRT17 são consideradas marcadores de hiperproliferação em condições de tumor e psoríase. Essas KRTs em particular são consideradas

alarminas por contribuírem para ativação de processo inflamatório em queratinócitos e em células T na epiderme (Zhang et al. 2019). As sEV-LCCT por induzir a expressão desses marcadores em queratinócitos poderiam contribuir para a inflamação crônica observada no LCCT, entretanto é necessário maior investigação para estabelecer relação entre esses dois fenômenos.

A associação entre angiogênese e o prognóstico está bem estabelecida no LCCT (Miyagaki et al. 2017, Mazur et al. 2004). Os principais fatores relacionados com o processo de angiogênese são membros da família VEGF (subtipos A, B, C e D) e o fator de crescimento da placenta (PGF) (Miyagaki et al. 2017). Nossos resultados indicam que as sEV-LCCT induziram aumento na expressão dos fatores VEGF-A, VEGF-C e PIGF nos queratinócitos tratados. Os fatores VEGF-A e PGF além de estarem aumentados no soro e na pele lesionada de pacientes com LCCT, correlacionam-se com marcadores de severidade da doença (Miyagaki et al. 2017). Além das células tumorais espontaneamente produzirem fatores angiogênicos, também induzem a produção desses fatores *in vitro* em fibroblastos saudáveis (Pedersen et al. 2013). Outro fator importante na angiogênese é a molécula ESM1 (*Endothelial cell-specific molecule 1*). A ESM1 induz a produção de VEGF-A em células endoteliais e está relacionada com processo de angiogênese e permeabilidade vascular (Rocha et al. 2014). Observamos que o tratamento com sEV-LCCT alterou significativamente a expressão de ESM1, sendo um dos seis genes com maior regulação positiva nos queratinócitos tratados com sEV-LCCT por 4h. A expressão de ESM1 é fator de mau prognóstico em leucemia mieloide aguda (AML) (Chen et al. 2022) e outros cânceres (Liu et al. 2022, Huang et al. 2021, Wang, Li and Li 2021). Nossos resultados sugerem que sEV tumorais podem estar relacionadas com a alta expressão de fatores angiogênicos observados nos pacientes com LCCT e indicam que as células tumorais LCCT modulam células do epitélio para criar um ambiente pró-oncogênico.

O prurido é sintoma comum em doenças inflamatórias da pele, como LCCT (Demierre et al. 2006). O fator de crescimento de nervo (NGF), que estimula o surgimento de fibras nervosas na pele, está associado à gravidade do prurido na dermatite atópica. Os níveis séricos de NGF estão elevados em pacientes com a variante de SS, forma leucêmica de LCCT (Suga et al. 2013). Os autores do estudo sugerem que a expressão aumentada de NGF pode estar associada ao prurido na SS (Suga et al. 2013). Além disso, o NGF também está envolvido no processo de regeneração tecidual, proliferação de queratinócitos e no processo de angiogênese (Troullinaki et al. 2019, Liu, Wu and Huang 2021). Nossos resultados também apontam significativa modulação positiva na

expressão de NFG, o que pode indicar a contribuição de sEV-LCCT para o prurido e o processo de angiogênese.

Infecções bacterianas crônicas são comuns nestes pacientes, sendo sepse a maior causa de mortalidade e morbidade observada nos pacientes com LCCT avançado. O comprometimento da barreira cutânea pode favorecer a suscetibilidade dos pacientes às infecções bacterianas cutâneas. Em paralelo, fatores angiogênicos estão intimamente relacionados a progressão da doença no LCCT. sEv tumorais ao alterar a expressão de fatores relacionados a esses dois processos em queratinócitos podem, indiretamente, contribuir para o agravamento da doença no LCCT.

7. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem concluir que:

- As linhagens tumorais de LCCT, Hut78 e Myla 2059, secretam nanovesículas de maneira espontânea e constante. Essas podem ser obtidas de meio condicionado por protocolo baseado em centrifugação diferencial, ultrafiltração e cromatografia por exclusão de tamanho.
- As nanovesículas LCCT exibem arsenal de moléculas com potencial imunomodulador em processos de inflamação e de angiogênese;
- Queratinócitos imortalizados podem captar e internalizar as nanovesículas LCCT *in vitro*;
- As nanovesículas LCCT induzem menor expressão de genes relacionados com a manutenção do envelope cornificado em queratinócitos imortalizados;
- As nanovesículas LCCT induzem aumento na expressão de genes pró-angiogênicos, prurigênicos e de ação pró-inflamatória.

Constatamos que as sEV-LCCT exibem uma vasta gama de moléculas com potencial imunomodulador. Demonstramos por diferentes ensaios que sEV-LCCT tumorais são captadas e internalizadas de maneira ativa por células epiteliais. Dessa forma, o conteúdo proteico detectado nas sEV-LCCT é absorvido por células epiteliais e pode modular a resposta das células alvo.

Nosso estudo é o primeiro a sugerir a contribuição de sEV derivadas de células tumorais para dois processos centrais na patogênese do LCCT, comprometimento da barreira cutânea e angiogênese.

8. ANEXOS

Produção científica

Miyashiro, D., B. C. E. Souza, **M. P. Torrealba**, K. C. G. Manfrere, M. N. Sato & J. A. Sanches (2022) The Role of Tumor Microenvironment in the Pathogenesis of Sézary Syndrome. *Int J Mol Sci*, 23.

Torrealba, M. P., K. C. G. Manfrere, F. S. Y. Yoshikawa, N. Z. Pereira, A. Branco, F. M. E. Teixeira, D. R. Miyashiro, J. C. Martins, A. J. S. Duarte, J. A. Sanches & M. N. Sato (2021) IFN- γ reshapes monocyte responsiveness in Sezary syndrome. *Int J Dermatol*, 60, e3-e6.

Branco, A., N. Z. Pereira, F. S. Y. Yoshikawa, L. Oliveira, F. M. E. Teixeira, L. M. Oliveira, A. J. Pietrobon, **M. P. Torrealba**, J. F. de Lima, A. Duarte & M. N. Sato (2019) Proinflammatory profile of neonatal monocytes induced by microbial ligands is downmodulated by histamine. *Sci Rep*, 9, 13721.

Torrealba, M. P., K. C. Manfrere, D. R. Miyashiro, J. F. Lima, M. O. L. de, N. Z. Pereira, J. Cury-Martins, J. Pereira, A. J. S. Duarte, M. N. Sato & J. A. Sanches (2018) Chronic activation profile of circulating CD8+ T cells in Sézary syndrome. *Oncotarget*, 9, 3497-3506.

Colaborações internacionais

Doutorado Sanduíche – Edital CAPES/Print 01/2019 - sob supervisão do Prof. Dr. Anders Woetmann na Universidade de Copenhagen (2019-2021).

Participação em eventos

Summer School Skin Immunology – Leo Foundation Skin Immunology Research Center – University of Copenhagen, Denmark - 2021.

7th Annual International Society for Extracellular Vesicles – Annual Meeting – Barcelona, Spain – 2018;

Atividades extracurriculares desenvolvidas no período

Representação discente no Departamento – Dermatologia, na qualidade de titular (2018/2019);

VI Curso de Férias em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas/USP – 2018 – Comissão organizadora.

VII Curso de Férias em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas/USP – 2019 – Comissão organizadora.

9. REFERÊNCIAS

- Abu El-Asrar, A. M., M. I. Nawaz, A. Ahmad, M. M. Siddiquei, E. Allegaert, P. W. Gikandi, G. De Hertogh & G. Opdenakker (2021) CD146/Soluble CD146 Pathway Is a Novel Biomarker of Angiogenesis and Inflammation in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 62, 32.
- Agar, N. S., E. Wedgeworth, S. Crichton, T. J. Mitchell, M. Cox, S. Ferreira, A. Robson, E. Calonje, C. M. Stefanato, E. M. Wain, B. Wilkins, P. A. Fields, A. Dean, K. Webb, J. Scarisbrick, S. Morris & S. J. Whittaker (2010) Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sezary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol*, 28, 4730-9.
- Alenquer, M. & M. J. Amorim (2015) Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses*, 7, 5066-83.
- Allen, P. B., J. Switchenko, A. Ayers, E. Kim & M. J. Lechowicz (2020) Risk of bacteremia in patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Leuk Lymphoma*, 61, 2652-2658.
- Andreu, Z. & M. Yáñez-Mó (2014) Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Asadullah, K., W. D. Döcke, A. Haeussler, W. Sterry & H. D. Volk (1996) Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol*, 107, 833-7.
- Axelrod, P. I., B. Lorber & E. C. Vonderheid (1992) Infections complicating mycosis fungoides and Sezary syndrome. *JAMA*, 267, 1354-8.
- Blanc, L. & M. Vidal (2018) New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*, 9, 95-106.
- Bonin, S., S. M. Tothova, R. Barbazza, D. Brunetti, G. Stanta & G. Trevisan (2010) Evidence of multiple infectious agents in mycosis fungoides lesions. *Exp Mol Pathol*, 89, 46-50.
- Bonsergent, E., E. Grisard, J. Buchrieser, O. Schwartz, C. Théry & G. Lavieau Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells.
- Borcherding, N., K. J. Severson, N. T. Henderson, L. Dos Santos Ortolan, A. C. Rosenthal, A. M. Bellizzi, V. Liu, B. K. Link, A. R. Mangold & A. Jabbari (2022) Single-cell analysis of Sézary syndrome reveals novel markers and shifting gene profiles associated with treatment. *Blood Adv*.
- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese & J. E. Darnell (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
- Buus, T. B., A. Willerslev-Olsen, S. Fredholm, E. Blümel, C. Nastasi, M. Gluud, T. Hu, L. M. Lindahl, L. Iversen, H. Fogh, R. Gniadecki, I. V. Litvinov, J. L. Persson, C. M. Bonefeld, C. Geisler, J. P. Christensen, T. Krejsgaard, T. Litman, A. Woetmann & N. Ødum (2018) Single-cell heterogeneity in Sézary syndrome. *Blood Adv*, 2, 2115-2126.
- Bänfer, S. & R. Jacob (2020) Galectins in Intra- and Extracellular Vesicles. *Biomolecules*, 10.
- Campbell, J. J., R. A. Clark, R. Watanabe & T. S. Kupper (2010) Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*, 116, 767-71.
- Candi, E., R. Schmidt & G. Melino (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 328-40.
- Capone, E., S. Iacobelli & G. Sala (2021) Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target. *Journal of Translational Medicine*, 19, 405.
- Cardeñas, B., I. Clares, T. Bezos, V. Toribio, S. López-Martín, A. Rocha, H. Peinado, M. Yáñez-Mó & C. Cabañas (2022) ALCAM/CD166 Is Involved in the Binding and Uptake of Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*, 23.

- Chen, W., D. Liu, G. Wang, Y. Pan, S. Wang & R. Tang (2022) Screening diagnostic markers for acute myeloid leukemia based on bioinformatics analysis. *Transl Cancer Res*, 11, 1722-1729.
- Cheung, K. L., R. Jarrett, S. Subramaniam, M. Salimi, D. Gutowska-Owsiak, Y. L. Chen, C. Hardman, L. Xue, V. Cerundolo & G. Ogg (2016) Psoriatic T cells recognize neolipid antigens generated by mast cell phospholipase delivered by exosomes and presented by CD1a. *J Exp Med*, 213, 2399-2412.
- Clark, R. A., B. Chong, N. Mirchandani, N. K. Brinster, K. Yamanaka, R. K. Dowgiert & T. S. Kupper (2006) The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*, 176, 4431-9.
- Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Thery & G. Raposo (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, 126, 5553-65.
- Colombo, M., G. Raposo & C. Thery (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- Cristofolletti, C., A. Bresin, M. Fioretti, G. Russo & M. G. Narducci (2022) Combined High-Throughput Approaches Reveal the Signals Driven by Skin and Blood Environments and Define the Tumor Heterogeneity in Sézary Syndrome. *Cancers (Basel)*, 14.
- Culley, F. J., Johnson, M. Evans. 2009. Natural Killer cell signal integration balances synapse symmetry and migração .
- Demierre, M. F., S. Gan, J. Jones & D. R. Miller (2006) Significant impact of cutaneous T-cell lymphoma on patients' quality of life: results of a 2005 National Cutaneous Lymphoma Foundation Survey. *Cancer*, 107, 2504-11.
- Di Raimondo, C., Z. Han, C. Su, X. Wu, H. Qin, J. F. Sanchez, Y. C. Yuan, X. Martinez, F. Abdulla, J. Zain, C. W. Chen, S. T. Rosen & C. Querfeld (2021) Identification of a Distinct miRNA Regulatory Network in the Tumor Microenvironment of Transformed Mycosis Fungoides. *Cancers (Basel)*, 13.
- Du, X., Q. Zhang, S. Wang, X. Chen & Y. Wang (2022) MCAM is associated with metastasis and poor prognosis in osteosarcoma by modulating tumor cell migration. *J Clin Lab Anal*, 36, e24214.
- Dummer, R., M. H. Vermeer, J. J. Scarisbrick, Y. H. Kim, C. Stonesifer, C. P. Tensen, L. J. Geskin, P. Quaglino & E. Ramelyte (2021) Cutaneous T cell lymphoma. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 61.
- Echchakir, H., M. Bagot, G. Dorothée, D. Martinvalet, S. Le Gouvello, L. Boumsell, S. Chouaib, A. Bensussan & F. Mami-Chouaib (2000) Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol*, 115, 74-80.
- Elias, P. M. & J. S. Wakefield (2014) Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134, 781-791.e1.
- Eriksen, K. W., K. Kaltoft, G. Mikkelsen, M. Nielsen, Q. Zhang, C. Geisler, M. H. Nissen, C. Ropke, M. A. Wasik & N. Odum (2001) Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells. *Leukemia*, 15, 787-93.
- Eyerich, S., K. Eyerich, C. Traidl-Hoffmann & T. Biedermann (2018) Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol*, 39, 315-327.
- Ferenczi, K., R. C. Fuhlbrigge, J. Pinkus, G. S. Pinkus & T. S. Kupper (2002) Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, 119, 1405-10.
- Fredholm, S., A. Willerslev-Olsen, Ö. Met, L. Kubat, M. Glud, S. L. Mathiasen, C. Friese, E. Blümel, D. L. Petersen, T. Hu, C. Nastasi, L. M. Lindahl, T. B. Buus, T. Krejsgaard, M. A. Wasik, K. L. Kopp, S. B. Koralov, J. L. Persson, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann,

- L. Iversen, J. C. Becker & N. Ødum (2018) SATB1 in Malignant T Cells. *J Invest Dermatol*, 138, 1805-1815.
- Fried, I. & L. Cerroni (2012) FOXP3 in sequential biopsies of progressive mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol*, 34, 263-5.
- Fromme, J. E. & P. Zigrino (2022) The Role of Extracellular Matrix Remodeling in Skin Tumor Progression and Therapeutic Resistance. *Front Mol Biosci*, 9, 864302.
- Fuchs, E. & D. W. Cleveland (1998) A Structural Scaffolding of Intermediate Filaments in Health and Disease. *Science*, 279, 514-519.
- Fuchs, E. & H. Green (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19, 1033-42.
- Furudate, S., T. Fujimura, A. Kakizaki, Y. Kambayashi, M. Asano, A. Watabe & S. Aiba (2016) The possible interaction between periostin expressed by cancer stroma and tumor-associated macrophages in developing mycosis fungoides. *Exp Dermatol*, 25, 107-12.
- Gao, Y., F. Liu, J. Sun, Y. Wen, P. Tu, M. E. Kadin & Y. Wang (2021) Differential SATB1 Expression Reveals Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*, 141, 607-618.e6.
- Gardiner, C., D. Di Vizio, S. Sahoo, C. Théry, K. W. Witwer, M. Wauben & A. F. Hill (2016) Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*, 5, 32945.
- Gazdar, A. F., D. N. Carney, P. A. Bunn, E. K. Russell, E. S. Jaffe, G. P. Schechter & J. G. Guccion (1980) Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*, 55, 409-17.
- Gill, R. P. K., J. Gantchev, A. Martínez Villarreal, B. Ramchatesingh, E. Netchiporouk, O. E. Akilov, N. Ødum, R. Gniadecki, S. B. Koralov & I. V. Litvinov (2022) Understanding Cell Lines, Patient-Derived Xenograft and Genetically Engineered Mouse Models Used to Study Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Cells*, 11.
- Ginini, L., S. Billan, E. Fridman & Z. Gil (2022) Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells*, 11.
- Giordano, M., D. O. Croci & G. A. Rabinovich (2013) Galectins in hematological malignancies. *Curr Opin Hematol*, 20, 327-35.
- Gluud, M., S. Fredholm, E. Blümel, A. Willerslev-Olsen, T. B. Buus, C. Nastasi, T. Krejsgaard, C. M. Bonefeld, A. Woetmann, L. Iversen, T. Litman, C. Geisler, N. Ødum & L. M. Lindahl (2021) MicroRNA-93 Targets p21 and Promotes Proliferation in Mycosis Fungoides T Cells. *Dermatology*, 237, 277-282.
- Gluud, M., A. Willerslev-Olsen, L. M. R. Gjerdrum, L. M. Lindahl, T. B. Buus, M. H. Andersen, C. M. Bonefeld, T. Krejsgaard, I. V. Litvinov, L. Iversen, J. C. Becker, J. L. Persson, S. B. Koralov, T. Litman, C. Geisler, A. Woetmann & N. Odum (2020) MicroRNAs in the Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Targeted Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Cancers (Basel)*, 12.
- Grabbe, S., G. Varga, S. Beissert, M. Steinert, G. Pendl, S. Seeliger, W. Bloch, T. Peters, T. Schwarz, C. Sunderkötter & K. Scharffetter-Kochanek (2002) Beta2 integrins are required for skin homing of primed T cells but not for priming naive T cells. *J Clin Invest*, 109, 183-92.
- Grzanka, A., D. Grzanka, M. Gagat, T. Tadrowski, M. Sokołowska-Wojdyło, A. Marszałek & W. Placek (2012) Correlation of SATB1 expression with clinical course of cutaneous T-cell lymphomas. *Pol J Pathol*, 63, 101-5.
- Grzanka, D., M. Gagat, M. Izdebska & A. Marszałek (2015) Expression of special AT-rich sequence-binding protein 1 is an independent prognostic factor in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncol Rep*, 33, 250-66.
- Han, Z., R. J. Estephan, X. Wu, C. Su, Y. C. Yuan, H. Qin, S. H. Kil, C. Morales, D. Schmolze, J. F. Sanchez, L. Tian, J. Yu, M. Kortylewski, S. T. Rosen & C. Querfeld (2022) MicroRNA Regulation of T-Cell Exhaustion in Cutaneous T Cell Lymphoma. *J Invest Dermatol*, 142, 603-612.e7.

- Heid, J. B., A. Schmidt, N. Oberle, S. Goerdts, P. H. Krammer, E. Suri-Payer & C. D. Klemke (2009) FOXP3+CD25- tumor cells with regulatory function in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol*, 129, 2875-85.
- Henry, J., C. Y. Hsu, M. Haftek, R. Nachat, H. D. de Koning, I. Gardinal-Galera, K. Hitomi, S. Balica, C. Jean-Decoster, A. M. Schmitt, C. Paul, G. Serre & M. Simon (2011) Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *Faseb j*, 25, 1567-76.
- Hong, S. W., E. B. Choi, T. K. Min, J. H. Kim, M. H. Kim, S. G. Jeon, B. J. Lee, Y. S. Gho, Y. K. Jee, B. Y. Pyun & Y. K. Kim (2014) An important role of α -hemolysin in extracellular vesicles on the development of atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 9, e100499.
- Hong, S. W., M. R. Kim, E. Y. Lee, J. H. Kim, Y. S. Kim, S. G. Jeon, J. M. Yang, B. J. Lee, B. Y. Pyun, Y. S. Gho & Y. K. Kim (2011) Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy*, 66, 351-9.
- Hoshino, A., B. Costa-Silva, T. L. Shen, G. Rodrigues, A. Hashimoto, M. Tesic Mark, H. Molina, S. Kohsaka, A. Di Giannatale, S. Ceder, S. Singh, C. Williams, N. Soplod, K. Uryu, L. Pharmed, T. King, L. Bojmar, A. E. Davies, Y. Ararso, T. Zhang, H. Zhang, J. Hernandez, J. M. Weiss, V. D. Dumont-Cole, K. Kramer, L. H. Wexler, A. Narendran, G. K. Schwartz, J. H. Healey, P. Sandstrom, K. J. Latori, E. H. Kure, P. M. Grandgenett, M. A. Hollingsworth, M. de Sousa, S. Kaur, M. Jain, K. Mallya, S. K. Batra, W. R. Jarnagin, M. S. Brady, O. Fodstad, V. Muller, K. Pantel, A. J. Minn, M. J. Bissell, B. A. Garcia, Y. Kang, V. K. Rajasekhar, C. M. Ghajar, I. Matei, H. Peinado, J. Bromberg & D. Lyden (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527, 329-35.
- Hsi, A. C., S. J. Lee, I. S. Rosman, K. R. Carson, A. Kelley, V. Viele, X. Pang, A. Musiek & A. Schaffer (2015) Expression of helper T cell master regulators in inflammatory dermatoses and primary cutaneous T-cell lymphomas: diagnostic implications. *J Am Acad Dermatol*, 72, 159-67.
- Huang, Y. G., Y. Wang, R. J. Zhu, K. Tang, X. B. Tang & X. M. Su (2021) EMS1/DLL4-Notch Signaling Axis Augments Cell Cycle-Mediated Tumorigenesis and Progress in Human Adrenocortical Carcinoma. *Front Oncol*, 11, 771579.
- Hyenne, V., O. Lefebvre & J. G. Goetz (2017) Going live with tumor exosomes and microvesicles. *Cell Adh Migr*, 1-14.
- Iliadis, A., T. Koletsa, A. Patsatsi, E. Georgiou, D. Sotiriadis & I. Kostopoulos (2016) The cellular microenvironment and neoplastic population in mycosis fungoides skin lesions: a clinicopathological correlation. *Eur J Dermatol*, 26, 566-571.
- Jeppesen, D. K., A. M. Fenix, J. L. Franklin, J. N. Higginbotham, Q. Zhang, L. J. Zimmerman, D. C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W. H. Fissell, J. G. Patton, L. H. Rome, D. T. Burnette & R. J. Coffey (2019) Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177, 428-445.e18.
- Jiang, M., H. Fang, S. Shao, E. Dang, J. Zhang, P. Qiao, A. Yang & G. Wang (2019) Keratinocyte exosomes activate neutrophils and enhance skin inflammation in psoriasis. *Faseb j*, 33, 13241-13253.
- Jiao, Q., L. Yue, L. Zhi, Y. Qi, J. Yang, C. Zhou & Y. Jia (2022) Studies on stratum corneum metabolism: function, molecular mechanism and influencing factors. *J Cosmet Dermatol*, 21, 3256-3264.
- Jones, M. T., S. W. Manioci & A. E. Russell (2022) Size Exclusion Chromatography for Separating Extracellular Vesicles from Conditioned Cell Culture Media. *J Vis Exp*.
- Jun, S. H., J. H. Lee, S. I. Kim, C. W. Choi, T. I. Park, H. R. Jung, J. W. Cho, S. H. Kim & J. C. Lee (2017) *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles exacerbate skin inflammation in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*, 47, 85-96.
- Kalra, H., R. J. Simpson, H. Ji, E. Aikawa, P. Altevogt, P. Askenase, V. C. Bond, F. E. Borrás, X. Breakefield, V. Budnik, E. Buzas, G. Camussi, A. Clayton, E. Cocucci, J. M. Falcon-Perez, S. Gabrielsson, Y. S. Gho, D. Gupta, H. C. Harsha, A. Hendrix, A. F. Hill, J. M. Inal, G. Jenster, E. M. Kramer-Albers, S. K. Lim, A. Llorente, J. Lotvall, A. Marcilla, L. Mincheva-

- Nilsson, I. Nazarenko, R. Nieuwland, E. N. Nolte-'t Hoen, A. Pandey, T. Patel, M. G. Piper, S. Pluchino, T. S. Prasad, L. Rajendran, G. Raposo, M. Record, G. E. Reid, F. Sanchez-Madrid, R. M. Schifflers, P. Siljander, A. Stensballe, W. Stoorvogel, D. Taylor, C. Thery, H. Valadi, B. W. van Balkom, J. Vazquez, M. Vidal, M. H. Wauben, M. Yanez-Mo, M. Zoeller & S. Mathivanan (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*, 10, e1001450.
- Kaltoft, K., S. Bisballe, T. Dyrberg, E. Boel, P. B. Rasmussen & K. Thestrup-Pedersen (1992) Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28a, 161-7.
- Kawamoto, E., A. Masui-Ito, A. Eguchi, Z. Y. Soe, O. Prajuabjinda, S. Darkwah, E. J. Park, H. Imai & M. Shimaoka (2019) Integrin and PD-1 Ligand Expression on Circulating Extracellular Vesicles in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Shock*, 52, 13-22.
- Kim, J., B. H. Bin, E. J. Choi, H. G. Lee, T. R. Lee & E. G. Cho (2019) Staphylococcus aureus-derived extracellular vesicles induce monocyte recruitment by activating human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *Clin Exp Allergy*, 49, 68-81.
- Kinoshita, T. (2016) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *J Lipid Res*, 57, 4-5.
- Kopp, K. L., U. Ralfkiaer, L. M. Gjerdrum, R. Helvad, I. H. Pedersen, T. Litman, L. Jønson, P. H. Hagedorn, T. Krejsgaard, R. Gniadecki, C. M. Bonefeld, L. Skov, C. Geisler, M. A. Wasik, E. Ralfkiaer, N. Ødum & A. Woetmann (2013a) STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cell Cycle*, 12, 1939-47.
- Kopp, K. L., U. Ralfkiaer, B. S. Nielsen, R. Gniadecki, A. Woetmann, N. Odum & E. Ralfkiaer (2013b) Expression of miR-155 and miR-126 in situ in cutaneous T-cell lymphoma. *Apmis*, 121, 1020-4.
- Krejsgaard, T., C. S. Vetter-Kauczok, A. Woetmann, P. Lovato, T. Labuda, K. W. Eriksen, Q. Zhang, J. C. Becker & N. Odum (2006) Jak3- and JNK-dependent vascular endothelial growth factor expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia*, 20, 1759-66.
- Laukkanen, K., M. Saarinen, F. Mallet, M. Aatonen, A. Hau & A. Ranki (2020) Cutaneous T-Cell Lymphoma (CTCL) Cell Line-Derived Extracellular Vesicles Contain HERV-W-Encoded Fusogenic Syncytin-1. *J Invest Dermatol*, 140, 1466-1469.e4.
- Li, B., Y. Song, T. J. Liu, Y. B. Cui, Y. Jiang, Z. S. Xie & S. L. Xie (2013) miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9. *Oncol Rep*, 29, 1932-8.
- Li, Y., L. Meng, B. Li, T. Shen & B. Zhao (2022) The Exosome Journey: From Biogenesis to Regulation and Function in Cancers. *J Oncol*, 2022, 9356807.
- Lindahl, L. M., S. Fredholm, C. Joseph, B. S. Nielsen, L. Jonson, A. Willerslev-Olsen, M. Gluud, E. Blumel, D. L. Petersen, N. Sibbesen, T. Hu, C. Nastasi, T. Krejsgaard, D. Jaehger, J. L. Persson, N. Mongan, M. A. Wasik, I. V. Litvinov, D. Sasseville, S. B. Koralov, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann, E. Ralfkiaer, L. Iversen & N. Odum (2016) STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget*.
- Liu, L., H. Zhu, P. Wang & S. Wu (2022) Construction of a Six-Gene Prognostic Risk Model Related to Hypoxia and Angiogenesis for Cervical Cancer. *Front Genet*, 13, 923263.
- Liu, Y., Y. Gu & X. Cao (2015) The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology*, 4, e1027472.
- Liu, Z., H. Wu & S. Huang (2021) Role of NGF and its receptors in wound healing (Review). *Exp Ther Med*, 21, 599.
- López-Pacheco, C., A. Bedoya-López, R. Olguín-Alor & G. Soldevila. 2021. Analysis of Tumor-Derived Exosomes by Nanoscale Flow Cytometry. In *Cancer Cell Signaling: Methods and Protocols*, ed. M. Robles-Flores, 171-191. New York, NY: Springer US.
- Matsuda, Y., S. Ikeda, F. Abe, Y. Takahashi, A. Kitadate, N. Takahashi, H. Wakui & H. Tagawa (2022) Downregulation of miR-26 promotes invasion and metastasis via targeting interleukin-22 in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Sci*, 113, 1208-1219.

- Mazur, G., Z. Woźniak, T. Wróbel, J. Maj & K. Kuliczowski (2004) Increased angiogenesis in cutaneous T-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res*, 10, 34-6.
- Mirvish, E. D., R. G. Pomerantz & L. J. Geskin (2011) Infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*, 64, 423-31.
- Miyagaki, T. & M. Sugaya (2011) Erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: how to differentiate this rare disease from atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 64, 1-6.
- Miyagaki, T., M. Sugaya, T. Oka, N. Takahashi, M. Kawaguchi, H. Suga, H. Fujita, A. Yoshizaki, Y. Asano & S. Sato (2017) Placental Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Together Regulate Tumour Progression via Increased Vasculature in Cutaneous T Cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*.
- Miyagaki, T., M. Sugaya, H. Suga, K. Akamata, H. Ohmatsu, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono & S. Sato (2012) Angiogenin levels are increased in lesional skin and sera in patients with erythrodermic cutaneous T cell lymphoma. *Arch Dermatol Res*, 304, 401-6.
- Moltrasio, C., M. Romagnuolo & A. V. Marzano (2022) Epigenetic Mechanisms of Epidermal Differentiation. *Int J Mol Sci*, 23.
- Moosbrugger-Martinez, V., C. Leprince, M. C. Méchin, M. Simon, S. Blunder, R. Gruber & S. Dubrac (2022) Revisiting the Roles of Filaggrin in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci*, 23.
- Morales-Kastresana, A., B. Telford, T. A. Musich, K. McKinnon, C. Clayborne, Z. Braig, A. Rosner, T. Demberg, D. C. Watson, T. S. Karpova, G. J. Freeman, R. H. DeKruyff, G. N. Pavlakis, M. Terabe, M. Robert-Guroff, J. A. Berzofsky & J. C. Jones (2017) Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Sci Rep*, 7, 1878.
- Moyal, L., C. Arkin, B. Gorovitz-Haris, C. Querfeld, S. Rosen, J. Knaneh, I. Amitay-Laish, H. Pragnaveh, J. Jacob-Hirsch & E. Hodak (2021) Mycosis fungoides-derived exosomes promote cell motility and are enriched with microRNA-155 and microRNA-1246, and their plasma-cell-free expression may serve as a potential biomarker for disease burden. *Br J Dermatol*, 185, 999-1012.
- Moyal, L., S. Yehezkel, B. Gorovitz, A. Keren, A. Gilhar, I. Lubin, S. Sherman & E. Hodak (2017) Oncogenic role of microRNA-155 in mycosis fungoides: an in vitro and xenograft mouse model study. *Br J Dermatol*, 177, 791-800.
- Murata, T., T. Honda, A. Mostafa & K. Kabashima (2022) Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes. *Trends Mol Med*, 28, 350-359.
- Najafi, M., N. Hashemi Goradel, B. Farhood, E. Salehi, M. S. Nashtaei, N. Khanlarkhani, Z. Khezri, J. Majidpoor, M. Abouzaripour, M. Habibi, I. R. Kashani & K. Mortezaee (2019) Macrophage polarity in cancer: A review. *J Cell Biochem*, 120, 2756-2765.
- Nakajima, R., T. Miyagaki, H. Kamijo, T. Oka, N. Shishido-Takahashi, H. Suga, M. Sugaya & S. Sato (2018) Decreased progranulin expression in Mycosis fungoides: a possible association with the high frequency of skin infections. *Eur J Dermatol*, 28, 790-794.
- (2019) Possible therapeutic applicability of galectin-9 in cutaneous T-cell lymphoma. *J Dermatol Sci*, 96, 134-142.
- Netchiporouk, E., J. Gantchev, M. Tsang, P. Thibault, A. K. Watters, J. M. Hughes, F. M. Ghazawi, A. Woetmann, N. Ødum, D. Sasseville & I. V. Litvinov (2017) Analysis of CTCL cell lines reveals important differences between mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Oncotarget*, 8, 95981-95998.
- Nickoloff, B. J. & E. M. Griffiths (1990) Abnormal cutaneous topobiology: the molecular basis for dermatopathologic mononuclear cell patterns in inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol*, 95, 128s-131s.
- Nielsen, M., C. G. Kaestel, K. W. Eriksen, A. Woetmann, T. Stokkedal, K. Kaltoft, C. Geisler, C. Röpke & N. Odum (1999) Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*, 13, 735-8.
- Nollet, M., R. Bachelier, A. Joshkon, W. Traboulsi, A. Mahieux, A. Moyon, A. Muller, I. Somasundaram, S. Simoncini, F. Peiretti, A. S. Leroyer, B. Guillet, B. Granel, F. Dignat-

- George, N. Bardin, A. Foucault-Bertaud & M. Blot-Chabaud (2022) Involvement of Multiple Variants of Soluble CD146 in Systemic Sclerosis: Identification of a Novel Profibrotic Factor. *Arthritis Rheumatol*, 74, 1027-1038.
- Obu, S., K. Umeda, H. Ueno, M. Sonoda, K. Tasaka, H. Ogata, K. Kouzuki, S. Nodomi, S. Saida, I. Kato, H. Hiramatsu, T. Okamoto, E. Ogawa, H. Okajima, K. Morita, Y. Kamikubo, K. Kawaguchi, K. Watanabe, H. Iwafuchi, S. Yagyu, T. Iehara, H. Hosoi, T. Nakahata, S. Adachi, S. Uemoto, T. Heike & J. Takita (2021) CD146 is a potential immunotarget for neuroblastoma. *Cancer Sci*, 112, 4617-4626.
- Osteikoetxea, X., B. Sódar, A. Németh, K. Szabó-Taylor, K. Pálóczi, K. V. Vukman, V. Tamási, A. Balogh, Á. Kittel, É. Pállinger & E. I. Buzás (2015) Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem*, 13, 9775-82.
- Parish, C. R. (1999) Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology & Cell Biology*, 77, 499-508.
- Park, S. Y., S. Yoon, E. G. Sun, R. Zhou, J. A. Bae, Y. W. Seo, J. I. Chae, M. J. Paik, H. H. Ha, H. Kim & K. K. Kim (2017) Glycoprotein 90K Promotes E-Cadherin Degradation in a Cell Density-Dependent Manner via Dissociation of E-Cadherin-p120-Catenin Complex. *Int J Mol Sci*, 18.
- Pathan, M., P. Fonseka, S. V. Chitti, T. Kang, R. Sanwlani, J. Van Deun, A. Hendrix & S. Mathivanan (2019) Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res*, 47, D516-d519.
- Pedersen, I. H., A. Willerslev-Olsen, C. Vetter-Kauczok, T. Krejsgaard, B. Lauenborg, K. L. Kopp, C. Geisler, C. M. Bonefeld, Q. Zhang, M. A. Wasik, S. Dabelsteen, A. Woetmann, J. C. Becker & N. Odum (2013) Vascular endothelial growth factor receptor-3 expression in mycosis fungoides. *Leuk Lymphoma*, 54, 819-26.
- Perez-Villar, J. J., I. Melero, A. Gismondi, A. Santoni & M. Lopez-Botet (1996) Functional analysis of alpha 1 beta 1 integrin in human natural killer cells. *Eur J Immunol*, 26, 2023-9.
- Phanse, Y., A. E. Ramer-Tait, S. L. Friend, B. Carrillo-Conde, P. Lueth, C. J. Oster, G. J. Phillips, B. Narasimhan, M. J. Wannemuehler & B. H. Bellaire (2012) Analyzing cellular internalization of nanoparticles and bacteria by multi-spectral imaging flow cytometry. *J Vis Exp*, e3884.
- Piccolo, E., N. Tinari, D. Semeraro, S. Traini, I. Fichera, A. Cumashi, R. La Sorda, F. Spinella, A. Bagnato, R. Lattanzio, M. D'Egidio, A. Di Risio, P. Stampolidis, M. Piantelli, C. Natoli, A. Ullrich & S. Iacobelli (2013) LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. *J Mol Med (Berl)*, 91, 83-94.
- Pietrowska, M., A. Wlosowicz, M. Gawin & P. Widlak (2019) MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol*, 1073, 57-76.
- Posner, L. E., B. E. Fossieck, Jr., J. L. Eddy & P. A. Bunn, Jr. (1981) Septicemic complications of the cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Med*, 71, 210-6.
- Rassek, K. & K. Izykowska (2020) Single-Cell Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphomas Revealed Using RNA-Seq Technologies. *Cancers (Basel)*, 12.
- Rivitti, E. A. 2018. *Dermatologia de Sampaio e Rivitti*. São Paulo: Artes Médicas.
- Rocha, S. F., M. Schiller, D. Jing, H. Li, S. Butz, D. Vestweber, D. Biljes, H. C. Drexler, M. Nieminen-Kelhä, P. Vajkoczy, S. Adams, R. Benedito & R. H. Adams (2014) Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circ Res*, 115, 581-90.
- Roediger, B. & C. Schlapbach (2022) T cells in the skin: Lymphoma and inflammatory skin disease. *J Allergy Clin Immunol*, 149, 1172-1184.
- Royston, J. P. (1982) An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, 31, 115-124.

- Sakamoto, M., T. Miyagaki, H. Kamijo, T. Oka, N. Takahashi, H. Suga, A. Yoshizaki, Y. Asano, M. Sugaya & S. Sato (2018) Serum vascular endothelial growth factor A levels reflect itch severity in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Dermatol*, 45, 95-99.
- Samimi, S., B. Benoit, K. Evans, E. J. Wherry, L. Showe, M. Wysocka & A. H. Rook (2010) Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol*, 146, 1382-8.
- Sant'Anna Addor, F. A. & V. Aoki. 2010. Barreira cutânea na dermatite atópica. Anais Brasileiros de Dermatologia SBD.
- Schlapbach, C., A. Ochsenbein, U. Kaelin, A. S. Hassan, R. E. Hunger & N. Yawalkar (2010) High numbers of DC-SIGN+ dendritic cells in lesional skin of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*, 62, 995-1004.
- Schäfer, B. W., R. Wicki, D. Engelkamp, M. G. Mattei & C. W. Heizmann (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*, 25, 638-43.
- Shao, S., H. Fang, Q. Li & G. Wang (2020) Extracellular vesicles in Inflammatory Skin Disorders: from Pathophysiology to Treatment. *Theranostics*, 10, 9937-9955.
- Shao, Y., Y. Shen, T. Chen, F. Xu, X. Chen & S. Zheng (2016) The functions and clinical applications of tumor-derived exosomes. *Oncotarget*, 7, 60736-60751.
- Sharma, A., A. Joshkon, A. Ladjimi, W. Traboulsi, R. Bachelier, S. Robert, A. Foucault-Bertaud, A. S. Leroyer, N. Bardin, I. Somasundaram & M. Blot-Chabaud (2022) Soluble CD146 as a Potential Target for Preventing Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Growth and Dissemination. *Int J Mol Sci*, 23.
- Shi, Y., D. Tang, X. Li, X. Xie, Y. Ye & L. Wang (2022) Galectin Family Members: Emerging Novel Targets for Lymphoma Therapy? *Front Oncol*, 12, 889034.
- Shu, S., C. L. Allen, S. Benjamin-Davalos, M. Koroleva, D. MacFarland, H. Minderman & M. S. Ernstoff (2021) A Rapid Exosome Isolation Using Ultrafiltration and Size Exclusion Chromatography (REIUS) Method for Exosome Isolation from Melanoma Cell Lines. *Methods Mol Biol*, 2265, 289-304.
- Shu, S., Y. Yang, C. L. Allen, E. Hurley, K. H. Tung, H. Minderman, Y. Wu & M. S. Ernstoff (2020) Purity and yield of melanoma exosomes are dependent on isolation method. *J Extracell Vesicles*, 9, 1692401.
- Sommer, V. H., O. J. Clemmensen, O. Nielsen, M. Wasik, P. Lovato, C. Brender, K. W. Eriksen, A. Woetmann, C. G. Kaestel, M. H. Nissen, C. Ropke, S. Skov & N. Ødum (2004) In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*, 18, 1288-95.
- Steinert, P. M. & L. N. Marekov (1995) The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 270, 17702-11.
- Stolarenco, V., M. R. J. Namini, S. S. Hasselager, M. Gluud, T. B. Buus, A. Willerslev-Olsen, N. Ødum & T. Krejsgaard (2020) Cellular Interactions and Inflammation in the Pathogenesis of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Cell Dev Biol*, 8, 851.
- Suga, H., M. Sugaya, T. Miyagaki, H. Ohmatsu, H. Fujita, S. Kagami, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono & S. Sato (2013) Association of nerve growth factor, chemokine (C-C motif) ligands and immunoglobulin E with pruritus in cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol*, 93, 144-9.
- Suga, H., M. Sugaya, T. Miyagaki, H. Ohmatsu, M. Kawaguchi, N. Takahashi, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono & S. Sato (2014) Skin barrier dysfunction and low antimicrobial peptide expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 20, 4339-48.
- Sugaya, M., T. Miyagaki, H. Ohmatsu, H. Suga, H. Kai, M. Kamata, H. Fujita, Y. Asano, Y. Tada, T. Kadono, H. Okochi & S. Sato (2012) Association of the numbers of CD163(+) cells in

- lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci*, 68, 45-51.
- Takahashi, N., M. Sugaya, H. Suga, T. Oka, M. Kawaguchi, T. Miyagaki, H. Fujita & S. Sato (2016) Thymic Stromal Chemokine TSLP Acts through Th2 Cytokine Production to Induce Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancer Res*, 76, 6241-6252.
- Thery, C., M. Ostrowski & E. Segura (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9, 581-93.
- Thode, C., A. Woetmann, H. H. Wandall, M. C. Carlsson, K. Qvortrup, C. S. Kauczok, M. Wobser, A. Printzlau, N. Odum & S. Dabelsteen (2015) Malignant T cells secrete galectins and induce epidermal hyperproliferation and disorganized stratification in a skin model of cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, 135, 238-246.
- Thyssen, J. P., I. Jakasa, C. Riethmüller, M. P. Schön, A. Braun, M. Haftek, P. G. Fallon, J. Wróblewski, H. Jakubowski, L. Eckhart, W. Declercq, S. Koppes, K. A. Engebretsen, C. Bonefeld, A. D. Irvine, S. Keita-Alassane, M. Simon, H. Kawasaki, A. Kubo, M. Amagai, T. Matsui & S. Kezic (2020) Filaggrin Expression and Processing Deficiencies Impair Corneocyte Surface Texture and Stiffness in Mice. *J Invest Dermatol*, 140, 615-623.e5.
- Théry, C., K. W. Witwer, E. Aikawa, M. J. Alcaraz, J. D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G. K. Atkin-Smith, D. C. Ayre, J. M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N. N. Bauer, A. A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A. C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F. E. Borràs, S. Bosch, C. M. Boulanger, X. Breakefield, A. M. Breglio, M. Brennan, D. R. Brigstock, A. Brisson, M. L. Broekman, J. F. Bromberg, P. Bryl-Górecka, S. Buch, A. H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E. I. Buzás, J. B. Byrd, G. Camussi, D. R. Carter, S. Caruso, L. W. Chamley, Y. T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A. R. Chin, A. Clayton, S. P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R. J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F. A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M. F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E. F. De Santana, O. De Wever, H. A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L. C. Dieterich, V. Dolo, A. P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M. R. Dourado, T. A. Driedonks, F. V. Duarte, H. M. Duncan, R. M. Eichenberger, K. Ekström, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrügger, J. M. Falcón-Pérez, F. Fatima, J. E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Försonits, A. Frelet-Barrand, et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7, 1535750.
- Tian, Y., M. Gong, Y. Hu, H. Liu, W. Zhang, M. Zhang, X. Hu, D. Aubert, S. Zhu, L. Wu & X. Yan (2020) Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J Extracell Vesicles*, 9, 1697028.
- Tokura, Y., P. W. Heald, S. L. Yan & R. L. Edelson (1992) Stimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells with superantigenic staphylococcal toxins. *J Invest Dermatol*, 98, 33-7.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger & M. Simons (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319, 1244-7.
- Troullinaki, M., V. I. Alexaki, I. Mitroulis, A. Witt, A. Klotzsche-von Ameln, K. J. Chung, T. Chavakis & M. Economopoulou (2019) Nerve growth factor regulates endothelial cell survival and pathological retinal angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 23, 2362-2371.
- Trzeciak, M., B. Olszewska, M. Sakowicz-Burkiewicz, M. Sokołowska-Wojdyło, J. Jankau, R. J. Nowicki & T. Pawełczyk (2020) Expression Profiles of Genes Encoding Cornified Envelope Proteins in Atopic Dermatitis and Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Nutrients*, 12.
- Trzeciak, M., M. Sakowicz-Burkiewicz, M. Wesserling, D. Dobaczewska, J. Gleń, R. Nowicki & T. Pawełczyk (2017a) Expression of Cornified Envelope Proteins in Skin and Its Relationship with Atopic Dermatitis Phenotype. *Acta Derm Venereol*, 97, 36-41.

- Trzeciak, M., M. Sakowicz-Burkiewicz, M. Wesslering, J. Gleń, D. Dobaczewska, T. Bandurski, R. Nowicki & T. Pawelczyk (2017b) Altered Expression of Genes Encoding Cornulin and Repetin in Atopic Dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*, 172, 11-19.
- Trzeciak, M., M. Wesslering, T. Bandurski, J. Glen, R. Nowicki & T. Pawelczyk (2016) Association of a Single Nucleotide Polymorphism in a Late Cornified Envelope-like Proline-rich 1 Gene (LELP1) with Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 96, 459-63.
- Tune, B. X. J., M. S. Sim, C. L. Poh, R. M. Guad, C. K. Woon, I. Hazarika, A. Das, S. C. B. Gopinath, M. Rajan, M. Sekar, V. Subramaniyan, N. K. Fuloria, S. Fuloria, K. Batumalaie & Y. S. Wu (2022) Matrix Metalloproteinases in Chemoresistance: Regulatory Roles, Molecular Interactions, and Potential Inhibitors. *J Oncol*, 2022, 3249766.
- Tuzova, M., J. Richmond, D. Wolpowitz, C. Curiel-Lewandrowski, K. Chaney, T. Kupper & W. Cruikshank (2015) CCR4+T cell recruitment to the skin in mycosis fungoides: potential contributions by thymic stromal lymphopoietin and interleukin-16. *Leuk Lymphoma*, 56, 440-9.
- Vacca, A., S. Moretti, D. Ribatti, A. Pellegrino, N. Pimpinelli, B. Bianchi, E. Bonifazi, R. Ria, G. Serio & F. Dammacco (1997) Progression of mycosis fungoides is associated with changes in angiogenesis and expression of the matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer*, 33, 1685-92.
- van Doorn, R., M. S. van Kester, R. Dijkman, M. H. Vermeer, A. A. Mulder, K. Szuhai, J. Knijnenburg, J. M. Boer, R. Willemze & C. P. Tensen (2009) Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sezary syndrome. *Blood*, 113, 127-36.
- Viguiier, M., T. Advedissian, D. Delacour, F. Poirier & F. Deshayes (2014) Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers*, 2, e29103.
- Vowels, B. R., M. Cassin, E. C. Vonderheid & A. H. Rook (1992) Aberrant cytokine production by Sezary syndrome patients: cytokine secretion pattern resembles murine Th2 cells. *J Invest Dermatol*, 99, 90-4.
- Vowels, B. R., S. R. Lessin, M. Cassin, C. Jaworsky, B. Benoit, J. T. Wolfe & A. H. Rook (1994) Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, 103, 669-73.
- Wang, F., A. Ziemann & P. A. Coulombe.
- Wang, Y., B. X. Li & X. Li (2021) Identification and Validation of Angiogenesis-Related Gene Expression for Predicting Prognosis in Patients With Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 11, 783666.
- Wang, Y., M. Su, L. L. Zhou, P. Tu, X. Zhang, X. Jiang & Y. Zhou (2011) Deficiency of SATB1 expression in Sezary cells causes apoptosis resistance by regulating FasL/CD95L transcription. *Blood*, 117, 3826-35.
- Watt, F. M. (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*, 81, 100s-3s.
- Wehkamp, U., M. Jost, K. Wehkamp & J. Harder (2020) Dysregulated Expression of Antimicrobial Peptides in Skin Lesions of Patients with Cutaneous T-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*, 100, adv00017.
- Wen, P., Y. Xie & L. Wang (2021) The Role of microRNA in Pathogenesis, Diagnosis, Different Variants, Treatment and Prognosis of Mycosis Fungoides. *Front Oncol*, 11, 752817.
- Wilcox, R. A., A. L. Feldman, D. A. Wada, Z. Z. Yang, N. I. Comfere, H. Dong, E. D. Kwon, A. J. Novak, S. N. Markovic, M. R. Pittelkow, T. E. Witzig & S. M. Ansell (2009) B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood*, 114, 2149-58.
- Wilcoxon, F. (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1, 80-83.
- Willemze, R., L. Cerroni, W. Kempf, E. Berti, F. Facchetti, S. H. Swerdlow & E. S. Jaffe (2019) The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*, 133, 1703-1714.

- Willemze, R., E. Hodak, P. L. Zinzani, L. Specht, M. Ladetto & E. G. Committee (2018) Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 29, iv30-iv40.
- Willemze, R., E. S. Jaffe, G. Burg, L. Cerroni, E. Berti, S. H. Swerdlow, E. Ralfkiaer, S. Chimenti, J. L. Diaz-Perez, L. M. Duncan, F. Grange, N. L. Harris, W. Kempf, H. Kerl, M. Kurrer, R. Knobler, N. Pimpinelli, C. Sander, M. Santucci, W. Sterry, M. H. Vermeer, J. Wechsler, S. Whittaker & C. J. Meijer (2005) WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 105, 3768-85.
- Willerslev-Olsen, A., T. Krejsgaard, L. M. Lindahl, I. V. Litvinov, S. Fredholm, D. L. Petersen, C. Nastasi, R. Gniadecki, N. P. Mongan, D. Sasseville, M. A. Wasik, C. M. Bonefeld, C. Geisler, A. Woetmann, L. Iversen, M. Kilian, S. B. Koralov & N. Odum (2016) Staphylococcal enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, 127, 1287-96.
- Woetmann, A., P. Lovato, K. W. Eriksen, T. Krejsgaard, T. Labuda, Q. Zhang, A. M. Mathiesen, C. Geisler, A. Svejgaard, M. A. Wasik & N. Odum (2007) Nonmalignant T cells stimulate growth of T-cell lymphoma cells in the presence of bacterial toxins. *Blood*, 109, 3325-32.
- Wu, F., J. Yang, G. Shang, Z. Zhang, S. Niu, Y. Liu, H. Liu, J. Jing & Y. Fang (2022) Exosomal miR-224-5p from Colorectal Cancer Cells Promotes Malignant Transformation of Human Normal Colon Epithelial Cells by Promoting Cell Proliferation through Downregulation of CMTM4. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 5983629.
- Wu, X., B. C. Schulte, Y. Zhou, D. Haribhai, A. C. Mackinnon, J. A. Plaza, C. B. Williams & S. T. Hwang (2014) Depletion of M2-like tumor-associated macrophages delays cutaneous T-cell lymphoma development in vivo. *J Invest Dermatol*, 134, 2814-2822.
- Wu, Z., U. Meyer-Hoffert, K. Reithmayer, R. Paus, B. Hansmann, Y. He, J. Bartels, R. Gläser, J. Harder & J. M. Schröder (2009) Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *J Invest Dermatol*, 129, 1446-58.
- Yang, L., L. Jin, Y. Ke, X. Fan, T. Zhang, C. Zhang, H. Bian & G. Wang (2018) E3 Ligase Trim21 Ubiquitylates and Stabilizes Keratin 17 to Induce STAT3 Activation in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 138, 2568-2577.
- Yumeen, S. & M. Girardi (2020) Insights Into the Molecular and Cellular Underpinnings of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Yale J Biol Med*, 93, 111-121.
- Zhang, C., Z. Hu, A. G. Lone, M. Artami, M. Edwards, C. C. Zouboulis, M. Stein & T. A. Harris-Tryon (2022) Small proline-rich proteins (SPRRs) are epidermally produced antimicrobial proteins that defend the cutaneous barrier by direct bacterial membrane disruption. *Elife*, 11.
- Zhang, X., M. Yin & L.-j. Zhang (2019) Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*, 8, 807.
- Zhao, Z. L., C. Liu, Q. Z. Wang, H. W. Wu & J. W. Zheng (2022) Engineered exosomes for targeted delivery of miR-187-3p suppress the viability of hemangioma stem cells by targeting Notch signaling. *Ann Transl Med*, 10, 621.
- Łukaszewicz-Zajac, M., S. Pączek & B. Mroczko (2022) A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Family-Novel Biomarkers of Selected Gastrointestinal (GI) Malignancies? *Cancers (Basel)*, 14.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (1/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
1	P21709	EPHA1	19,4460	19,0253	0,1563	41	P06312		14,2880	13,7735	0,0010
2	O75460	ERN1	17,0509	16,2294	0,0028	42	P10412	H1-4	14,6206	13,2939	0,0079
3	P62249	RPS16	16,6597	16,5074	0,4192	43	P43652	AFM	13,9705	13,8614	0,1416
4	P01619		16,1035	16,1880	0,9182	44	P06276	BCHE	14,0833	13,7166	0,0468
5	P02750	LRG1	16,1309	15,9828	0,1841	45	Q6EMK4	VASN	14,1120	13,6728	0,0043
6	P62851	RPS25	15,7820	16,0897	0,0504	46	P00918	CA2	13,9406	13,8399	0,5678
7	P02790	HPX	15,8545	15,8054	0,5866	47	P43251	BTD	14,1085	13,6606	0,0137
8	P08637	FCGR3A	15,5404	15,6512	0,5235	48	O75144	ICOSLG	14,0801	13,6858	0,0084
9	P04217	A1BG	15,4718	15,3827	0,6749	49	P15153	RAC2	13,7669	13,8707	0,5776
10	P04217	A1BG	15,4060	15,3931	0,9083	50	P00915	CA1	14,0617	13,5720	0,0006
11	P07437	TUBB	15,1146	15,1429	0,8873	51	P78417	GSTO1	13,7111	13,9175	0,3080
12	P61254	RPL26	14,9718	15,1453	0,1173	52	P69905	HBA1, HBA2	13,6815	13,8405	0,1281
13	P00738	HP	15,0219	15,0366	0,8787	53	P05155	SERPING1	13,7360	13,7402	0,9734
14	P01023	A2M	14,5321	15,3806	0,0365	54	Q96PD5	PGLYRP2	13,6884	13,7873	0,4243
15	P62714	PPP2CB	14,7706	15,1409	0,0229	55	P05090	APOD	13,7931	13,6719	0,6471
16	P15880	RPS2	15,0089	14,8693	0,2202	56	Q6ZNG0	ZNF620	13,7292	13,7197	0,9551
17	P20742		14,4899	15,3622	0,0063	57	P00450	CP	13,7887	13,5328	0,0057
18	P51884	LUM	15,0097	14,7802	0,2575	58	P01009	SERPINA1	13,7528	13,5390	0,0797
19	Q8WUX9	CHMP7	14,7517	15,0212	0,2105	59	O95445	APOM	13,7886	13,4979	0,0434
20	P01834		15,1355	14,4870	0,0002	60	P23396	RPS3	13,6691	13,5707	0,1266
21	Q12913	PTPRJ	14,7442	14,6959	0,6229	61	P02765	AHSG	13,7036	13,5303	0,0418
22	Q8TEZ7	PAQR8	12,9267	16,4488	0,0020	62	P01857		13,7934	13,4093	0,2916
23	P35268	RPL22	15,1701	14,1320	0,0002	63	P19652	ORM2	13,5364	13,6593	0,8371
24	P02768	ALB	14,5385	14,5813	0,7105	64	P68871	HBB	13,5351	13,5622	0,7727
25	P02766	TTR	15,0856	14,0283	0,0007	65	P04406	GAPDH	13,2584	13,8382	0,0002
26	O95497	VNN1	14,5958	14,4467	0,3240	66	P0C0L5	C4B, C4B_2	13,8733	13,1916	0,0013
27	P37837	TALDO1	14,3639	14,4955	0,3690	67	Q7Z7G0	ABI3BP	13,7250	13,3366	0,0248
28	P07339	CTSD	14,2417	14,3192	0,6706	68	P01042	KNG1	13,7367	13,2842	0,0001
29	P0CF74		14,5260	14,0186	0,1119	69	P08185	SERPINA6	13,6896	13,3080	0,0027
30	O43432	EIF4G3	14,5719	13,9182	0,0150	70	Q9Y646	CPQ	13,6613	13,3256	0,1064
31	P02656	APOC3	14,9018	13,5830	0,0554	71	P68363	TUBA1B	13,2722	13,6192	0,0074
32	Q9NZP8	C1RL	14,3653	14,0703	0,0805	72	P55209	NAP1L1	13,3189	13,5625	0,1513
33	Q13748	TUBA3CD	13,9703	14,4517	0,2523	73	P20774	OGN	13,3827	13,4984	0,3324
34	P01859		14,3280	14,0759	0,2026	74	P62805	H4C1-12	13,4632	13,3697	0,8013
35	P05543	SERPINA7	14,2485	14,1271	0,1806	75	P01308	INS	13,6849	13,0200	0,1170
36	P60709	ACTB	13,5528	14,8085	0,0000	76	A0A0A0MR		13,3627	13,3356	0,8789
37	P62269	RPS18	13,9986	14,3605	0,0203	77	P10909	CLU	13,5664	13,0657	0,0645
38	P80108	GPLD1	14,2428	14,0098	0,0245	78	P07737	PFN1	13,2602	13,3576	0,2755
39	P62913	RPL11	14,2827	13,9258	0,2523	79	P32970	CD70	13,6319	12,9312	0,0494
40	P02760	AMBP	14,2620	13,8024	0,0002	80	P02749	APOH	13,3627	13,1589	0,1896

APÊNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (2/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
241	P08708	RPS17	11,8164	11,6833	0,3631	281	Q99832	CCT7	11,1949	11,6021	0,0151
242	Q15185	PTGES3	12,8903	10,5767	0,0000	282	P22314	UBA1	11,3549	11,4358	0,5625
243	Q01813	PFKP	11,3639	12,0916	0,0002	283	Q06830	PRDX1	11,6090	11,0979	0,0366
244	P30153	PPP2R1A	11,8482	11,6072	0,3289	284	P62879	GNB2	11,3668	11,3274	0,7195
245	P16070	CD44	12,7938	10,6397	0,0002	285	Q16853	AOC3	11,4832	11,2007	0,0852
246	P61158	ACTR3	11,0299	12,3711	0,0001	286	O43684	BUB3	11,0703	11,6129	0,0003
247	P19823	ITIH2	11,7098	11,6515	0,8234	287	Q96EK6	GNPNAT1	10,5013	12,1215	0,0004
248	P22090	RPS4Y1	11,2918	12,0688	0,0001	288	P08134	RHOC	11,1706	11,4121	0,5298
249	P16930	FAH	11,5949	11,7389	0,2722	289	P40227	CCT6A	11,1359	11,4390	0,1263
250	P62910	RPL32	11,8019	11,5279	0,5119	290	P07359	GP1BA	12,2380	10,3362	0,0090
251	P27695	APEX1	11,5688	11,7475	0,4809	291	P23526	AHCY	11,0874	11,4848	0,0336
252	P49368	CCT3	11,4684	11,8454	0,0281	292	P00751	CFB	11,1600	11,4114	0,1835
253	Q8WZ75	ROBO4	11,7360	11,5426	0,3795	293	P55290	CDH13	11,4699	11,0710	0,0709
254	P60866	RPS20	11,5613	11,7017	0,4902	294	P27635	RPL10	11,1144	11,4175	0,1761
255	Q01459	CTBS	11,7758	11,4655	0,0041	295	P34896	SHMT1	10,2031	12,3232	0,0000
256	Q14141	SEPTIN6	11,8043	11,4365	0,0542	296	Q13347	EIF3I	11,0244	11,4838	0,0504
257	P60953	CDC42	12,1363	11,1026	0,0018	297	P01033	TIMP1	11,7977	10,6699	0,0334
258	P55010	EIF5	11,3552	11,8824	0,0006	298	P35579	MYH9	11,1834	11,2573	0,1416
259	P01877		11,5071	11,6953	0,2306	299	P68104	EEF1A1	11,0099	11,4148	0,0658
260	O15143	ARPC1B	10,6682	12,5253	0,0001	300	P68431	H3C1-12	11,4915	10,9124	0,0781
261	Q9NSD9	FARSB	11,3580	11,8323	0,0009	301	P46778	RPL21	10,9786	11,4053	0,0927
262	Q9Y4D7	PLXND1	11,9445	11,2448	0,0165	302	Q92900	UPF1	10,9971	11,3614	0,0502
263	P46783	RPS10	11,5763	11,6061	0,8840	303	P06748	NPM1	12,0170	10,3406	0,0002
264	Q9NTK5	OLA1	11,5608	11,5669	0,4079	304	P04066	FUCA1	11,2997	11,0568	0,0725
265	Q15019	SEPTIN2	11,5092	11,5891	0,5895	305	P62263	RPS14	11,0955	11,2460	0,1088
266	P04075	ALDOA	11,5584	11,5370	0,8926	306	Q9Y3I0	RTCB	10,4578	11,8687	0,0002
267	Q9HB07		11,4821	11,5788	0,7494	307	P13473	LAMP2	11,8331	10,4933	0,0179
268	P52888	THOP1	11,4181	11,5872	0,2794	308	P54578	USP14	10,6861	11,6245	0,0115
269	P28838	LAP3	12,0161	10,9751	0,0115	309	P26640	VAR51	11,4929	10,8141	0,0036
270	Q6UXB8	PI16	11,9523	11,0340	0,0171	310	Q9UBG0	MRC2	11,4822	10,8177	0,1347
271	P38919	EIF4A3	11,5684	11,3979	0,5135	311	P33992	MCM5	11,4053	10,8918	0,0126
272	B5ME19	EIF3CL	11,2172	11,7318	0,2458	312	P08865	RPSA	10,9480	11,3377	0,1267
273	P13639	EEF2	11,2941	11,6398	0,0839	313	P53999	SUB1	10,9578	11,3217	0,2105
274	P12004	PCNA	12,3803	10,5530	0,0001	314	P48444	ARCN1	10,6243	11,6488	0,0000
275	O00186	STXBP3	11,4769	11,4302	0,8321	315	P54687	BCAT1	8,3001	13,9574	0,0000
276	P62917	RPL8	11,8615	11,0376	0,0020	316	Q9Y230	RUVBL2	11,2905	10,9469	0,0327
277	P05362	ICAM1	11,2523	11,6314	0,0467	317	Q13283	G3BP1	11,0658	11,1708	0,7577
278	Q14213	EBI3	8,6288	14,2081	0,0002	318	P08133	ANXA6	11,7523	10,4336	0,0027
279	P05546	SERPIND1	11,4800	11,3340	0,6461	319	P61026	RAB10	11,4471	10,7282	0,0052
280	Q92598	HSPH1	11,4270	11,3760	0,7850	320	P54289	CACNA2D1	11,2285	10,9395	0,0365

APÊNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (3/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
321	P54577	YARS1	10,9061	11,2587	0,0025	361	Q9UMS4	PRPF19	11,1880	10,4531	0,0160
322	P01008	SERPINC1	11,0496	11,1125	0,4936	362	P46782	RPS5	11,1138	10,5225	0,1474
323	O75533	SF3B1	10,3447	11,8152	0,0000	363	Q14204	DYNC1H1	10,7150	10,8629	0,5492
324	P10768	ESD	11,4228	10,7287	0,0923	364	P0C0S5	H2AZ1	11,3372	10,2385	0,0712
325	P07237	P4HB	11,6219	10,5247	0,0003	365	P27348	YWHAQ	10,9493	10,6224	0,3463
326	P25205	MCM3	11,9343	10,2041	0,0001	366	P52566	ARHGDIB	10,8570	10,7119	0,4079
327	Q14240	EIF4A2	12,3154	9,8229	0,0008	367	P29692	EEF1D	10,5134	11,0416	0,0152
328	Q00610	CLTC	10,9754	11,1558	0,3915	368	P11586	MTHFD1	10,5301	11,0155	0,0077
329	Q16555	DPYSL2	11,2118	10,9150	0,0385	369	P09211	GSTP1	10,6156	10,8866	0,7577
330	P15090	FABP4	11,1676	10,9585	0,2991	370	Q9Y333	LSM2	11,1557	10,3462	0,0009
331	Q99873	PRMT1	10,9536	11,1719	0,2135	371	P84095	RHOG	10,1640	11,2928	0,0060
332	P78371	CCT2	11,0407	11,0701	0,8806	372	P33991	MCM4	11,2033	10,2271	0,0001
333	P06576	ATP5F1B	9,8353	12,2712	0,0000	373	P31146	CORO1A	10,9689	10,4480	0,0033
334	Q9Y265	RUVBL1	11,2211	10,8300	0,0603	374	P48643	CCT5	10,5048	10,9052	0,0110
335	P61160	ACTR2	10,4095	11,6320	0,0001	375	Q9UBE0	SAE1	10,8566	10,5472	0,2480
336	P62277	RPS13	11,4981	10,5427	0,0201	376	P17987	TCP1	10,7061	10,6906	0,9301
337	P36578	RPL4	11,7712	10,2642	0,0002	377	Q9Y285	FARSA	10,2574	11,1256	0,0000
338	Q08380	LGALS3BP	13,3354	8,6922	0,0000	378	Q9Y3F4	STRAP	9,4423	11,9326	0,0000
339	P62841	RPS15	11,0621	10,9378	0,2523	379	P41252	IARS1	10,6286	10,7440	0,7047
340	P62318	SNRPD3	11,0999	10,8744	0,2579	380	Q02878	RPL6	10,8090	10,5613	0,2534
341	P49189	ALDH9A1	10,5397	11,4296	0,1091	381	P04792	HSPB1	8,5796	12,7906	0,0002
342	P49736	MCM2	11,4902	10,4640	0,0021	382	P09960	LTA4H	10,5442	10,8187	0,0745
343	P50990	CCT8	10,8052	11,1399	0,1407	383	Q6UX71	PLXDC2	11,0883	10,2310	0,0011
344	Q13838	DDX39B	11,4525	10,4904	0,0006	384	Q9Y4L1	HYOU1	10,5348	10,7680	0,1318
345	P61163	ACTR1A	9,7549	12,1357	0,0002	385	P16401	H1-5	13,6984	7,5965	0,0000
346	P05556	ITGB1	11,5150	10,3754	0,0159	386	P24534	EEF1B2	10,6827	10,5953	0,8422
347	P02144	MB	10,7347	11,1219	0,0646	387	P36873	PPP1CC	10,2166	11,0519	0,1738
348	O43776	NARS1	10,4979	11,3580	0,0009	388	P55884	EIF3B	10,4327	10,8311	0,1301
349	Q9P258	RCC2	11,4651	10,3692	0,0001	389	P49591	SARS1	10,1567	11,0697	0,0002
350	P60842	EIF4A1	11,7186	10,1041	0,0004	390	Q9Y617	PSAT1	9,5858	11,5878	0,0000
351	Q15233	NONO	11,6794	10,1247	0,0002	391	P04216	THY1	13,1417	8,0201	0,0000
352	P57721	PCBP3	10,6837	11,0703	0,3785	392	P26992	CNTFR	10,7021	10,4064	0,1809
353	P22234	PAICS	10,5948	11,1554	0,0418	393	O75608	LYPLA1	10,2452	10,8606	0,2280
354	P19623	SRM	10,7913	10,9522	0,3316	394	Q09028	RBBP4	10,6822	10,4192	0,3000
355	P15311	EZR	11,4223	10,3104	0,0000	395	P98160	HSPG2	11,0913	9,9667	0,0009
356	Q16186	ADRM1	10,7677	10,9586	0,3554	396	Q02750	MAP2K1	9,5266	11,5181	0,0000
357	Q9UBQ0	VPS29	10,8770	10,8333	0,2991	397	P14866	HNRNPL	10,4893	10,5546	0,7689
358	P62491	RAB11A	10,9852	10,7248	0,6577	398	P42025	ACTR1B	9,7164	11,3242	0,0000
359	O43148	RNMT	11,4444	10,2463	0,0001	399	P12956	XRCC6	10,6095	10,4254	0,2353
360	Q04760	GLO1	10,1264	11,5361	0,0001	400	Q6UXN9	WDR82	10,4679	10,5606	0,7633

APÊNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (4/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
401	P49915	GMPS	11,0852	9,8991	0,0080	441	P31431	SDC4	9,7637	10,5697	0,1738
402	P41091	EIF2S3	10,3284	10,6443	0,2805	442	O95456	PSMG1	10,3060	9,9519	0,1722
403	Q13619	CUL4A	10,3037	10,6647	0,1668	443	Q02790	FKBP4	9,2506	10,9582	0,0000
404	P13760		12,8280	8,1401	0,0000	444	Q04917	YWHAH	10,2720	9,9301	0,4553
405	Q8NCC3	PLA2G15	10,4413	10,4881	0,8490	445	P29965	CD40LG	8,7104	11,4853	0,0008
406	P60033	CD81	10,6904	10,2295	0,2739	446	P18124	RPL7	9,5180	10,6295	0,0842
407	P05455	SSB	9,8092	11,0816	0,0000	447	P53621	COPA	9,9537	10,1778	0,5208
408	P08195	SLC3A2	11,5487	9,3395	0,0007	448	P52597	HNRNPF	11,2103	8,8974	0,0000
409	P63241	EIF5A	10,5864	10,2934	0,0403	449	P00966	ASS1	11,8970	8,2092	0,0000
410	P16152	CBR1	10,8208	10,0309	0,0002	450	P53396	ACLY	10,0245	10,0740	0,8572
411	P19338	NCL	12,2409	8,6002	0,0000	451	P08670	VIM	9,1711	10,9195	0,0001
412	P11908	PRPS2	8,3011	12,5339	0,0000	452	P17812	CTPS1	10,0209	10,0496	0,8918
413	P55786	NPEPPS	9,9927	10,8367	0,0001	453	Q92563	SPOCK2	11,8340	8,2358	0,0000
414	Q9P2J5	LARS1	10,3569	10,4677	0,5724	454	P41250	GARS1	10,0014	10,0679	0,6295
415	P29144	TPP2	10,1189	10,6830	0,3048	455	O15145	ARPC3	8,9637	11,0822	0,0000
416	P51149	RAB7A	10,8442	9,9464	0,0005	456	Q14764	MVP	8,9220	11,1198	0,0002
417	P50991	CCT4	10,1721	10,5995	0,0544	457	P55263	ADK	9,9191	10,1159	0,6426
418	O43175	PHGDH	12,5679	8,1889	0,0000	458	O00571	DDX3X	10,7427	9,2732	0,0004
419	P49327	FASN	10,2313	10,5246	0,1833	459	P30044	PRDX5	9,7778	10,2188	0,0253
420	P09874	PARP1	10,9287	9,7588	0,0002	460	P17174	GOT1	10,0906	9,8426	0,2924
421	O43488	AKR7A2	9,4401	11,2438	0,0002	461	P81605	DCD	9,8536	10,0790	0,8604
422	P40926	MDH2	10,2329	10,4442	0,4910	462	Q9Y490	TLN1	9,9200	10,0123	0,5008
423	P61081	UBE2M	10,2958	10,3696	0,8983	463	P05156	CFI	9,6155	10,2517	0,0061
424	P63151	PPP2R2A	8,6667	11,9870	0,0000	464	Q9BUF5	TUBB6	9,5625	10,2959	0,1101
425	O43172	PRPF4	10,5076	10,1250	0,1726	465	P47897	QARS1	10,1313	9,7175	0,0698
426	P09651	HNRNPA1	10,7398	9,8721	0,0014	466	P18669	PGAM1	9,5942	10,2494	0,0019
427	P07814	EPRS1	10,2494	10,3511	0,6608	467	P06681	C2	9,9489	9,8878	0,7691
428	Q99729	HNRNPAB	9,7043	10,8820	0,0006	468	P21333	FLNA	9,9016	9,9283	0,8468
429	Q99497	PARK7	10,7222	9,8470	0,0098	469	Q13085	ACACA	10,7282	9,0963	0,0002
430	Q86SQ4	ADGRG6	10,8221	9,7152	0,0160	470	O15371	EIF3D	9,6635	10,1607	0,0019
431	P26368	U2AF2	11,0942	9,4005	0,0000	471	P27930	IL1R2	8,6051	11,2171	0,0052
432	Q7KZF4	SND1	10,1376	10,3014	0,3428	472	P42224	STAT1	9,6871	10,1317	0,3112
433	Q16531	DDB1	10,0024	10,4273	0,3820	473	P51991	HNRNPA3	10,8108	8,9940	0,0005
434	Q15181	PPA1	9,9394	10,4850	0,0004	474	O43143	DHX15	10,0053	9,7896	0,3119
435	P07858	CTSB	10,4473	9,9755	0,0858	475	P55058	PLTP	10,2101	9,5835	0,0907
436	P51665	PSMD7	9,9892	10,4291	0,1738	476	O75083	WDR1	9,9241	9,8677	0,7630
437	O43390	HNRNPR	10,1343	10,2811	0,5073	477	P27708	CAD	11,4266	8,3295	0,0000
438	P09661	SNRPA1	9,6488	10,7476	0,0007	478	P34897	SHMT2	8,7233	11,0260	0,0000
439	Q92841	DDX17	10,1498	10,2197	0,7312	479	P45877	PPIC	8,6427	11,0927	0,0016
440	P17844	DDX5	10,9524	9,4128	0,0004	480	Q9BQ52	ELAC2	9,7359	9,9956	0,5126

APÉNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (5/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
481	O00231	PSMD11	9,7013	10,0225	0,4462	521	P49773	HINT1	9,0035	9,9966	0,0387
482	P27694	RPA1	10,6688	9,0507	0,0000	522	P60510	PPP4C	9,6701	9,3298	0,2178
483	P43034	PAFAH1B1	9,5712	10,1318	0,0590	523	Q96FX7	TRMT61A	9,6248	9,3651	0,2514
484	Q9H4A4	RNPEP	9,3801	10,3209	0,0002	524	P62140	PPP1CB	9,0711	9,9145	0,1025
485	P05067	APP	11,8153	7,8690	0,0000	525	P30520	ADSS2	9,5554	9,4288	0,4188
486	P61011	SRP54	9,6858	9,9902	0,1294	526	P49588	AARS1	9,2018	9,7413	0,0513
487	P05107	ITGB2	11,2644	8,4081	0,0000	527	P04222		11,5094	7,4224	0,0000
488	P48147	PREP	10,4128	9,2468	0,0010	528	O95433	AHSA1	10,0574	8,8652	0,0052
489	P20042	EIF2S2	10,0655	9,5859	1,0000	529	P02533	KRT14	9,4669	9,4327	0,9258
490	Q14974	KPNB1	10,2058	9,4225	0,1939	530	P35908	KRT2	9,7024	9,1729	0,3131
491	P02786	TFRC	10,9923	8,6073	0,0000	531	P43487	RANBP1	9,3826	9,4819	0,7635
492	P01903	HLA-DRA	11,2117	8,3665	0,0000	532	P22102	GART	9,5643	9,2978	0,3811
493	Q9UHD8	SEPTIN9	11,1984	8,3708	0,0002	533	P31153	MAT2A	10,1036	8,7568	0,0000
494	P38606	ATP6V1A	10,1738	9,3924	0,0449	534	P52209	PGD	9,7445	9,0311	0,0374
495	Q9Y5B9	SUPT16H	10,6312	8,9307	0,0001	535	P62888	RPL30	10,3274	8,4388	0,0214
496	P13674	P4HA1	10,9963	8,5194	0,0000	536	O15144	ARPC2	9,3285	9,4328	0,6526
497	Q9UBQ7	GRHPR	8,9211	10,5712	0,0000	537	O14744	PRMT5	8,7463	9,9935	0,0001
498	Q99615	DNAJC7	9,4945	9,9721	0,0707	538	P35998	PSMC2	9,0992	9,6374	0,1418
499	Q9NVP1	DDX18	9,1604	10,3007	0,0164	539	P61981	YWHAG	10,1402	8,5892	0,0004
500	Q9NR45	NANS	9,5172	9,9430	0,3211	540	P55769	SNU13	8,8007	9,8954	0,0059
501	O00429	DNM1L	9,3973	10,0561	0,0412	541	P23258	TUBG1	10,0448	8,5458	0,0015
502	P11766	ADH5	10,1867	9,2542	0,0046	542	Q2TAY7	SMU1	9,3248	9,2652	0,7877
503	P00338	LDHA	9,7870	9,6379	0,4781	543	Q9Y262	EIF3L	8,7772	9,7565	0,0142
504	P04264	KRT1	9,7070	9,7098	0,9914	544	Q86VP6	CAND1	8,9452	9,5822	0,0151
505	Q13045	FLII	9,5393	9,8748	0,0342	545	P37802	TAGLN2	9,2566	9,2574	0,9971
506	P35527	KRT9	9,6132	9,7962	0,6079	546	P35244	RPA3	9,0879	9,4101	0,5374
507	P54136	RARS1	9,6531	9,7177	0,6075	547	Q99972	MYOC	10,0589	8,4070	0,0087
508	Q15046	KARS1	9,2810	10,0647	0,0362	548	P26038	MSN	10,1787	8,2329	0,0046
509	P34932	HSPA4	9,3680	9,9727	0,0003	549	P09382	LGALS1	8,5292	9,8812	0,0459
510	O43242	PSMD3	9,6668	9,6627	0,9854	550	Q9BPX5	ARPC5L	8,3517	10,0585	0,0004
511	P33993	MCM7	10,2511	9,0391	0,0000	551	P60891	PRPS1	8,6510	9,7324	0,0030
512	P50552	VASP	9,6651	9,5536	0,6491	552	O60832	DKC1	8,9714	9,3966	0,1637
513	Q9Y316	MEMO1	9,0868	10,0874	0,0094	553	P39748	FEN1	9,8960	8,4652	0,2523
514	P13645	KRT10	9,7366	9,4101	0,3606	554	Q14232	EIF2B1	9,5717	8,7874	0,1448
515	Q14152	EIF3A	9,6329	9,5091	0,5839	555	P62495	ETF1	9,1669	9,1735	0,9821
516	O00303	EIF3F	8,7301	10,3795	0,0000	556	P02538	KRT6A	9,3070	8,9683	0,3593
517	P11940	PABPC1	9,4913	9,6067	0,7335	557	Q99460	PSMD1	8,9046	9,3626	0,3734
518	P43686	PSMC4	9,3670	9,6856	0,4970	558	Q9BXJ9	NAA15	9,1337	9,1086	0,9062
519	Q96DI7	SNRNP40	9,1231	9,8932	0,0028	559	O00487	PSMD14	8,4702	9,7064	0,0071
520	P07093	SERPINE2	10,5990	8,4080	0,0000	560	Q9NUU7	DDX19A	9,4140	8,6767	0,0230

APÉNDICE A – 620 proteínas expressas nas amostras sEV-LCCT (6/6)

Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV Myla2059	Valor de p	Nº	Proteína (ID)	Gene	sEV-Hut78	sEV-Myla2059	Valor de p
561	O60678	PRMT3	8,4351	9,6435	0,0002	601	P15927	RPA2	8,6734	8,0630	0,1542
562	Q9ULC4	MCTS1	10,2047	7,8197	0,0000	602	P62195	PSMC5	8,1753	8,5160	0,3884
563	Q15717	ELAVL1	9,8213	8,1824	0,0006	603	P78406	RAE1	8,4260	8,2595	0,6039
564	Q9HB71	CACYBP	8,3217	9,6679	0,0004	604	P47755	CAPZA2	8,3554	8,3171	0,2991
565	Q9NQR4	NIT2	8,2244	9,7646	0,0003	605	Q9BQA1	WDR77	7,7643	8,8853	0,0968
566	Q92979	EMG1	8,8241	9,1596	0,3120	606	P51659	HSD17B4	8,2064	8,4264	0,5858
567	Q9BS26	ERP44	9,9111	8,0554	0,0001	607	Q96QK1	VPS35	8,3786	8,2476	0,6395
568	Q13200	PSMD2	8,5542	9,4056	0,0239	608	Q9BZQ8	NIBAN1	8,1458	8,4487	0,5274
569	Q01581	HMGCS1	10,4087	7,4985	0,0000	609	Q9NYF8	BCLAF1	8,4565	8,1202	0,2529
570	Q14697	GANAB	9,0595	8,7781	0,4548	610	Q96LI5	CNOT6L	8,0229	8,3053	0,4323
571	Q969U7	PSMG2	8,5686	9,2637	0,0476	611	Q12906	ILF3	8,5104	7,8099	0,2164
572	Q09161	NCBP1	9,5281	8,3001	0,0002	612	P46976	GYG1	8,1587	8,1529	0,9822
573	Q15029	EFTUD2	8,6687	9,1491	0,0649	613	Q93009	USP7	7,8756	8,4030	0,1442
574	P04745	AMY1A-C	8,6965	9,0802	1,0000	614	P78527	PRKDC	8,1927	7,9897	0,6806
575	Q9H223	EHD4	8,6714	9,0882	0,3911	615	Q8N1G4	LRRC47	8,2190	7,9060	0,4267
576	P11216	PYGB	9,8133	7,9256	0,0000	616	P51003	PAPOLA	7,5877	8,5121	0,1002
577	Q06203	PPAT	8,1562	9,5612	0,0004	617	Q14103	HNRNPD	7,8719	8,1793	0,4521
578	Q15008	PSMD6	8,7895	8,9155	0,7680	618	Q9P287	BCCIP	8,0037	7,9621	0,8997
579	O43818	RRP9	8,9395	8,6546	0,3310	619	Q9H7D7	WDR26	7,5873	7,8220	0,5072
580	O95757	HSPA4L	8,6098	8,9423	0,3382	620	O76094	SRP72	7,7525	7,4692	0,5682
581	P47756	CAPZB	9,0739	8,4617	0,2732						
582	P31943	HNRNPH1	9,2896	8,1561	0,0163						
583	Q9Y696	CLIC4	9,1611	8,2747	0,0498						
584	Q96RU3	FNBP1	8,4432	8,9436	0,0131						
585	O14980	XPO1	8,5280	8,8502	0,2371						
586	Q01518	CAP1	8,5003	8,8474	0,1366						
587	O95671	ASMTL	8,7309	8,6044	0,7059						
588	P26639	TARS1	8,8606	8,3834	0,1373						
589	Q9NTX5	ECHDC1	9,0741	8,1565	0,0427						
590	P19971	TYMP	8,4307	8,7715	0,3000						
591	Q9UK59	DBR1	8,7928	8,3631	0,0164						
592	P42285	MTREX	8,5008	8,5337	0,8758						
593	Q9GZZ1	NAA50	8,2420	8,7462	0,1378						
594	P13647	KRT5	8,6522	8,3112	0,1431						
595	Q53EL6	PDCD4	8,7010	8,2346	0,1391						
596	P09972	ALDOC	7,8261	9,0782	0,0028						
597	P62829	RPL23	8,4253	8,4262	0,9975						
598	Q9Y5X3	SNX5	8,3388	8,4927	0,4079						
599	Q13813	SPTAN1	8,4496	8,3524	0,7011						
600	P52907	CAPZA1	8,6066	8,1342	0,1301						

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (1/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1	CSF2	0.0007	7.1927	41	CXorf49	0.0096	3.8073	81	CLDN6	0.0049	3.1297
2	CXCL8	0.0001	6.9068	42	CD7	0.0087	3.7850	82	ADAM19	< 0.0001	3.1084
3	KRTAP2-3	0.0005	6.1016	43	LINC01705	0.0076	3.7734	83	TNFRSF9	0.0200	3.1067
4	SPRR2D	< 0.0001	6.0106	44	LIF	< 0.0001	3.7513	84	PLXNA4	0.0105	3.0848
5	SPRR2A	< 0.0001	5.6613	45	DUSP5	< 0.0001	3.7451	85	KCCAT198	0.0316	3.0765
6	ESM1	0.0031	5.5602	46	LHX9	0.0109	3.7052	86	KRTAP1-5	0.0027	3.0749
7	CREB5	0.0021	5.5297	47	LINC02457	0.0279	3.6987	87	MIR6772	0.0029	3.0749
8	MMP20	0.0018	5.5253	48	LINC01828	0.0114	3.6875	88	MPP4	0.0027	3.0749
9	HSPA6	0.0043	5.2833	49	C5orf67	0.0011	3.6538	89	INGX	0.0024	3.0749
10	SERPINB2	< 0.0001	4.9075	50	LINC01943	0.0069	3.6538	90	DUSP6	< 0.0001	3.0583
11	CXCL1	< 0.0001	4.8906	51	VNN1	0.0086	3.5813	91	CD274	0.0001	3.0407
12	FOSL1	< 0.0001	4.8301	52	C3orf36	0.0239	3.5784	92	LINC00452	0.0018	3.0276
13	ADGRF2	< 0.0001	4.7846	53	ZFP57	0.0189	3.5784	93	HSD11B1	0.0016	3.0224
14	CCDC13	0.0001	4.7514	54	PRR9	0.0010	3.5718	94	WAKMAR2	< 0.0001	2.9998
15	EGR3	0.0002	4.7042	55	LINC02783	0.0491	3.5666	95	YWHABP2	0.0485	2.9994
16	BMP6	0.0060	4.6857	56	ARHGAP20	0.0039	3.5357	96	HBEGF	< 0.0001	2.9893
17	SLC24A3	0.0150	4.6350	57	SOCS1	< 0.0001	3.5347	97	DCLK2	0.0192	2.9872
18	IL1RL1	0.0005	4.6099	58	SHISA2	0.0347	3.4994	98	RUBCNL	0.0001	2.9582
19	SPRY4	0.0003	4.5227	59	LRRC4	0.0002	3.4910	99	AREG	0.0001	2.9581
20	KRTAP3-1	0.0218	4.5055	60	OACYLP	0.0110	3.4401	100	GJB6	0.0015	2.9366
21	SAA4	0.0007	4.4648	61	NHSL2	0.0005	3.4153	101	PERM1	0.0065	2.9344
22	CCDC190	0.0149	4.4071	62	TRIM67	0.0046	3.4082	102	LINC00565	0.0006	2.9253
23	LINC02539	0.0119	4.3402	63	RN7SKP116	0.0348	3.3926	103	CCL2	< 0.0001	2.9185
24	TRPV3	0.0129	4.3257	64	GJA3	0.0051	3.3814	104	SLC10A1	0.0273	2.9147
25	EGR4	0.0001	4.2698	65	SAMD14	0.0249	3.3332	105	NOG	0.0007	2.9139
26	KRT23	0.0051	4.1973	66	TUBB8B	0.0078	3.3205	106	PTGS2	0.0002	2.9115
27	TNFAIP3	< 0.0001	4.1970	67	FGF19	0.0002	3.3035	107	CHRNA2	0.0011	2.8799
28	PCNPP3	0.0052	4.1939	68	FOXC2	0.0125	3.2899	108	EBI3	0.0011	2.8799
29	IGSF11	0.0060	4.1826	69	KLHDC7B	0.0001	3.2633	109	RNA5SP123	0.0011	2.8799
30	PDCD1LG2	0.0001	4.0580	70	PLAUR	< 0.0001	3.2371	110	SLN	0.0011	2.8799
31	ADAMTS9	0.0038	4.0467	71	LSAMP	0.0013	3.2151	111	TRBC1	0.0011	2.8799
32	TRBV30	0.0058	4.0425	72	LINC01426	< 0.0001	3.2132	112	S1PR3	0.0045	2.8754
33	IRAG1	0.0003	4.0093	73	LMO7DN	< 0.0001	3.2132	113	C1DP1	0.0200	2.8611
34	MIR6090	0.0006	3.9872	74	SERPINB9	0.0051	3.2132	114	SNORA80C	0.0216	2.8506
35	NPAS3	0.0112	3.9684	75	PLAU	< 0.0001	3.1965	115	C15orf54	0.0259	2.8493
36	G0S2	0.0240	3.9579	76	IL1R2	0.0005	3.1950	116	SERPINB10	0.0007	2.8201
37	TNF	0.0012	3.9365	77	LRIT3	0.0216	3.1944	117	BIRC3	< 0.0001	2.8170
38	LINC01127	0.0003	3.9042	78	FST	< 0.0001	3.1812	118	TCTEX1D4	0.0001	2.7992
39	ERG	0.0192	3.8568	79	MIR5700	0.0314	3.1651	119	TGFA	< 0.0001	2.7921
40	KRTAP4-12	0.0198	3.8504	80	BTBD19	0.0017	3.1425	120	TNS4	< 0.0001	2.7863

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (2/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
121	UBE2FP1	0.0130	2.7853	161	KCNH5	0.0018	2.5465	201	CCN2	0.0004	2.2605
122	TRAF3IP3	< 0.0001	2.7800	162	KRTAP5-10	0.0015	2.5465	202	PHLDA1	< 0.0001	2.2478
123	CXCL6	0.0001	2.7795	163	LINC00535	0.0018	2.5465	203	CSTP1	0.0488	2.2468
124	LINC01303	0.0474	2.7781	164	MRAP	0.0018	2.5465	204	HOXB2	0.0494	2.2468
125	MYO1G	0.0476	2.7752	165	PNPLA5	0.0015	2.5465	205	MAFF	< 0.0001	2.2318
126	MIR3682	0.0468	2.7752	166	TGFA-IT1	0.0015	2.5465	206	F3	< 0.0001	2.2289
127	KRT17	< 0.0001	2.7656	167	MFAP2	0.0015	2.5465	207	BACH2	0.0088	2.2280
128	GRK5-IT1	0.0072	2.7415	168	MTCYBP43	0.0015	2.5465	208	SEMA7A	< 0.0001	2.2196
129	LINC00880	0.0072	2.7415	169	OR2T8	0.0015	2.5465	209	TMEM121B	0.0050	2.2174
130	DRGX	0.0063	2.7415	170	SPRR2F	0.0015	2.5465	210	ASH1L-IT1	< 0.0001	2.2132
131	OTOP2	0.0063	2.7415	171	WFDC5	0.0015	2.5465	211	BEST2	< 0.0001	2.2132
132	PAX5	0.0063	2.7415	172	SPRR1B	0.0006	2.5436	212	IKZF3	< 0.0001	2.2132
133	RBMXP5	0.0063	2.7415	173	HS3ST2	< 0.0001	2.5410	213	NKX2-5	< 0.0001	2.2132
134	CDK5R1	0.0001	2.7343	174	LINC01787	0.0483	2.5307	214	RN7SKP130	< 0.0001	2.2132
135	KPNA7	0.0274	2.7285	175	SULT2B1	0.0075	2.5128	215	RNA5SP435	< 0.0001	2.2132
136	IL6	0.0006	2.7261	176	LINC02768	0.0075	2.5077	216	RNA5SP477	< 0.0001	2.2132
137	BMPR1AP1	0.0342	2.7109	177	ADAMTS15	0.0009	2.4939	217	SNORA28	< 0.0001	2.2132
138	LINC01433	0.0493	2.7009	178	ADGRF4	< 0.0001	2.4923	218	TBC1D3B	< 0.0001	2.2132
139	DUSP4	< 0.0001	2.7003	179	SAA2	0.0003	2.4866	219	THBD	< 0.0001	2.2132
140	LINC01629	0.0102	2.6993	180	PGDP1	0.0291	2.4711	220	SERPINB4	0.0215	2.2000
141	PAX1	0.0260	2.6904	181	RPS4XP2	0.0291	2.4711	221	CD83	0.0001	2.1822
142	TMEM171	< 0.0001	2.6874	182	ANTXR2	< 0.0001	2.4696	222	MIR3176	0.0076	2.1818
143	LINC00973	0.0005	2.6853	183	LINC02551	0.0002	2.4528	223	MICAL2	< 0.0001	2.1784
144	GJB2	< 0.0001	2.6843	184	AEN	< 0.0001	2.4462	224	PDE2A	0.0185	2.1608
145	CXCL2	0.0437	2.6543	185	C22orf24	0.0001	2.4157	225	DUSP2	< 0.0001	2.1512
146	BCL3	0.0001	2.6243	186	IER3	< 0.0001	2.3935	226	CHSY3	0.0094	2.1486
147	PDGFB	< 0.0001	2.6214	187	JUN	0.0001	2.3916	227	SLC5A1	0.0359	2.1433
148	ANGPTL4	0.0008	2.6209	188	CLDN4	< 0.0001	2.3916	228	HAS2	0.0012	2.1124
149	PHACTR3	0.0030	2.6179	189	EREG	< 0.0001	2.3906	229	NTSR1	0.0078	2.1101
150	ADORA2BP1	0.0264	2.5936	190	CTRB1	0.0195	2.3803	230	GADD45A	< 0.0001	2.1035
151	C11orf91	0.0021	2.5870	191	NGF	0.0029	2.3730	231	MIR221	0.0295	2.1015
152	PLK3	< 0.0001	2.5846	192	NOCT	< 0.0001	2.3636	232	GJB4	0.0002	2.0930
153	ANKRD1	0.0001	2.5693	193	SH2D5	0.0006	2.3631	233	MFSD2A	< 0.0001	2.0655
154	ARC	0.0309	2.5625	194	SPOCD1	0.0001	2.3490	234	HIC1	0.0014	2.0539
155	SYT14	< 0.0001	2.5565	195	TAGLN	< 0.0001	2.3477	235	PHLDA2	< 0.0001	2.0521
156	RASL10B	< 0.0001	2.5508	196	MYEOV	0.0004	2.3372	236	TMEM200A	< 0.0001	2.0476
157	FOXD4L6	0.0015	2.5465	197	RELB	< 0.0001	2.3039	237	CD38	0.0040	2.0459
158	GPR85	0.0018	2.5465	198	KBTBD8	0.0001	2.2917	238	IL1B	0.0003	2.0381
159	GREM1	0.0015	2.5465	199	RPSAP52	0.0003	2.2787	239	TSPAN2	0.0074	2.0347
160	GRM4	0.0018	2.5465	200	HMGA2	< 0.0001	2.2680	240	LINC02454	< 0.0001	2.0320

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (3/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
241	VEGFA	< 0.0001	2.0213	281	MARCHF4	0.0031	1.7922	321	ZNF365	< 0.0001	1.6155
242	EDN1	< 0.0001	2.0166	282	B3GNT7	0.0020	1.7912	322	B3GNT3	< 0.0001	1.6146
243	POLR1G	< 0.0001	2.0046	283	SERPINB8	< 0.0001	1.7821	323	FZD10	0.0219	1.6082
244	SLC9A2	0.0027	1.9987	284	C1orf74	< 0.0001	1.7797	324	DAPP1	< 0.0001	1.6022
245	ADAM8	< 0.0001	1.9919	285	ETS1	< 0.0001	1.7794	325	CCND1	< 0.0001	1.6010
246	TLR4	0.0001	1.9904	286	IL36G	0.0390	1.7768	326	DUSP7	< 0.0001	1.5961
247	CAMK1G	0.0089	1.9648	287	HS3ST1	< 0.0001	1.7743	327	CEMIP	0.0001	1.5930
248	SERPINE1	0.0024	1.9600	288	CHST2	0.0305	1.7730	328	ZNF750	0.0003	1.5903
249	IL11	0.0043	1.9598	289	SNAI1	0.0278	1.7730	329	YRDC	0.0001	1.5840
250	ERMN	0.0042	1.9435	290	FSCN2	0.0047	1.7592	330	CDKN1A	< 0.0001	1.5798
251	CLCF1	< 0.0001	1.9395	291	POTEE	0.0137	1.7533	331	NEK7	< 0.0001	1.5783
252	SNORD15B	0.0401	1.9299	292	HK2	< 0.0001	1.7398	332	FJX1	< 0.0001	1.5754
253	MIR5008	0.0002	1.9240	293	EPHA2	< 0.0001	1.7340	333	MYADM	< 0.0001	1.5699
254	NACAD	0.0036	1.9232	294	ITGB6	0.0003	1.7289	334	TFPI2	< 0.0001	1.5695
255	F2RL1	0.0001	1.9213	295	NFATC2	0.0153	1.7174	335	VGFB	0.0060	1.5690
256	MIR155HG	0.0099	1.9189	296	THBS1	0.0001	1.7144	336	WNT7A	< 0.0001	1.5682
257	VASN	0.0036	1.9041	297	AQP6	0.0185	1.7027	337	GALNT5	< 0.0001	1.5652
258	KRT16	0.0002	1.9027	298	LGALS2	0.0117	1.6922	338	CTRB2	0.0008	1.5634
259	IL23A	0.0002	1.9015	299	MAP3K14	0.0001	1.6906	339	URB2	< 0.0001	1.5566
260	RIPOR3	0.0289	1.8976	300	IL1R1	0.0001	1.6858	340	ARNTL	< 0.0001	1.5544
261	PNMA2	0.0066	1.8917	301	SRMS	0.0002	1.6845	341	NRG1	0.0001	1.5544
262	MALL	< 0.0001	1.8899	302	NHLH1	0.0066	1.6845	342	HAS3	0.0003	1.5507
263	EMP1	< 0.0001	1.8870	303	SELPLG	0.0139	1.6799	343	IL1A	0.0027	1.5495
264	KHSRPP1	0.0381	1.8841	304	NUAK2	0.0001	1.6787	344	PLEC	< 0.0001	1.5481
265	PGBD5	0.0019	1.8731	305	CYSRT1	0.0001	1.6783	345	METRNL	< 0.0001	1.5442
266	FGF5	0.0017	1.8702	306	DUSP8	0.0202	1.6769	346	ERICD	0.0228	1.5400
267	LUCAT1	0.0070	1.8660	307	ARHGAP25	0.0080	1.6734	347	EFNB2	< 0.0001	1.5391
268	TNFRSF10A	< 0.0001	1.8654	308	MYC	< 0.0001	1.6715	348	POU3F1	0.0012	1.5383
269	RELN	0.0022	1.8647	309	MARS2	0.0001	1.6691	349	NFKB2	< 0.0001	1.5374
270	MIR17HG	< 0.0001	1.8395	310	MUC16	0.0004	1.6683	350	RND3	< 0.0001	1.5346
271	LINC02605	0.0070	1.8291	311	OSBP2	0.0008	1.6663	351	ITGA2	< 0.0001	1.5314
272	CYP26B1	0.0004	1.8275	312	LRRRC8A	< 0.0001	1.6559	352	LINC01776	0.0019	1.5287
273	ARL4C	0.0001	1.8263	313	N4BP3	0.0001	1.6559	353	IGFL1	0.0141	1.5261
274	CCN1	< 0.0001	1.8120	314	SLC25A33	< 0.0001	1.6538	354	SOX9	0.0002	1.5242
275	IFFO2	0.0001	1.8099	315	NAV3	0.0001	1.6533	355	TRIM47	< 0.0001	1.5219
276	TNFRSF12A	< 0.0001	1.8027	316	DOK7	< 0.0001	1.6331	356	NMNAT2	0.0001	1.5217
277	TNFRSF21	< 0.0001	1.8017	317	MROH2A	0.0434	1.6321	357	ISM1	0.0001	1.5093
278	BCAR3	< 0.0001	1.8012	318	TICAM1	0.0001	1.6274	358	JPH2	0.0001	1.5081
279	CDC42EP1	< 0.0001	1.8012	319	LAMA3	< 0.0001	1.6194	359	MYRFL	0.0193	1.5077
280	SLC10A6	0.0052	1.7992	320	GJB3	< 0.0001	1.6192	360	FOSB	0.0009	1.5049

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (4/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
361	TARS3	0.0004	1.4951	401	PIK3CD	< 0.0001	1.3797	441	CDRT1	0.0004	1.2811
362	MIR22HG	< 0.0001	1.4885	402	SLC20A1	< 0.0001	1.3769	442	WNT9A	0.0001	1.2800
363	HSH2D	0.0023	1.4885	403	PLAAT2	0.0363	1.3746	443	SNX22	0.0089	1.2770
364	PAPPA	0.0068	1.4854	404	CCDC71L	0.0010	1.3721	444	GNG4	0.0007	1.2744
365	TMEM217	0.0006	1.4826	405	EMSLR	< 0.0001	1.3713	445	STC2	< 0.0001	1.2665
366	SPNS2	0.0194	1.4818	406	C12orf54	0.0345	1.3630	446	NKX2-1	0.0108	1.2642
367	CGAS	< 0.0001	1.4815	407	TRIB1	< 0.0001	1.3613	447	NIPAL1	< 0.0001	1.2622
368	MIR429	0.0112	1.4669	408	MDFI	0.0001	1.3606	448	PANX1	< 0.0001	1.2584
369	TMED6	0.0358	1.4651	409	TMEM158	0.0001	1.3582	449	CALD1	0.0001	1.2579
370	TNNT2	0.0077	1.4647	410	PTPRE	0.0039	1.3580	450	DCUN1D3	< 0.0001	1.2524
371	FERMT2	0.0003	1.4592	411	ACTBL2	0.0284	1.3519	451	BCL2	0.0013	1.2506
372	MAT2A	< 0.0001	1.4558	412	ACTG1	< 0.0001	1.3511	452	C10orf55	0.0061	1.2485
373	MFNG	0.0004	1.4525	413	MIR4479	0.0375	1.3509	453	BMPER	0.0082	1.2432
374	BCAR1	< 0.0001	1.4506	414	MAFK	< 0.0001	1.3501	454	CLCA4	0.0385	1.2398
375	SNHG15	< 0.0001	1.4466	415	SOCS3	0.0370	1.3487	455	MAP2K3	< 0.0001	1.2362
376	MUC1	0.0002	1.4462	416	PRAG1	< 0.0001	1.3441	456	ZFP36L1	0.0002	1.2361
377	KLF6	< 0.0001	1.4441	417	TACR2	0.0271	1.3437	457	SNORD14A	0.0144	1.2356
378	ADAMTS14	0.0263	1.4434	418	HSD17B2	0.0308	1.3383	458	PDLIM2	< 0.0001	1.2352
379	KRT6A	< 0.0001	1.4432	419	PRDM8	0.0002	1.3309	459	EZR	< 0.0001	1.2335
380	AKAP12	0.0011	1.4366	420	PTGER4	0.0001	1.3309	460	SLFNL1	0.0186	1.2311
381	ZFP36	0.0001	1.4339	421	MMP9	0.0396	1.3305	461	ZNF296	0.0006	1.2290
382	SH3TC2	0.0004	1.4334	422	LGALS1	0.0001	1.3302	462	EPB41L5	0.0001	1.2212
383	TNFSF15	0.0013	1.4300	423	SLC20A2	< 0.0001	1.3282	463	LINC00513	0.0088	1.2207
384	MIR222HG	< 0.0001	1.4287	424	MFAP3L	0.0002	1.3275	464	TRAF1	0.0025	1.2190
385	PPP1R15A	0.0001	1.4281	425	PTGS1	< 0.0001	1.3242	465	IL1RN	0.0001	1.2186
386	GPR3	0.0273	1.4225	426	SCN9A	0.0166	1.3226	466	VGLL2	0.0142	1.2168
387	PRSS51	0.0163	1.4200	427	MIR100HG	0.0012	1.3221	467	SENCR	0.0353	1.2153
388	RAB43	0.0004	1.4165	428	CCDC85B	0.0001	1.3187	468	MARCO	0.0285	1.2141
389	SPHK1	0.0003	1.4142	429	GFOD1	< 0.0001	1.3141	469	FSTL3	0.0034	1.2131
390	ADAM32	0.0082	1.4078	430	LRP12	< 0.0001	1.3063	470	GJC2	0.0426	1.2054
391	LAMA2	0.0076	1.4018	431	UBASH3B	0.0003	1.3012	471	RELT	0.0001	1.2036
392	ASB2	0.0359	1.3985	432	TACSTD2	< 0.0001	1.3008	472	LAMC2	0.0001	1.2027
393	TMC1	0.0030	1.3957	433	MSC	0.0248	1.2994	473	WWTR1	< 0.0001	1.2018
394	PTHLH	0.0001	1.3955	434	CARD10	< 0.0001	1.2976	474	IRAK2	0.0151	1.2006
395	DNMBP	0.0001	1.3950	435	PLSCR3	0.0156	1.2936	475	WDR43	< 0.0001	1.1971
396	PLD6	0.0002	1.3943	436	SSH1	< 0.0001	1.2935	476	RASSF10	0.0005	1.1947
397	LINC02803	0.0273	1.3889	437	FGD2	0.0005	1.2904	477	RNF224	0.0129	1.1930
398	LINC00702	0.0135	1.3868	438	NFKBIE	0.0001	1.2891	478	HELZ2	< 0.0001	1.1922
399	SLC34A3	0.0137	1.3851	439	SGK1	0.0032	1.2873	479	SLC25A25	< 0.0001	1.1914
400	SPTB	0.0016	1.3807	440	RRS1	0.0001	1.2814	480	TRAF4	< 0.0001	1.1906

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (5/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
481	SFN	< 0.0001	1.1878	521	SGMS2	0.0001	1.1288	561	AJAP1	0.0019	1.0779
482	BLZF1	< 0.0001	1.1848	522	ALDH1A3	< 0.0001	1.1286	562	C4BPB	0.0078	1.0768
483	ZMYND15	0.0041	1.1847	523	LRRRC8C	0.0004	1.1281	563	LINC01909	0.0108	1.0758
484	SORCS3	0.0096	1.1828	524	PPP2R5B	< 0.0001	1.1280	564	PROSER2	< 0.0001	1.0758
485	FHL2	0.0001	1.1805	525	ZSWIM4	0.0009	1.1278	565	FBXW10	0.0019	1.0729
486	NFKBIA	< 0.0001	1.1800	526	TMCC3	0.0001	1.1272	566	PHLDB2	< 0.0001	1.0725
487	KLF4	< 0.0001	1.1787	527	ATAD3B	0.0007	1.1217	567	MAP3K9	< 0.0001	1.0712
488	MYO1E	0.0001	1.1777	528	MACC1	0.0001	1.1214	568	TAF13	< 0.0001	1.0708
489	GRHL3	0.0010	1.1772	529	SEMA3A	< 0.0001	1.1205	569	NOP16	< 0.0001	1.0692
490	COA7	0.0001	1.1751	530	IL1RL2	0.0003	1.1197	570	LINC00472	0.0010	1.0684
491	PPRC1	< 0.0001	1.1749	531	IL4R	< 0.0001	1.1185	571	ARTN	0.0011	1.0674
492	IL4I1	0.0480	1.1743	532	NR4A1	0.0050	1.1152	572	NLRC5	0.0004	1.0672
493	KRTAP5-8	0.0034	1.1743	533	ERRFI1	0.0001	1.1111	573	ACTBP2	0.0010	1.0661
494	SPTBN5	0.0030	1.1740	534	INA	0.0030	1.1097	574	BNC1	0.0003	1.0660
495	LYST	< 0.0001	1.1729	535	SYNE3	0.0103	1.1069	575	KAZN	0.0001	1.0650
496	ATP8A2	0.0020	1.1703	536	CAPN3	0.0130	1.1067	576	B4GALT4	< 0.0001	1.0631
497	ZNF35	0.0003	1.1696	537	NRP1	0.0001	1.1055	577	CDR2L	< 0.0001	1.0626
498	IL16	0.0242	1.1635	538	ZNF202	0.0001	1.1051	578	TRAF3	< 0.0001	1.0623
499	MIR6835	0.0201	1.1608	539	VEGFC	0.0005	1.1035	579	FLNB	0.0002	1.0596
500	CYP27B1	0.0046	1.1600	540	TLNRD1	< 0.0001	1.1010	580	ACTL10	0.0016	1.0593
501	CEBPD	0.0005	1.1600	541	GADD45B	0.0014	1.1009	581	SACS	0.0004	1.0586
502	TM4SF1	0.0001	1.1562	542	SOWAHC	0.0005	1.0990	582	LCP1	0.0011	1.0578
503	CDCP1	< 0.0001	1.1535	543	TWNK	0.0001	1.0981	583	P2RY11	0.0014	1.0576
504	SIAH2	0.0001	1.1527	544	CDC25A	< 0.0001	1.0975	584	USP36	< 0.0001	1.0569
505	PAG1	0.0092	1.1520	545	KIAA1549L	0.0012	1.0974	585	ADRB2	< 0.0001	1.0566
506	NIP7	< 0.0001	1.1510	546	OSMR	0.0019	1.0970	586	CHSY1	< 0.0001	1.0556
507	SH3PXD2A	0.0001	1.1505	547	ATG16L1	< 0.0001	1.0964	587	SDR16C5	0.0002	1.0538
508	PLEKHF1	< 0.0001	1.1488	548	SERPINB5	< 0.0001	1.0964	588	ACTB	< 0.0001	1.0519
509	IL32	0.0084	1.1471	549	BYSL	0.0001	1.0963	589	VCL	< 0.0001	1.0505
510	KIF26B	0.0404	1.1460	550	TNFRSF25	0.0022	1.0962	590	CHRNA10	0.0119	1.0503
511	TXK	0.0167	1.1457	551	GPAT3	0.0002	1.0927	591	RPS10	0.0004	1.0488
512	EPPK1	0.0001	1.1448	552	ANKK1	0.0236	1.0915	592	CCDC86	< 0.0001	1.0484
513	FOXD1	0.0009	1.1404	553	GJB5	0.0001	1.0863	593	MAB21L4	0.0045	1.0468
514	TMEM47	0.0040	1.1400	554	EHD1	< 0.0001	1.0858	594	DDX21	< 0.0001	1.0462
515	RUNX1	0.0004	1.1359	555	SGPP2	0.0085	1.0853	595	LINC02166	0.0081	1.0448
516	PVR	0.0001	1.1329	556	RNASE7	0.0242	1.0845	596	PROKR2	0.0004	1.0447
517	TRMT61A	0.0001	1.1303	557	IFIT5	0.0002	1.0829	597	LINC01910	0.0074	1.0433
518	GAS2L2	0.0072	1.1302	558	AMD1	< 0.0001	1.0809	598	CAPRIN2	< 0.0001	1.0431
519	SNHG17	0.0001	1.1292	559	ADAMTS6	0.0047	1.0808	599	RAET1L	< 0.0001	1.0417
520	ADGRF1	0.0004	1.1290	560	CFAP20DC	0.0065	1.0803	600	CEACAM1	0.0150	1.0391

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (6/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
601	NKX3-1	0.0111	1.0372	641	SLC9A4	0.0338	-1.0071	681	AMIGO1	0.0010	-1.0275
602	LIME1	0.0134	1.0364	642	TPRXL	0.0003	-1.0076	682	PAPLN	0.0153	-1.0278
603	PHC2	0.0001	1.0364	643	CEP250	< 0.0001	-1.0084	683	MFSD13A	< 0.0001	-1.0283
604	RNA5SP108	0.0488	1.0360	644	ZNF682	0.0079	-1.0086	684	VWA7	0.0037	-1.0285
605	ICAM1	0.0008	1.0343	645	HSD17B11	< 0.0001	-1.0087	685	INSIG1	0.0006	-1.0294
606	KLF16	< 0.0001	1.0297	646	IGSF9	0.0016	-1.0091	686	SCAMP5	0.0167	-1.0300
607	TRIM16	0.0001	1.0291	647	CEP126	0.0007	-1.0094	687	ZNF580	0.0003	-1.0309
608	ST6GALNAC5	0.0001	1.0285	648	AIFM3	0.0070	-1.0094	688	PTPN6	< 0.0001	-1.0314
609	PPAN	0.0185	1.0252	649	NUDT7	0.0004	-1.0097	689	ERICH5	0.0149	-1.0315
610	MCL1	< 0.0001	1.0228	650	SPTLC3	< 0.0001	-1.0102	690	UBN2	0.0016	-1.0315
611	IRF6	< 0.0001	1.0209	651	AK7	0.0010	-1.0111	691	ZNF829	0.0224	-1.0317
612	ADGRL2	0.0001	1.0205	652	EME1	0.0001	-1.0121	692	INSR	0.0032	-1.0324
613	C6orf141	0.0008	1.0198	653	SLC35E2B	< 0.0001	-1.0122	693	TRIQQ	< 0.0001	-1.0324
614	GBP1	0.0002	1.0170	654	KIF18A	0.0005	-1.0125	694	APOLD1	0.0001	-1.0325
615	MON1A	0.0002	1.0145	655	SPECC1	< 0.0001	-1.0131	695	HSD3BP5	0.0398	-1.0328
616	LTO1	< 0.0001	1.0139	656	CCDC144B	0.0021	-1.0138	696	CXXC5	0.0005	-1.0329
617	RAB3IP	< 0.0001	1.0124	657	LAMA4	0.0014	-1.0154	697	CENPC	0.0001	-1.0332
618	PNO1	0.0003	1.0111	658	KLK13	0.0212	-1.0155	698	ZNF225	0.0205	-1.0338
619	CCNA1	0.0045	1.0105	659	MAMDC2	0.0006	-1.0155	699	GUCY1B1	0.0455	-1.0341
620	MAK16	0.0002	1.0103	660	EFNA3	0.0015	-1.0161	700	CEP57L1	< 0.0001	-1.0343
621	CFAP57	< 0.0001	1.0095	661	IL15	0.0078	-1.0169	701	SLC16A13	0.0001	-1.0343
622	OTUD6B	< 0.0001	1.0086	662	ABRAXAS1	0.0029	-1.0186	702	MR1	< 0.0001	-1.0348
623	KIF9	< 0.0001	1.0075	663	CAMKK1	< 0.0001	-1.0189	703	GJD3	0.0095	-1.0353
624	PLEKHN1	0.0002	1.0074	664	CEP170	0.0001	-1.0190	704	KNDC1	0.0185	-1.0355
625	RGS20	0.0004	1.0074	665	CDK19	< 0.0001	-1.0194	705	PRKAB2	0.0003	-1.0363
626	MIDN	< 0.0001	1.0058	666	ANKRD18A	0.0174	-1.0195	706	DNAH11	0.0120	-1.0373
627	PMEPA1	0.0036	1.0029	667	SMPDL3A	0.0005	-1.0196	707	BBX	< 0.0001	-1.0379
628	DAPK3	0.0001	1.0011	668	ASPDH	< 0.0001	-1.0207	708	CBX7	0.0001	-1.0379
629	ZNF681	0.0093	-1.0002	669	RTN1	< 0.0001	-1.0207	709	MRTFA	< 0.0001	-1.0380
630	DCP1B	0.0037	-1.0007	670	GNAO1	0.0065	-1.0213	710	ELAVL2	< 0.0001	-1.0382
631	FAM86JP	0.0001	-1.0015	671	BOLA1	0.0004	-1.0224	711	EHHADH	0.0002	-1.0389
632	CPT1C	0.0009	-1.0015	672	TIGD3	0.0178	-1.0229	712	TMEM144	0.0097	-1.0392
633	MAGI3	0.0001	-1.0018	673	DCAKD	0.0013	-1.0234	713	VEPH1	0.0055	-1.0396
634	SPATA9	0.0285	-1.0027	674	GPRC5C	0.0003	-1.0245	714	HSF4	0.0050	-1.0399
635	HAO	0.0334	-1.0032	675	C17orf107	0.0481	-1.0245	715	ZNF563	0.0105	-1.0400
636	LINC02532	0.0171	-1.0032	676	EFCAB6	0.0105	-1.0255	716	ATF2	0.0005	-1.0405
637	AGR2	0.0029	-1.0042	677	JADE2	0.0001	-1.0257	717	DLG2	0.0028	-1.0413
638	ZNF441	0.0023	-1.0046	678	TMEM107	0.0001	-1.0263	718	CEP57	< 0.0001	-1.0418
639	KIZ	< 0.0001	-1.0048	679	RAB17	0.0007	-1.0265	719	GABRE	0.0005	-1.0442
640	SRD5A3	0.0003	-1.0060	680	PLCXD3	0.0067	-1.0267	720	LRCH2	0.0001	-1.0443

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (7/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
721	GPR61	0.0027	-1.0456	761	H4C14	0.0326	-1.0688	801	DIPK1A	< 0.0001	-1.0952
722	KCNIP2	0.0485	-1.0467	762	KAT6B	0.0002	-1.0704	802	TACC2	0.0002	-1.0957
723	INPP5J	0.0019	-1.0467	763	ZNF425	0.0024	-1.0709	803	DUSP16	< 0.0001	-1.0958
724	ZNF248	0.0018	-1.0482	764	BBS12	0.0011	-1.0712	804	PAX9	0.0008	-1.0959
725	ZSCAN2	0.0010	-1.0487	765	SIX5	0.0004	-1.0713	805	TBC1D10C	0.0259	-1.0962
726	ACP7	0.0155	-1.0490	766	SPATA1	0.0164	-1.0713	806	KIAA1217	0.0001	-1.0964
727	ARHGAP30	0.0082	-1.0500	767	GOLGA8UP	0.0266	-1.0713	807	HNF4G	0.0009	-1.0965
728	SNX30	0.0001	-1.0501	768	CASP9	0.0007	-1.0730	808	TFDP2	< 0.0001	-1.0965
729	CLUAP1	0.0003	-1.0506	769	LETMD1	0.0001	-1.0730	809	H2BC8	0.0004	-1.0966
730	GOLPH3L	< 0.0001	-1.0509	770	PLD1	< 0.0001	-1.0736	810	PHLPP1	< 0.0001	-1.0970
731	RRM2B	0.0001	-1.0514	771	NFIA	0.0015	-1.0744	811	CCDC121	0.0139	-1.0976
732	NBR1	< 0.0001	-1.0528	772	BDNF-AS	0.0022	-1.0755	812	POLI	0.0002	-1.0985
733	SHBG	0.0154	-1.0538	773	TOR1AIP2	0.0001	-1.0755	813	ARNT2	0.0059	-1.0987
734	TMEM8B	0.0128	-1.0543	774	CNRIP1	0.0033	-1.0758	814	FAM8A1	0.0003	-1.0987
735	GLRX	0.0009	-1.0553	775	ALDH3B1	0.0001	-1.0770	815	ARMCX1	0.0004	-1.0990
736	SIPA1	0.0003	-1.0565	776	TMEM42	0.0035	-1.0770	816	C11orf71	0.0007	-1.1005
737	AKAP7	0.0153	-1.0572	777	FRS3	0.0246	-1.0773	817	FRAT2	0.0011	-1.1013
738	CUTALP	0.0009	-1.0573	778	IGKV1OR2-108	0.0481	-1.0773	818	CCDC113	0.0003	-1.1025
739	BTN3A2	0.0002	-1.0574	779	NHLRC4	0.0489	-1.0773	819	GGACT	0.0001	-1.1029
740	KCNG1	0.0234	-1.0585	780	SEPSECS	0.0002	-1.0778	820	TMEM191C	0.0047	-1.1054
741	POU6F1	0.0016	-1.0588	781	PPP1R3E	0.0047	-1.0779	821	PTP4A3	0.0044	-1.1054
742	FAM102B	0.0005	-1.0593	782	ZMYND8	0.0002	-1.0779	822	ARHGAP33	0.0029	-1.1068
743	ZNF43	0.0453	-1.0606	783	ZNF599	0.0014	-1.0789	823	HFE	0.0003	-1.1070
744	SLC27A1	0.0031	-1.0610	784	MEGF9	< 0.0001	-1.0823	824	CIT	< 0.0001	-1.1070
745	LRRC37BP1	0.0025	-1.0620	785	PCLO	0.0002	-1.0830	825	PXYLP1	0.0002	-1.1072
746	DENND10	0.0003	-1.0623	786	ESRP1	< 0.0001	-1.0833	826	IQSEC2	0.0001	-1.1077
747	CFAP52	0.0027	-1.0627	787	DPYSL2	0.0001	-1.0848	827	FLJ37453	0.0009	-1.1084
748	C14orf28	0.0008	-1.0631	788	C4orf19	0.0009	-1.0849	828	PLEKHA6	< 0.0001	-1.1088
749	SCNN1A	0.0002	-1.0632	789	SGTB	< 0.0001	-1.0853	829	SHROOM4	0.0006	-1.1100
750	CREB3L4	0.0001	-1.0636	790	ABTB1	0.0001	-1.0862	830	NEFM	0.0255	-1.1105
751	PSD3	0.0001	-1.0638	791	ZFYVE1	0.0005	-1.0864	831	COL9A2	0.0054	-1.1110
752	ABCB9	< 0.0001	-1.0643	792	SNN	< 0.0001	-1.0868	832	ZNF385A	0.0001	-1.1115
753	SLC16A4	0.0284	-1.0651	793	PSRC1	< 0.0001	-1.0884	833	BUB1B	< 0.0001	-1.1118
754	DTX4	0.0007	-1.0667	794	HMMR	< 0.0001	-1.0888	834	RNF166	0.0003	-1.1121
755	NUDT6	0.0003	-1.0668	795	UNC5B	< 0.0001	-1.0889	835	CARF	0.0009	-1.1133
756	C5orf34	0.0003	-1.0669	796	HPDL	0.0001	-1.0903	836	THAP2	0.0005	-1.1137
757	GSDMB	< 0.0001	-1.0676	797	OSBPL7	0.0006	-1.0906	837	GPR19	0.0037	-1.1138
758	ZDBF2	0.0103	-1.0679	798	PATL2	0.0347	-1.0912	838	REEP4	0.0001	-1.1141
759	LINC02236	0.0111	-1.0680	799	KIF20A	< 0.0001	-1.0925	839	ACSM3	0.0047	-1.1144
760	ZNF519	0.0168	-1.0683	800	LINC01515	0.0002	-1.0936	840	ABCC5	0.0001	-1.1148

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (8/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
841	DOCK8	0.0079	-1.1150	881	CNGA4	0.0138	-1.1379	921	CROCC	< 0.0001	-1.1711
842	C8orf44	0.0003	-1.1168	882	OLMALINC	0.0001	-1.1387	922	EEF2K	< 0.0001	-1.1713
843	CYP4F2	0.0285	-1.1172	883	GPRASP2	0.0001	-1.1392	923	SYNGR3	0.0226	-1.1730
844	H3C10	0.0070	-1.1176	884	ANKMY2	< 0.0001	-1.1406	924	SYCE1L	0.0126	-1.1731
845	PLCE1	< 0.0001	-1.1199	885	EFNA5	< 0.0001	-1.1408	925	FBXL8	0.0008	-1.1735
846	DSTNP2	0.0134	-1.1205	886	C1orf210	0.0039	-1.1422	926	INSYN2B	0.0159	-1.1738
847	RFESD	0.0323	-1.1206	887	C21orf58	0.0005	-1.1424	927	PIM2	0.0010	-1.1743
848	ZNF362	0.0001	-1.1211	888	GATAD2B	< 0.0001	-1.1425	928	ENG	0.0371	-1.1743
849	EFNA4	0.0010	-1.1215	889	SSPN	0.0025	-1.1433	929	RLN2	0.0165	-1.1746
850	GTF2IP13	0.0117	-1.1229	890	TEF	0.0001	-1.1439	930	LRATD1	0.0001	-1.1747
851	LINC01011	0.0066	-1.1231	891	HELLPAR	0.0081	-1.1439	931	NONOP2	0.0231	-1.1754
852	LINC02453	0.0072	-1.1231	892	GPR155	0.0170	-1.1455	932	MYRF	0.0004	-1.1757
853	SCNN1D	0.0249	-1.1231	893	ANG	0.0072	-1.1468	933	KIAA0586	< 0.0001	-1.1758
854	CBR3	< 0.0001	-1.1236	894	ZNF488	0.0023	-1.1469	934	ZNF493	0.0015	-1.1761
855	KANK2	< 0.0001	-1.1239	895	OTUD1	0.0001	-1.1472	935	TRIM2	0.0029	-1.1778
856	H2BC15	< 0.0001	-1.1239	896	MVB12B	0.0033	-1.1476	936	GVQW3	0.0038	-1.1787
857	HNMT	0.0030	-1.1243	897	PTCH1	0.0001	-1.1477	937	PAMR1	0.0034	-1.1799
858	LINC02700	0.0003	-1.1245	898	NEIL2	0.0002	-1.1496	938	PIP5KL1	0.0048	-1.1812
859	PDE6C	0.0131	-1.1258	899	UTS2B	0.0362	-1.1514	939	AGO4	< 0.0001	-1.1829
860	KIAA0513	< 0.0001	-1.1258	900	CEP44	0.0007	-1.1544	940	LDB3	0.0144	-1.1846
861	ANKRA2	0.0001	-1.1264	901	PLSCR4	0.0002	-1.1544	941	SLC11A1	0.0340	-1.1846
862	CHD6	< 0.0001	-1.1271	902	BCORL1	< 0.0001	-1.1545	942	TCAF2	0.0153	-1.1850
863	HECA	0.0001	-1.1275	903	LNCOC1	0.0249	-1.1546	943	SPC24	< 0.0001	-1.1863
864	FLRT2	0.0002	-1.1277	904	LMO4	0.0002	-1.1554	944	MTA3	< 0.0001	-1.1868
865	SEMA3B	0.0127	-1.1280	905	GALM	0.0001	-1.1560	945	PRKAG3	0.0358	-1.1873
866	SLC28A2	0.0071	-1.1280	906	SLC47A2	0.0019	-1.1563	946	RETREG1	0.0001	-1.1880
867	OGDHL	0.0053	-1.1280	907	CLN3	0.0251	-1.1571	947	RNF43	0.0010	-1.1886
868	NR6A1	0.0007	-1.1292	908	GIMAP2	0.0074	-1.1586	948	ACP3	0.0036	-1.1888
869	CCNG1	< 0.0001	-1.1303	909	CASTOR3	0.0061	-1.1603	949	ADCY5	< 0.0001	-1.1915
870	YPEL5	< 0.0001	-1.1303	910	LRRC20	0.0001	-1.1606	950	RAET1G	0.0095	-1.1933
871	APBB1	0.0016	-1.1314	911	LGALS7B	0.0043	-1.1613	951	PHF13	< 0.0001	-1.1939
872	MAML3	0.0078	-1.1328	912	ZNF658B	0.0301	-1.1613	952	FLJ20021	0.0010	-1.1946
873	VSIG10L	0.0136	-1.1333	913	ASPM	0.0001	-1.1620	953	NR4A2	0.0013	-1.1950
874	NMNAT3	0.0397	-1.1334	914	ZNF516	< 0.0001	-1.1635	954	HMGB2	< 0.0001	-1.1960
875	SCEL	0.0010	-1.1353	915	IGIP	0.0001	-1.1636	955	ACVR2B	0.0043	-1.1964
876	NLRX1	< 0.0001	-1.1356	916	RUNX2	0.0008	-1.1652	956	FILIP1L	0.0008	-1.1972
877	CEP76	0.0005	-1.1371	917	PBXIP1	< 0.0001	-1.1654	957	HOXC4	0.0004	-1.1986
878	CEP19	0.0072	-1.1372	918	NBR2	0.0004	-1.1664	958	FZD7	0.0002	-1.2000
879	MYO1F	0.0278	-1.1373	919	ARHGEF10L	0.0012	-1.1678	959	XYLT2	0.0001	-1.2003
880	GSEC	0.0003	-1.1378	920	MIR3936HG	0.0073	-1.1711	960	ZNF114	0.0004	-1.2013

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (9/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
961	FBXO36	0.0016	-1.2014	1001	TRPV6	0.0001	-1.2309	1041	GPR68	0.0005	-1.2700
962	MMP13	0.0016	-1.2017	1002	ZBTB22	< 0.0001	-1.2312	1042	TNS3	< 0.0001	-1.2725
963	CA9	0.0107	-1.2030	1003	LRRC37B	0.0008	-1.2316	1043	ZNF318	0.0001	-1.2727
964	BRD8	< 0.0001	-1.2032	1004	PXMP4	< 0.0001	-1.2328	1044	LIPE	0.0001	-1.2732
965	CHROMR	0.0018	-1.2037	1005	USP51	0.0080	-1.2336	1045	MFSD4A	0.0071	-1.2738
966	H1-10	< 0.0001	-1.2039	1006	IL22RA1	0.0011	-1.2336	1046	MORN4	0.0001	-1.2739
967	H1-0	< 0.0001	-1.2040	1007	PDCD4	0.0001	-1.2341	1047	LNP1	0.0013	-1.2749
968	ABHD8	0.0005	-1.2046	1008	DLK2	0.0001	-1.2343	1048	LURAP1L	0.0009	-1.2754
969	BORCS6	0.0019	-1.2051	1009	CKMT2	0.0178	-1.2362	1049	ACSS2	0.0001	-1.2758
970	ING4	< 0.0001	-1.2052	1010	CFAP43	0.0006	-1.2371	1050	RUNDC3B	0.0158	-1.2758
971	FOXO1	0.0002	-1.2063	1011	BTBD11	0.0001	-1.2377	1051	H3C8	0.0019	-1.2779
972	SLC15A2	0.0023	-1.2069	1012	TGFB3	0.0123	-1.2380	1052	MAMSTR	0.0041	-1.2790
973	MEX3A	0.0033	-1.2071	1013	FBXO16	0.0083	-1.2380	1053	TRIM38	0.0001	-1.2828
974	PRB3	0.0033	-1.2081	1014	FRY	0.0002	-1.2383	1054	GPFR1	0.0035	-1.2829
975	DCST2	0.0102	-1.2084	1015	LNC-LBCS	0.0219	-1.2390	1055	HSPA1L	0.0011	-1.2834
976	MEIS1	0.0007	-1.2086	1016	MIR4258	0.0052	-1.2391	1056	PLEKHH2	0.0001	-1.2839
977	TBX6	0.0236	-1.2095	1017	GP1BA	0.0239	-1.2394	1057	POU2F3	0.0026	-1.2842
978	NEK6	0.0008	-1.2098	1018	HOXA11-AS	0.0001	-1.2406	1058	SAMD12	0.0004	-1.2849
979	MESP2	0.0396	-1.2109	1019	ANKZF1	0.0001	-1.2463	1059	ANKRD34A	0.0317	-1.2852
980	ZNF10	0.0221	-1.2110	1020	C12orf76	0.0003	-1.2469	1060	GBGT1	0.0006	-1.2864
981	DNAH2	0.0061	-1.2116	1021	LINC01348	0.0152	-1.2479	1061	TMPRSS13	0.0077	-1.2869
982	FAM171A2	0.0460	-1.2119	1022	MARCKS	0.0001	-1.2490	1062	HCG25	0.0365	-1.2870
983	LINC01133	0.0121	-1.2121	1023	EDDM13	0.0264	-1.2497	1063	ATF3	0.0029	-1.2875
984	SUFU	< 0.0001	-1.2122	1024	OCEL1	0.0019	-1.2498	1064	JAG2	< 0.0001	-1.2885
985	NAP1L2	0.0002	-1.2130	1025	NAA80	0.0071	-1.2513	1065	SPAG8	0.0037	-1.2898
986	SYT15	0.0017	-1.2151	1026	HOXA3	0.0002	-1.2514	1066	LINC01355	0.0009	-1.2913
987	HEPH	0.0495	-1.2156	1027	PIGZ	0.0020	-1.2516	1067	SERPINF2	0.0013	-1.2920
988	GTF2H4	0.0476	-1.2156	1028	ASTN2	0.0042	-1.2541	1068	TTC33	0.0001	-1.2924
989	PYY	0.0491	-1.2156	1029	HNFB4A	0.0191	-1.2541	1069	THRA	< 0.0001	-1.2939
990	ZNF772	0.0170	-1.2156	1030	MLXIPL	0.0038	-1.2555	1070	PCYT1B	< 0.0001	-1.2943
991	GABRA3	0.0208	-1.2210	1031	BCL11A	0.0001	-1.2559	1071	FAM13A	0.0012	-1.2946
992	SYTL3	0.0002	-1.2213	1032	FAT4	0.0001	-1.2572	1072	HLTF	0.0001	-1.2949
993	ASAP3	0.0001	-1.2217	1033	SYNPO2	0.0015	-1.2577	1073	ETV1	0.0001	-1.2958
994	LRRC27	0.0013	-1.2220	1034	NTN4	< 0.0001	-1.2582	1074	KCTD7	0.0006	-1.2966
995	HOXC13-AS	0.0001	-1.2227	1035	LINC00653	0.0018	-1.2587	1075	RAB3D	0.0021	-1.2967
996	ARMH1	0.0467	-1.2231	1036	H2AW	0.0003	-1.2609	1076	PGAP1	< 0.0001	-1.2971
997	FAM201A	0.0007	-1.2247	1037	KCNMB4	0.0022	-1.2630	1077	GSTA4	0.0076	-1.2973
998	FRK	0.0018	-1.2257	1038	MUC3A	0.0097	-1.2639	1078	GOLGA6L10	0.0006	-1.2986
999	IVL	0.0004	-1.2286	1039	SPATA6	0.0024	-1.2687	1079	DLEC1	0.0467	-1.2993
1000	MYEF2	0.0011	-1.2286	1040	NDC80	0.0002	-1.2688	1080	TUBBP5	0.0001	-1.2999

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (10/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1081	ELL3	0.0178	-1.3006	1121	PLEKHM3	< 0.0001	-1.3281	1161	PRSS8	0.0001	-1.3567
1082	PCSK4	0.0072	-1.3011	1122	LPAR6	< 0.0001	-1.3281	1162	LINC01226	0.0140	-1.3568
1083	CCDC85A	0.0004	-1.3014	1123	ZNF396	0.0153	-1.3283	1163	FAM218A	0.0158	-1.3572
1084	CYP2A13	0.0002	-1.3016	1124	ST6GAL1	0.0001	-1.3283	1164	VASH2	0.0285	-1.3593
1085	TNFAIP2	0.0012	-1.3025	1125	CTF1	0.0005	-1.3285	1165	OTULINL	0.0232	-1.3598
1086	ADRB1	0.0021	-1.3042	1126	H3C6	0.0010	-1.3286	1166	KDM3A	< 0.0001	-1.3602
1087	OTX1	0.0002	-1.3045	1127	FAM117B	0.0035	-1.3288	1167	GAREM1	0.0003	-1.3618
1088	RDH5	0.0416	-1.3046	1128	SYNPO	< 0.0001	-1.3295	1168	CRYBG2	0.0016	-1.3618
1089	FOXN3	0.0001	-1.3051	1129	PPP1R1C	0.0024	-1.3295	1169	SV2A	< 0.0001	-1.3626
1090	ATF7IP2	0.0024	-1.3055	1130	S1PR5	0.0001	-1.3306	1170	XPC	0.0001	-1.3638
1091	TUBA3FP	< 0.0001	-1.3067	1131	UCP2	0.0143	-1.3309	1171	CASTOR1	0.0003	-1.3642
1092	BTG1	< 0.0001	-1.3071	1132	NSUN7	0.0063	-1.3333	1172	NUDT18	0.0001	-1.3651
1093	FAM122C	0.0001	-1.3079	1133	PIK3R3	0.0001	-1.3334	1173	SREBF1	< 0.0001	-1.3652
1094	PLEKHG6	0.0004	-1.3079	1134	VSTM5	0.0012	-1.3344	1174	FIGN	0.0001	-1.3659
1095	IL6R	0.0037	-1.3083	1135	FHDC1	0.0002	-1.3344	1175	DET1	0.0206	-1.3660
1096	CCDC169	0.0008	-1.3092	1136	CLIP3	0.0108	-1.3356	1176	C2orf27A	0.0005	-1.3671
1097	FZD2	0.0001	-1.3118	1137	CLDN8	0.0034	-1.3368	1177	GLCC1	0.0006	-1.3671
1098	BTN2A2	< 0.0001	-1.3129	1138	H2BC9	0.0004	-1.3370	1178	H2BC18	0.0022	-1.3694
1099	AMOTL1	< 0.0001	-1.3132	1139	SESN1	0.0004	-1.3374	1179	LMCD1	0.0014	-1.3714
1100	KDM4D	0.0016	-1.3137	1140	RWDD2A	0.0052	-1.3387	1180	TCEANC	0.0014	-1.3718
1101	ETFBKMT	0.0138	-1.3160	1141	LGR4	< 0.0001	-1.3392	1181	TLR3	0.0018	-1.3739
1102	ESPL1	< 0.0001	-1.3163	1142	GGT1	0.0261	-1.3396	1182	KLF8	< 0.0001	-1.3743
1103	TNFAIP8L1	0.0001	-1.3185	1143	LINC02035	0.0004	-1.3397	1183	ALPK1	0.0006	-1.3754
1104	ZNF483	0.0029	-1.3187	1144	PCAT6	0.0071	-1.3398	1184	EDA	0.0028	-1.3762
1105	ZSCAN31	0.0001	-1.3198	1145	TNRC6B	0.0003	-1.3421	1185	PCDHGA7	0.0369	-1.3775
1106	LINC02672	0.0245	-1.3208	1146	GLS2	0.0221	-1.3426	1186	GGT6	0.0058	-1.3781
1107	RTL8B	0.0237	-1.3217	1147	RFXAP	0.0013	-1.3426	1187	LINC02298	0.0011	-1.3792
1108	SUOX	< 0.0001	-1.3224	1148	ATF7IP	< 0.0001	-1.3444	1188	DOCK3	0.0064	-1.3794
1109	LINC01695	0.0029	-1.3230	1149	FAM161A	0.0002	-1.3459	1189	PBX1	< 0.0001	-1.3794
1110	LINC02861	0.0287	-1.3230	1150	SP5	0.0027	-1.3463	1190	MNX1	0.0008	-1.3796
1111	MT1G	0.0424	-1.3230	1151	SYTL5	0.0001	-1.3473	1191	TTC32	0.0003	-1.3810
1112	HSD52	0.0072	-1.3230	1152	ZBED3	0.0001	-1.3476	1192	BAZ2B	< 0.0001	-1.3815
1113	MEX3B	0.0122	-1.3232	1153	UBALD2	< 0.0001	-1.3477	1193	SULT1A1	< 0.0001	-1.3817
1114	PPP1R32	0.0438	-1.3232	1154	FAHD2CP	0.0034	-1.3482	1194	SRRM3	0.0007	-1.3841
1115	CENPF	< 0.0001	-1.3238	1155	RCOR2	0.0047	-1.3492	1195	B3GNT8	0.0149	-1.3844
1116	ZFP14	0.0019	-1.3238	1156	PDGFC	< 0.0001	-1.3538	1196	BCL11B	0.0017	-1.3846
1117	GCNT4	0.0017	-1.3246	1157	SCN1B	0.0209	-1.3540	1197	CYP39A1	0.0010	-1.3854
1118	PHLDB1	0.0001	-1.3260	1158	TMEM61	0.0448	-1.3540	1198	SLC46A3	0.0011	-1.3861
1119	VMAC	0.0047	-1.3262	1159	EXOC3L4	0.0089	-1.3543	1199	SULF1	0.0001	-1.3868
1120	ZSCAN30	0.0003	-1.3267	1160	CAPN11	0.0119	-1.3548	1200	ILDR1	0.0013	-1.3883

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (11/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1201	PCMTD1	< 0.0001	-1.3911	1241	LIN7B	0.0096	-1.4292	1281	CROT	< 0.0001	-1.4808
1202	CYP3A7	0.0249	-1.3923	1242	GNG2	0.0257	-1.4303	1282	BCL2L10	0.0440	-1.4828
1203	TMPRSS11E	0.0090	-1.3931	1243	SRGAP3	0.0015	-1.4308	1283	TSHZ1	< 0.0001	-1.4830
1204	TMEM191B	0.0028	-1.3947	1244	KCNH2	0.0215	-1.4341	1284	DIO2	0.0008	-1.4831
1205	CBLB	< 0.0001	-1.3951	1245	MARK1	0.0004	-1.4343	1285	MLLT3	< 0.0001	-1.4836
1206	ADGRF3	0.0058	-1.3952	1246	RAB3A	0.0029	-1.4344	1286	WDR31	0.0001	-1.4840
1207	TMEM139	0.0001	-1.3954	1247	SLC30A4	0.0003	-1.4350	1287	LINC02593	0.0045	-1.4866
1208	DMRTA1	0.0212	-1.3971	1248	TBX20	0.0427	-1.4366	1288	MIR762HG	0.0003	-1.4879
1209	TRIM17	0.0044	-1.3985	1249	C3orf18	0.0048	-1.4378	1289	CD86	0.0208	-1.4888
1210	PPFIBP2	0.0003	-1.3998	1250	FAM167B	0.0065	-1.4408	1290	SPATA7	0.0003	-1.4916
1211	HEXIM2	0.0026	-1.4020	1251	C1orf115	0.0202	-1.4424	1291	ZNF711	< 0.0001	-1.4926
1212	DLEU2L	0.0154	-1.4020	1252	FBXO44	0.0075	-1.4433	1292	HOXA5	0.0001	-1.4935
1213	H2AC11	0.0003	-1.4036	1253	JMY	0.0011	-1.4437	1293	TRAM1L1	0.0197	-1.4936
1214	PLIN4	0.0156	-1.4047	1254	RGS17	0.0003	-1.4485	1294	PGM2L1	0.0001	-1.4940
1215	ARMCX2	0.0014	-1.4050	1255	LINC02731	0.0311	-1.4491	1295	AGPAT4	0.0012	-1.4954
1216	LNX1	0.0018	-1.4072	1256	PCDHGA10	0.0166	-1.4491	1296	MIR4477B	0.0110	-1.4963
1217	NUTM2D	0.0256	-1.4093	1257	STX1B	0.0391	-1.4495	1297	MAML2	< 0.0001	-1.4973
1218	ANGPTL1	0.0162	-1.4106	1258	DUSP19	0.0440	-1.4520	1298	AKAP3	0.0306	-1.4980
1219	GRIN3B	0.0327	-1.4106	1259	PTPRS	< 0.0001	-1.4520	1299	ACACB	< 0.0001	-1.5014
1220	OR1F1	0.0015	-1.4106	1260	RAB26	0.0001	-1.4539	1300	ALDH3B2	0.0055	-1.5018
1221	LRRIQ3	0.0485	-1.4106	1261	PAIP2B	0.0001	-1.4563	1301	MPHOSPH9	< 0.0001	-1.5023
1222	LIPH	0.0001	-1.4109	1262	LINC00551	0.0336	-1.4567	1302	FUT9	0.0004	-1.5025
1223	HOXA6	0.0008	-1.4120	1263	GPX8	0.0001	-1.4576	1303	VEGFD	0.0332	-1.5031
1224	TRIM31	0.0005	-1.4128	1264	USH1G	0.0022	-1.4606	1304	NEAT1	0.0001	-1.5068
1225	LINC01232	0.0004	-1.4152	1265	BANK1	0.0321	-1.4613	1305	TSPAN10	0.0407	-1.5071
1226	NODAL	0.0495	-1.4159	1266	C1QL4	0.0065	-1.4613	1306	OVOL2	< 0.0001	-1.5084
1227	PHF7	0.0002	-1.4175	1267	C2CD4A	0.0387	-1.4613	1307	ICAM5	0.0001	-1.5097
1228	ST6GALNAC1	0.0052	-1.4176	1268	LRRC4B	0.0490	-1.4613	1308	CLEC2D	0.0006	-1.5117
1229	ZNF311	0.0295	-1.4180	1269	TRAFD1	< 0.0001	-1.4614	1309	RNFT2	0.0190	-1.5143
1230	H2BC6	0.0420	-1.4195	1270	ZNF85	0.0171	-1.4615	1310	ZNF726	0.0140	-1.5179
1231	HOXC6	0.0029	-1.4212	1271	TWIST1	0.0175	-1.4624	1311	LYRM9	0.0059	-1.5187
1232	TTC25	0.0062	-1.4216	1272	CCDC89	0.0184	-1.4667	1312	LINC00672	0.0094	-1.5188
1233	LINC01176	0.0061	-1.4219	1273	ATP8B3	0.0295	-1.4708	1313	MPP2	0.0001	-1.5188
1234	MXI1	0.0001	-1.4226	1274	S100A5	0.0018	-1.4708	1314	MISP3	0.0101	-1.5190
1235	RFX3	0.0008	-1.4226	1275	ANXA2R	0.0077	-1.4717	1315	STRA6	0.0003	-1.5203
1236	SHC3	0.0497	-1.4233	1276	BTN3A1	0.0002	-1.4728	1316	DIXDC1	0.0033	-1.5213
1237	CDC25C	< 0.0001	-1.4247	1277	GABARAPL1	< 0.0001	-1.4751	1317	HECW2	0.0005	-1.5215
1238	SWT1	0.0027	-1.4251	1278	RGS2	0.0001	-1.4768	1318	RAPGEFL1	0.0002	-1.5257
1239	NLGN4X	0.0088	-1.4258	1279	ARL17B	0.0367	-1.4794	1319	TBX19	< 0.0001	-1.5272
1240	ZNF182	0.0004	-1.4275	1280	PRANCR	0.0031	-1.4808	1320	SATB1	0.0002	-1.5329

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (12/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1321	KIF21B	0.0351	-1.5345	1361	CASTOR2	< 0.0001	-1.5903	1401	LINC01703	0.0004	-1.6511
1322	LGALS7	0.0495	-1.5354	1362	GRID2IP	0.0015	-1.5908	1402	GASK1B	0.0124	-1.6515
1323	PPIAP53	0.0427	-1.5354	1363	FAM106A	0.0205	-1.5934	1403	APH1B	0.0197	-1.6523
1324	ZNF404	0.0211	-1.5354	1364	MYCL	0.0007	-1.5992	1404	CAPS2	0.0001	-1.6525
1325	ZC4H2	0.0233	-1.5376	1365	SIDT1	0.0003	-1.5993	1405	PHF21A	< 0.0001	-1.6526
1326	DNMT3B	0.0002	-1.5379	1366	LINC00324	0.0159	-1.6019	1406	ZNF433	0.0014	-1.6554
1327	DAPK2	0.0025	-1.5416	1367	LINC00649	0.0015	-1.6028	1407	LINC02043	0.0104	-1.6563
1328	LINC00910	0.0001	-1.5426	1368	LINC02057	0.0067	-1.6035	1408	PALMD	0.0008	-1.6566
1329	WNK2	0.0277	-1.5474	1369	SLC16A12	0.0021	-1.6045	1409	GHET1	0.0005	-1.6570
1330	FLG2	0.0111	-1.5475	1370	RAB11FIP4	< 0.0001	-1.6054	1410	FAM182B	< 0.0001	-1.6581
1331	GHDC	0.0122	-1.5490	1371	SPEF1	0.0265	-1.6056	1411	FAM227A	0.0047	-1.6587
1332	SCUBE3	0.0213	-1.5490	1372	PRR34	0.0339	-1.6068	1412	NOTCH3	0.0002	-1.6631
1333	STX19	0.0004	-1.5490	1373	SYT16	0.0278	-1.6089	1413	LINC00920	0.0023	-1.6650
1334	CCDC30	0.0235	-1.5532	1374	LINC01534	0.0310	-1.6092	1414	HOXA13	< 0.0001	-1.6660
1335	H2BU1	0.0034	-1.5536	1375	TMEM187	0.0001	-1.6093	1415	RAG1	0.0374	-1.6678
1336	HEG1	< 0.0001	-1.5592	1376	SPTSSB	0.0051	-1.6100	1416	ZNF618	< 0.0001	-1.6679
1337	FOXL2NB	0.0002	-1.5597	1377	SOST	0.0002	-1.6140	1417	PDE5A	< 0.0001	-1.6685
1338	OOEP	0.0079	-1.5605	1378	KMT5C	0.0024	-1.6156	1418	MSH5-SAPCD1	0.0024	-1.6689
1339	TTC28	0.0209	-1.5612	1379	IL20RB	< 0.0001	-1.6157	1419	ATP8A1	0.0004	-1.6692
1340	CDKN2B	0.0001	-1.5613	1380	KLHDC9	0.0003	-1.6173	1420	ROR2	0.0001	-1.6695
1341	ANK1	0.0010	-1.5613	1381	FRAT1	0.0084	-1.6243	1421	NRG4	0.0006	-1.6707
1342	NYAP2	0.0033	-1.5645	1382	ZNF774	0.0011	-1.6248	1422	TTBK2	< 0.0001	-1.6716
1343	LINC00847	0.0003	-1.5658	1383	MAFA	0.0082	-1.6253	1423	C6orf58	0.0430	-1.6738
1344	GLUL	< 0.0001	-1.5659	1384	MMP12	0.0201	-1.6253	1424	LINC00598	0.0381	-1.6738
1345	KLLN	0.0003	-1.5671	1385	LINC00471	0.0134	-1.6253	1425	DHRS3	< 0.0001	-1.6761
1346	B4GAT1	0.0003	-1.5672	1386	BTN3A3	< 0.0001	-1.6264	1426	WIPF3	0.0337	-1.6798
1347	LINC01126	0.0477	-1.5722	1387	HEY1	0.0034	-1.6292	1427	ADAM1B	0.0446	-1.6798
1348	LINC00884	0.0349	-1.5750	1388	AK8	0.0206	-1.6316	1428	XKR9	0.0312	-1.6798
1349	DYRK1B	< 0.0001	-1.5751	1389	MYLIP	< 0.0001	-1.6326	1429	GDF9	0.0305	-1.6812
1350	EPHA4	< 0.0001	-1.5762	1390	INHA	0.0026	-1.6358	1430	SLC35E2A	0.0248	-1.6815
1351	HOGA1	0.0037	-1.5771	1391	CIART	0.0051	-1.6394	1431	H2BC10	0.0078	-1.6873
1352	LINC01521	0.0009	-1.5795	1392	ARHGEF19	< 0.0001	-1.6401	1432	SIAH3	0.0075	-1.6873
1353	MICE	0.0279	-1.5800	1393	CYRIA	0.0001	-1.6426	1433	CYP2U1	0.0481	-1.6886
1354	LINC00449	0.0373	-1.5813	1394	ANKRD6	0.0413	-1.6427	1434	ZNF385C	0.0462	-1.6890
1355	GIPR	0.0025	-1.5816	1395	MMP11	0.0168	-1.6441	1435	ZFHX4	0.0035	-1.6903
1356	AKR7A3	0.0282	-1.5826	1396	GUCA1B	0.0302	-1.6445	1436	TMEM221	0.0139	-1.6933
1357	LYPD6	< 0.0001	-1.5828	1397	FAM131B	0.0004	-1.6476	1437	SASH1	< 0.0001	-1.6940
1358	GAS1	0.0052	-1.5888	1398	MAP2K6	< 0.0001	-1.6489	1438	RNF122	0.0006	-1.6944
1359	KAZALD1	0.0012	-1.5890	1399	LINC00526	0.0267	-1.6491	1439	CEBPA	0.0088	-1.6955
1360	FAM229A	0.0165	-1.5895	1400	PRICKLE1	0.0001	-1.6502	1440	LY6D	0.0149	-1.6973

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (13/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1441	PALM	0.0104	-1.7070	1481	LINC01554	0.0057	-1.7999	1521	PNPLA3	0.0008	-1.8824
1442	DMRT2	0.0011	-1.7077	1482	NPBWR1	0.0005	-1.8011	1522	C17orf113	0.0075	-1.8831
1443	C14orf132	0.0013	-1.7086	1483	MEF2C	0.0002	-1.8025	1523	ARID3A	0.0001	-1.8891
1444	CASKIN1	0.0022	-1.7129	1484	FGF1	0.0003	-1.8040	1524	CERNA1	0.0071	-1.8941
1445	FOXD2	0.0093	-1.7165	1485	TMEM131L	< 0.0001	-1.8044	1525	HOXC13	0.0002	-1.8962
1446	WDR88	0.0269	-1.7166	1486	AZIN2	0.0009	-1.8051	1526	PRX	0.0001	-1.8979
1447	LINC02615	0.0001	-1.7174	1487	SALL4	0.0016	-1.8074	1527	CEP68	< 0.0001	-1.8995
1448	LINC01637	0.0002	-1.7216	1488	WNT5A	0.0298	-1.8094	1528	H3C1	0.0216	-1.9019
1449	LRRC73	0.0274	-1.7226	1489	CDNF	0.0182	-1.8104	1529	BNC2	0.0008	-1.9024
1450	KBTBD3	0.0001	-1.7267	1490	NATD1	< 0.0001	-1.8112	1530	JADE1	0.0001	-1.9027
1451	FTCDNL1	0.0114	-1.7304	1491	LINC00271	0.0328	-1.8143	1531	EYA1	0.0040	-1.9034
1452	CASP14	0.0009	-1.7313	1492	DMBX1	0.0009	-1.8194	1532	HBP1	< 0.0001	-1.9098
1453	SLITRK6	0.0082	-1.7368	1493	KANTR	0.0010	-1.8200	1533	ARHGAP28	0.0020	-1.9148
1454	SBK1	0.0041	-1.7393	1494	EPOR	0.0015	-1.8289	1534	PSCA	0.0050	-1.9158
1455	H2BC7	0.0175	-1.7394	1495	TRANK1	< 0.0001	-1.8338	1535	DLX4	< 0.0001	-1.9163
1456	MIR4263	0.0487	-1.7440	1496	PRKG2	0.0083	-1.8347	1536	ZKSCAN3	< 0.0001	-1.9177
1457	FAM184B	0.0164	-1.7440	1497	CAPNS2	0.0012	-1.8378	1537	FBXL20	0.0005	-1.9194
1458	RAP2CP1	0.0058	-1.7440	1498	PIK3IP1	< 0.0001	-1.8390	1538	LINC01719	0.0036	-1.9253
1459	TECTA	0.0002	-1.7440	1499	C17orf100	0.0004	-1.8413	1539	MIR646HG	0.0233	-1.9254
1460	LINC00479	0.0002	-1.7441	1500	SCN8A	0.0066	-1.8441	1540	LINC01852	0.0394	-1.9254
1461	CDRT4	0.0124	-1.7480	1501	YPEL3	0.0001	-1.8447	1541	GSE1	< 0.0001	-1.9285
1462	C14orf93	< 0.0001	-1.7486	1502	BTBD8	0.0007	-1.8474	1542	PPM1H	0.0002	-1.9305
1463	CYP3A4	0.0342	-1.7539	1503	IKZF2	0.0005	-1.8496	1543	DLX6	0.0031	-1.9313
1464	MEIS2	< 0.0001	-1.7544	1504	LINC02637	0.0020	-1.8513	1544	LINC01970	0.0042	-1.9320
1465	SMAD6	< 0.0001	-1.7551	1505	IL2RB	0.0025	-1.8513	1545	FAM43A	0.0006	-1.9380
1466	EYA2	0.0124	-1.7563	1506	NALT1	0.0007	-1.8648	1546	SEMA3E	0.0321	-1.9489
1467	LOXL4	0.0176	-1.7602	1507	LINC00899	0.0001	-1.8670	1547	NRG2	< 0.0001	-1.9502
1468	HOXC12	0.0001	-1.7607	1508	CRNDE	0.0001	-1.8674	1548	PLAG1	0.0035	-1.9516
1469	C17orf78	0.0422	-1.7615	1509	STAG3	0.0402	-1.8699	1549	ZNF837	0.0017	-1.9538
1470	LIX1L	0.0118	-1.7643	1510	ULK1	< 0.0001	-1.8712	1550	SP8	0.0105	-1.9564
1471	SLC25A42	0.0029	-1.7668	1511	BMP3	0.0027	-1.8714	1551	PIK3C2B	0.0001	-1.9723
1472	CNTRL	< 0.0001	-1.7706	1512	EFCAB12	0.0068	-1.8747	1552	GRB7	0.0001	-1.9724
1473	ULBP1	0.0004	-1.7746	1513	DNMT3A	< 0.0001	-1.8762	1553	FOXO6	0.0020	-1.9768
1474	PPM1K	0.0062	-1.7823	1514	RHEBL1	0.0026	-1.8770	1554	TNFRSF13C	0.0018	-1.9786
1475	ZMYM3	< 0.0001	-1.7835	1515	SNAI3	0.0022	-1.8799	1555	C7orf61	0.0350	-1.9788
1476	ELF3	0.0007	-1.7847	1516	METTL7A	0.0002	-1.8800	1556	STOX2	0.0304	-1.9817
1477	SPATA25	0.0131	-1.7850	1517	ETV2	0.0022	-1.8814	1557	CDKN2C	< 0.0001	-1.9819
1478	SPACA6P-AS	0.0009	-1.7935	1518	KRT71	0.0259	-1.8823	1558	PRSS36	0.0031	-1.9824
1479	RNA5SP37	0.0081	-1.7946	1519	KCNV1	0.0002	-1.8823	1559	LINC02541	0.0003	-1.9831
1480	HCG4	0.0140	-1.7946	1520	LUNAR1	0.0158	-1.8823	1560	HOXA2	0.0001	-1.9847

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (14/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1561	RBP3	0.0018	-1.9859	1601	ZNF821	0.0039	-2.1033	1641	GRAMD2A	0.0001	-2.2313
1562	NPIPA2	0.0461	-1.9896	1602	TMEM86A	0.0141	-2.1075	1642	ADH1C	< 0.0001	-2.2339
1563	PAUPAR	0.0071	-1.9896	1603	FGD3	< 0.0001	-2.1092	1643	ARL5AP3	< 0.0001	-2.2339
1564	TUSC1	0.0332	-1.9896	1604	GAPDHP22	0.0421	-2.1096	1644	BHLHE22	< 0.0001	-2.2339
1565	TCP11L2	0.0001	-1.9917	1605	LINC01546	0.0139	-2.1144	1645	BRINP3	< 0.0001	-2.2339
1566	H3C14	0.0418	-1.9995	1606	LINC01224	0.0021	-2.1203	1646	C9orf50	< 0.0001	-2.2339
1567	HOTAIR	< 0.0001	-1.9997	1607	ZBTB7C	0.0014	-2.1203	1647	CICP18	< 0.0001	-2.2339
1568	PROCA1	0.0001	-2.0037	1608	GPRIN2	0.0072	-2.1204	1648	CTSLP3	< 0.0001	-2.2339
1569	PITX2	0.0003	-2.0073	1609	P2RX7	0.0062	-2.1204	1649	CTXN3	< 0.0001	-2.2339
1570	ADORA1	0.0164	-2.0131	1610	TDRD5	0.0317	-2.1280	1650	DCT	< 0.0001	-2.2339
1571	GOLGA8H	0.0164	-2.0131	1611	ZNF93	0.0472	-2.1280	1651	ESX1	< 0.0001	-2.2339
1572	GCOM1	0.0010	-2.0146	1612	APOBR	0.0168	-2.1320	1652	F2	< 0.0001	-2.2339
1573	DNAJB4	0.0001	-2.0170	1613	MINDY1	< 0.0001	-2.1375	1653	FLJ40194	< 0.0001	-2.2339
1574	VANGL2	0.0016	-2.0289	1614	KLHL10	0.0491	-2.1439	1654	FMO1	< 0.0001	-2.2339
1575	LINC00663	0.0008	-2.0314	1615	LINC00427	0.0489	-2.1439	1655	H2AC21	< 0.0001	-2.2339
1576	LINC02175	0.0117	-2.0355	1616	FOXN1	0.0002	-2.1455	1656	KIAA0895LP1	< 0.0001	-2.2339
1577	MGC16275	0.0061	-2.0363	1617	GDPD1	0.0102	-2.1503	1657	LINC00381	< 0.0001	-2.2339
1578	RHO	0.0009	-2.0399	1618	MIR1915HG	0.0001	-2.1514	1658	LINC01543	< 0.0001	-2.2339
1579	ZNF775	0.0004	-2.0401	1619	ZSCAN23	0.0286	-2.1514	1659	LINC01600	< 0.0001	-2.2339
1580	ZNF442	0.0231	-2.0403	1620	FITM1	0.0058	-2.1514	1660	LINC02284	< 0.0001	-2.2339
1581	RNF225	0.0212	-2.0403	1621	WNT8B	0.0097	-2.1514	1661	M1AP	< 0.0001	-2.2339
1582	TMCC2	0.0003	-2.0476	1622	DNAJC22	0.0040	-2.1516	1662	MIR548N	< 0.0001	-2.2339
1583	FAM214A	< 0.0001	-2.0530	1623	PXDNL	0.0302	-2.1724	1663	PDX1	< 0.0001	-2.2339
1584	JAK3	0.0019	-2.0538	1624	CCNG2	0.0001	-2.1749	1664	RPSAP76	< 0.0001	-2.2339
1585	FAM117A	< 0.0001	-2.0560	1625	DENND5B	< 0.0001	-2.1829	1665	TBC1D26	< 0.0001	-2.2339
1586	LINC02643	0.0126	-2.0599	1626	CD164L2	0.0118	-2.1846	1666	TTBK1	< 0.0001	-2.2339
1587	NANOS1	0.0001	-2.0606	1627	CORT	0.0030	-2.1846	1667	UGT3A1	< 0.0001	-2.2339
1588	RBM43	0.0001	-2.0615	1628	H2AC17	0.0325	-2.1846	1668	DNAJB5	0.0005	-2.2403
1589	NOL4L	< 0.0001	-2.0618	1629	PTGIS	0.0193	-2.1899	1669	WSCD2	0.0031	-2.2407
1590	ANGPT1	0.0074	-2.0638	1630	ARID5B	0.0001	-2.1917	1670	SPATA12	< 0.0001	-2.2412
1591	TMEM185AP1	0.0068	-2.0638	1631	ARHGAP24	0.0001	-2.2030	1671	MXD3	0.0001	-2.2501
1592	ZNF846	< 0.0001	-2.0695	1632	PROC	< 0.0001	-2.2048	1672	GNRHR2	< 0.0001	-2.2506
1593	ZC3H6	< 0.0001	-2.0742	1633	H3C2	0.0195	-2.2106	1673	SOX12	< 0.0001	-2.2519
1594	LINC02328	0.0023	-2.0773	1634	KLHDC1	0.0015	-2.2123	1674	LINC00939	0.0029	-2.2587
1595	GKAP1	0.0001	-2.0823	1635	RNA5SP18	0.0224	-2.2169	1675	PLIN1	0.0038	-2.2587
1596	PER1	< 0.0001	-2.0840	1636	ORAI3	< 0.0001	-2.2201	1676	PPFIA4	0.0178	-2.2632
1597	PRDM16	0.0034	-2.0895	1637	KRBA2	0.0003	-2.2214	1677	GPR1	0.0031	-2.2648
1598	SLITRK4	0.0001	-2.0994	1638	ZBTB10	0.0007	-2.2256	1678	GLI1	0.0077	-2.2663
1599	ANKRD65	< 0.0001	-2.1014	1639	CREBRF	< 0.0001	-2.2274	1679	LINC00885	0.0096	-2.2693
1600	ZNF844	0.0230	-2.1014	1640	LINC02031	0.0033	-2.2284	1680	APOL4	0.0041	-2.2723

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (15/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1681	SOD2-OT1	0.0103	-2.2723	1721	LINC00052	0.0470	-2.4772	1761	RARB	0.0137	-2.6261
1682	CAVIN2	0.0009	-2.2747	1722	LYPD2	0.0480	-2.4772	1762	MYZAP	0.0021	-2.6266
1683	LFNG	0.0006	-2.2786	1723	LINC01229	0.0291	-2.4870	1763	DRAIC	0.0390	-2.6292
1684	MIR659	0.0459	-2.2821	1724	C11orf72	0.0445	-2.4908	1764	PNRC1	< 0.0001	-2.6442
1685	TSPO2	0.0447	-2.2822	1725	SLC12A3	0.0450	-2.4908	1765	IGHE	0.0008	-2.6466
1686	ZNF878	0.0443	-2.2958	1726	CRB2	0.0270	-2.5006	1766	ADAD2	0.0066	-2.6563
1687	BCL2L14	0.0070	-2.3046	1727	PPIAP51	0.0270	-2.5006	1767	CYP26A1	0.0002	-2.6616
1688	SAMD11	0.0012	-2.3054	1728	RPRML	0.0270	-2.5006	1768	RGS9	0.0008	-2.6663
1689	RNF144B	0.0002	-2.3084	1729	TSPOAP1	0.0270	-2.5006	1769	TRIM6	< 0.0001	-2.6666
1690	CBFA2T3	0.0093	-2.3094	1730	KRT74	0.0069	-2.5179	1770	LINC00957	0.0010	-2.6711
1691	FAM181B	0.0028	-2.3121	1731	TBC1D9	< 0.0001	-2.5339	1771	RN7SKP150	0.0498	-2.6820
1692	ARRDC3	< 0.0001	-2.3178	1732	BBC3	0.0001	-2.5392	1772	CCR7	0.0237	-2.6956
1693	LINC02606	0.0045	-2.3230	1733	CCDC33	0.0004	-2.5411	1773	LINC00412	0.0241	-2.6956
1694	FILIP1	0.0051	-2.3230	1734	CALCRL	0.0091	-2.5414	1774	TRPC4	0.0235	-2.6956
1695	LINC00900	0.0011	-2.3230	1735	ATP6V1G2	0.0129	-2.5443	1775	FSIP2	0.0465	-2.6956
1696	LINC01529	0.0036	-2.3230	1736	ATOH8	0.0103	-2.5490	1776	LINC00525	0.0484	-2.6956
1697	GRAMD1C	0.0001	-2.3403	1737	MYB	< 0.0001	-2.5520	1777	MST1L	0.0240	-2.6957
1698	TESK2	0.0005	-2.3411	1738	HK3	0.0014	-2.5672	1778	PCDHB11	0.0240	-2.6957
1699	CFAP206	0.0090	-2.3464	1739	LUARIS	0.0014	-2.5672	1779	LINC00426	0.0236	-2.6957
1700	GLIPR1L1	0.0096	-2.3464	1740	SSC5D	0.0014	-2.5672	1780	N4BP2L1	0.0001	-2.6976
1701	SLC16A14	0.0003	-2.3478	1741	SYNPO2L	0.0014	-2.5672	1781	KLHL3	0.0038	-2.7070
1702	RGS9BP	0.0326	-2.3525	1742	LINC02889	0.0017	-2.5672	1782	TMEM37	0.0197	-2.7129
1703	LCA5	0.0001	-2.3574	1743	MIR4432HG	0.0017	-2.5672	1783	ABCB4	0.0239	-2.7227
1704	TP53INP1	< 0.0001	-2.3703	1744	MIR6510	0.0017	-2.5672	1784	HIPK4	0.0241	-2.7227
1705	MTUS2	< 0.0001	-2.3752	1745	MLXP1	0.0015	-2.5672	1785	CLEC3A	0.0119	-2.7304
1706	NBEAP2	< 0.0001	-2.3796	1746	PLSCR2	0.0017	-2.5672	1786	PPP1R3G	0.0231	-2.7365
1707	TUB	0.0464	-2.3895	1747	PPIAP45	0.0015	-2.5672	1787	SLIT1	0.0234	-2.7365
1708	SLC25A27	0.0007	-2.4022	1748	RNU4-1	0.0015	-2.5672	1788	TMC2	0.0084	-2.7380
1709	SMAD9	0.0032	-2.4063	1749	RNVU1-4	0.0017	-2.5672	1789	FAM96AP2	0.0444	-2.7425
1710	NEURL1B	0.0004	-2.4111	1750	ST6GALNAC3	0.0017	-2.5672	1790	MYOCD	0.0027	-2.7431
1711	FPGT-TNNI3K	< 0.0001	-2.4303	1751	TSPAN32	0.0017	-2.5672	1791	RAET1E	0.0107	-2.7514
1712	TET1	0.0013	-2.4328	1752	LINC01023	0.0064	-2.5875	1792	POLR2KP1	0.0425	-2.7538
1713	ERVH48-1	0.0396	-2.4342	1753	OXGR1	0.0013	-2.5893	1793	LINC00498	0.0434	-2.7539
1714	HRNR	0.0061	-2.4366	1754	ID1	< 0.0001	-2.5917	1794	HTR1E	0.0060	-2.7622
1715	BCL6	0.0007	-2.4418	1755	LINC02004	0.0206	-2.5984	1795	KRTAP29-1	0.0069	-2.7622
1716	PKD1L2	0.0015	-2.4451	1756	PLXDC1	0.0001	-2.6104	1796	MRRFP1	0.0060	-2.7622
1717	PAX6	< 0.0001	-2.4512	1757	HAND1	0.0102	-2.6144	1797	SIRPAP1	0.0060	-2.7622
1718	LINC00519	0.0006	-2.4643	1758	GUCY2D	0.0253	-2.6154	1798	MORN3	0.0084	-2.7672
1719	C11orf52	0.0300	-2.4771	1759	MPPED2	< 0.0001	-2.6157	1799	PPP1R3C	0.0014	-2.7783
1720	HCG14	0.0464	-2.4771	1760	SLC29A3	< 0.0001	-2.6157	1800	TMEM200C	0.0024	-2.7805

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (16/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1801	LINC01287	0.0250	-2.8339	1841	KCNK2	0.0200	-3.0153	1881	SMIM32	0.0046	-3.2339
1802	RBP7	0.0463	-2.8339	1842	LRRC19	0.0200	-3.0153	1882	LINC00964	0.0051	-3.2339
1803	POM121L2	0.0449	-2.8341	1843	UPB1	0.0200	-3.0153	1883	MDGA2	0.0186	-3.2610
1804	MIR4783	0.0467	-2.8341	1844	CPAMD8	0.0153	-3.0207	1884	FLJ31356	0.0053	-3.2763
1805	FOLR3	0.0345	-2.8441	1845	TNNC1	0.0184	-3.0229	1885	KCTD16	0.0300	-3.3017
1806	CCDC110	0.0004	-2.8513	1846	DNAI3	0.0466	-3.0289	1886	INHBC	0.0117	-3.3487
1807	PELI2	0.0001	-2.8524	1847	IGSF22	0.0182	-3.0289	1887	ZNF608	0.0040	-3.3592
1808	FIBIN	0.0187	-2.8907	1848	TSC22D3	< 0.0001	-3.0374	1888	LINC01843	0.0101	-3.4129
1809	H4C11	0.0129	-2.9005	1849	ENPP5	0.0018	-3.0420	1889	MGAT3	0.0012	-3.4205
1810	HAS1	0.0010	-2.9005	1850	HCG27	0.0004	-3.0663	1890	RFPL3S	0.0200	-3.4228
1811	HRCT1	0.0011	-2.9005	1851	SLC2A4	0.0023	-3.0912	1891	CACNA1A	0.0050	-3.4288
1812	INSL6	0.0008	-2.9005	1852	DDIT4	< 0.0001	-3.0934	1892	LINC01889	0.0046	-3.4288
1813	KIF25	0.0008	-2.9005	1853	ESRRB	0.0024	-3.0955	1893	MIR6512	0.0001	-3.4288
1814	LINC00111	0.0008	-2.9005	1854	PRAMEF1	0.0024	-3.0955	1894	UPP2	0.0001	-3.4288
1815	LINC00637	0.0010	-2.9005	1855	RAD21L1	0.0028	-3.0955	1895	SMIM10L2A	< 0.0001	-3.4688
1816	MIR548AC	0.0008	-2.9005	1856	MIR210HG	< 0.0001	-3.1110	1896	ERVE-1	0.0103	-3.4696
1817	RSPH14	0.0008	-2.9005	1857	ACKR3	< 0.0001	-3.1164	1897	MAST1	0.0018	-3.4797
1818	SLC19A3	0.0008	-2.9005	1858	NAPSA	0.0494	-3.1318	1898	C6orf223	0.0288	-3.5018
1819	TEKT5	0.0119	-2.9005	1859	DLX5	0.0009	-3.1367	1899	KLHL24	< 0.0001	-3.5114
1820	ID3	< 0.0001	-2.9113	1860	MAB21L3	0.0272	-3.1418	1900	C7orf65	0.0027	-3.5179
1821	COLCA2	0.0001	-2.9156	1861	LENEP	0.0313	-3.1439	1901	LINC01962	0.0063	-3.5361
1822	KLHDC8B	0.0375	-2.9177	1862	VPS37D	0.0026	-3.1464	1902	OR10H1	0.0071	-3.5361
1823	DBP	< 0.0001	-2.9236	1863	STPG3	0.0179	-3.1537	1903	LINC02613	0.0117	-3.5436
1824	MGAT4EP	0.0488	-2.9276	1864	LINC01359	0.0172	-3.1673	1904	LINC02607	0.0005	-3.5524
1825	CNOT6LP1	0.0002	-2.9350	1865	BHLHE41	0.0005	-3.1678	1905	LINC01132	0.0109	-3.5572
1826	SLC52A1	0.0048	-2.9468	1866	OLFM4	0.0437	-3.1771	1906	ZNF610	0.0270	-3.5671
1827	PPIAP4	0.0254	-2.9487	1867	SKIDA1	< 0.0001	-3.1892	1907	MIR4795	0.0004	-3.5672
1828	CDH10	0.0060	-2.9514	1868	AADACP1	0.0496	-3.1968	1908	SLC1A6	0.0004	-3.5672
1829	ZNF233	0.0031	-2.9586	1869	LINC01783	0.0497	-3.1968	1909	AXIN2	0.0089	-3.5943
1830	ID4	0.0001	-2.9702	1870	TNFSF10	< 0.0001	-3.1980	1910	LINC01124	0.0320	-3.6230
1831	KLF9	0.0004	-2.9719	1871	YPEL2	< 0.0001	-3.1982	1911	H3-4	0.0140	-3.6292
1832	STON1	< 0.0001	-2.9734	1872	PLCH1	0.0210	-3.2004	1912	LINC01952	0.0267	-3.6647
1833	ZBTB8B	0.0063	-2.9820	1873	TP73	0.0014	-3.2037	1913	PDK4	0.0002	-3.6763
1834	ZNF467	0.0003	-2.9964	1874	LINC00865	0.0133	-3.2103	1914	CHST4	0.0122	-3.6957
1835	ZNF843	0.0204	-3.0055	1875	IGFALS	0.0209	-3.2141	1915	FBXO32	0.0004	-3.6985
1836	EID2B	0.0007	-3.0076	1876	HTR6	0.0126	-3.2241	1916	MIR2116	0.0256	-3.7387
1837	FSTL4	0.0187	-3.0078	1877	ID2	< 0.0001	-3.2269	1917	RBBP8NL	0.0069	-3.7616
1838	SOX2	0.0061	-3.0080	1878	SESN3	0.0001	-3.2305	1918	KIT	0.0105	-3.8128
1839	TLCD3B	0.0005	-3.0131	1879	LINC02137	< 0.0001	-3.2339	1919	SH2D3C	0.0026	-3.8450
1840	INSYN1	0.0198	-3.0153	1880	PXT1	0.0046	-3.2339	1920	GRIA4	0.0114	-3.8595

APÊNDICE B - 1950 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 4h (17/17)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1921	PDE3A	0.0242	-3.9102	1931	FBXO43	0.0122	-4.1782	1941	MPIG6B	0.0003	-4.7818
1922	CHAD	0.0016	-3.9167	1932	LGALS4	< 0.0001	-4.2339	1942	NAP1L3	0.0194	-4.7977
1923	LINC02560	0.0083	-3.9843	1933	GDF6	0.0036	-4.2910	1943	BMF	< 0.0001	-4.8374
1924	ISLR	0.0074	-4.0153	1934	ESRRG	0.0022	-4.3978	1944	PCDH18	< 0.0001	-4.8867
1925	ADAMTS5	0.0081	-4.0229	1935	VSX2	< 0.0001	-4.4485	1945	TXNIP	< 0.0001	-4.9943
1926	RCSD1	0.0112	-4.0313	1936	COLCA1	< 0.0001	-4.5111	1946	VAV3	< 0.0001	-4.9958
1927	CA3	0.0205	-4.0797	1937	TREHP1	0.0037	-4.5943	1947	LINC01271	0.0001	-5.2683
1928	SOSTDC1	0.0208	-4.0905	1938	IL21R	0.0003	-4.6337	1948	PPARGC1A	0.0021	-5.3229
1929	KCNH4	< 0.0001	-4.0955	1939	ISLR2	0.0032	-4.7217	1949	SEMA6D	< 0.0001	-5.5731
1930	SALL2	0.0003	-4.1213	1940	LINC02635	0.0130	-4.7278	1950	LEXM	< 0.0001	-5.7128

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (1/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
1	CSF2	0.0007	7.1927	41	GPATCH4	0.0451	2.2314	81	IRAK2	0.0140	1.7877
2	CXCL8	0.0001	6.9068	42	INHBE	< 0.0001	2.2235	82	MIR3176	0.0077	1.7788
3	KRTAP2-3	0.0005	6.1016	43	LINC01322	< 0.0001	2.2235	83	SH2D5	0.0090	1.7517
4	SPRR2D	< 0.0001	6.0106	44	LRRN3	< 0.0001	2.2235	84	EDNRA	0.0415	1.7506
5	SPRR2A	< 0.0001	5.6613	45	SHISAL2B	< 0.0001	2.2235	85	DUSP6	0.0002	1.7451
6	ESM1	0.0031	5.5602	46	PDCD1LG2	0.0002	2.2235	86	TLR4	0.0001	1.7415
7	CREB5	0.0021	5.5297	47	MIR7111	0.0462	2.2209	87	DUSP4	< 0.0001	1.7340
8	MMP20	0.0018	5.5253	48	GPR179	0.0385	2.1305	88	BIRC3	0.0431	1.7243
9	HSPA6	0.0043	5.2833	49	CAPN14	0.0399	2.1276	89	MYL12BP1	0.0278	1.7134
10	SERPINB2	< 0.0001	4.9075	50	TBPL2	0.0405	2.1276	90	MYH15	0.0088	1.7002
11	CXCL1	< 0.0001	4.8906	51	TMEM156	0.0405	2.1276	91	CXCL6	0.0496	1.6952
12	FOSL1	< 0.0001	4.8301	52	BMPR1A1	0.0273	2.1250	92	MYH16	0.0370	1.6900
13	ADGRF2	< 0.0001	4.7846	53	ACMSD	0.0417	2.1171	93	SLC16A6	0.0107	1.6643
14	CCDC13	0.0001	4.7514	54	ATP5MGL	0.0408	2.1171	94	SLC16A9	0.0011	1.6534
15	EGR3	0.0002	4.7042	55	LINC00484	0.0408	2.1171	95	PHLDA1	0.0001	1.6409
16	BMP6	0.0060	4.6857	56	LRRC43	0.0442	2.1171	96	CEACAM1	0.0010	1.6406
17	SLC24A3	0.0150	4.6350	57	SMLR1	0.0433	2.1171	97	ARHGAP20	0.0128	1.6275
18	IL1RL1	0.0005	4.6099	58	FOSL1	0.0001	2.0387	98	GJA3	0.0425	1.6251
19	SPRY4	0.0003	4.5227	59	DSCAM	0.0014	2.0293	99	IER3	0.0021	1.5938
20	KRTAP3-1	0.0218	4.5055	60	ADORA2A	0.0476	2.0252	100	HBEGF	0.0007	1.5870
21	SAA4	0.0007	4.4648	61	KCNN3	0.0274	2.0242	101	FAM166C	0.0088	1.5806
22	CCDC190	0.0149	4.4071	62	DUSP5	0.0001	2.0185	102	TENT5C	0.0183	1.5623
23	LINC02539	0.0119	4.3402	63	FBLN7	0.0363	1.9843	103	LINC00706	0.0288	1.5557
24	TRPV3	0.0129	4.3257	64	LINC02365	0.0380	1.9843	104	SOCS1	0.0057	1.5377
25	EGR4	0.0001	4.2698	65	SLC8A2	0.0373	1.9843	105	LINC02803	0.0101	1.5264
26	KRT23	0.0051	4.1973	66	C1DP1	0.0396	1.9814	106	CTSE	0.0004	1.5193
27	TNFAIP3	< 0.0001	4.1970	67	SCARNA1	0.0396	1.9814	107	TNFRSF1B	0.0193	1.5072
28	PCNPP3	0.0052	4.1939	68	LINC01561	0.0389	1.9709	108	LINC01127	0.0375	1.5049
29	IGSF11	0.0060	4.1826	69	S1PR3	0.0052	1.9704	109	IL12A	0.0169	1.5009
30	PDCD1LG2	0.0001	4.0580	70	IL1B	0.0026	1.9455	110	ETV1	< 0.0001	1.4933
31	ADAMTS9	0.0038	4.0467	71	GPR3	0.0048	1.9397	111	MIR155HG	0.0101	1.4523
32	TRBV30	0.0058	4.0425	72	LINC02605	0.0384	1.9372	112	NGF	0.0023	1.4501
33	MIR6090	0.0006	3.9872	73	PGF	0.0009	1.9165	113	CHSY3	0.0119	1.4470
34	IRAG1	0.0003	4.0093	74	ISM1	0.0001	1.9023	114	TRIB2	0.0006	1.4371
35	NPAS3	0.0112	3.9684	75	ABCA1	0.0110	1.8899	115	GJB2	0.0013	1.4250
36	G0S2	0.0240	3.9579	76	NTSR1	0.0084	1.8830	116	ARL4C	0.0007	1.4238
37	TNF	0.0012	3.9365	77	TNFAIP3	0.0131	1.8507	117	ST6GALNAC6	0.0196	1.4210
38	LINC01127	0.0003	3.9042	78	ETV5	0.0001	1.8402	118	MARCHF4	0.0044	1.4116
39	CH25H	0.0060	2.3467	79	CHAC1	0.0004	1.8289	119	CSAG3	0.0303	1.4066
40	IL1A	0.0039	2.3185	80	TMEM171	0.0020	1.8221	120	TSPAN2	0.0190	1.4006

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (2/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
121	HS3ST1	0.0012	1.3838	161	ANKRD22	0.0128	1.1570	201	GTF2IRD2	0.0425	-1.0011
122	PAPPA	0.0057	1.3679	162	ITPR1	0.0068	1.1562	202	ATP6V1G2	0.0238	-1.0017
123	SNORA79B	0.0064	1.3525	163	SPRR1B	0.0087	1.1483	203	ACAA2	0.0001	-1.0029
124	PLA2G7	0.0001	1.3494	164	TGFA	0.0002	1.1476	204	SSPN	0.0010	-1.0063
125	ECM2	0.0030	1.3388	165	ANO7	0.0036	1.1388	205	H2BC7	0.0317	-1.0109
126	RGPD6	0.0330	1.3374	166	VEGFA	0.0014	1.1371	206	ZDHHC1	0.0059	-1.0109
127	RELB	0.0123	1.3315	167	ANTXR2	0.0011	1.1331	207	TSPAN8	0.0173	-1.0116
128	CDK5R1	0.0003	1.3284	168	LUCAT1	0.0202	1.1326	208	H2AC13	0.0103	-1.0116
129	HAS3	0.0004	1.3275	169	LINC00216	0.0104	1.1291	209	PAPLN	0.0069	-1.0137
130	CHGB	0.0235	1.2890	170	AEN	< 0.0001	1.1243	210	FSCN2	0.0119	-1.0167
131	ADAMTS14	0.0098	1.2861	171	PLAC4	0.0068	1.1208	211	SYNPO	0.0059	-1.0180
132	ZDHHC20-IT1	0.0104	1.2793	172	SNORD6	0.0051	1.1184	212	DDIT4	0.0010	-1.0187
133	TMEM200A	0.0002	1.2772	173	ASB2	0.0308	1.1158	213	SOD2-OT1	0.0225	-1.0187
134	RIPOR3	0.0430	1.2704	174	CD83	0.0125	1.1115	214	FMO4	0.0328	-1.0197
135	ANGPTL4	0.0005	1.2618	175	EREG	0.0019	1.1106	215	SLC25A42	0.0078	-1.0208
136	TFPI2	< 0.0001	1.2595	176	IL37	0.0438	1.1062	216	ALDH6A1	0.0006	-1.0210
137	SPRY1	0.0028	1.2551	177	RNA5SP317	0.0497	1.1047	217	H2BC21	0.0069	-1.0213
138	UPP1	< 0.0001	1.2512	178	GPRC5B	0.0011	1.1045	218	H2AC11	0.0004	-1.0226
139	NR4A3	0.0075	1.2491	179	SLCO2A1	0.0075	1.0982	219	STX19	0.0313	-1.0241
140	KBTBD8	0.0089	1.2487	180	MGLL	0.0034	1.0952	220	NLGN4X	0.0037	-1.0246
141	SPNS2	0.0140	1.2448	181	STEAP1	< 0.0001	1.0940	221	ALDH3B2	0.0290	-1.0291
142	ARHGAP25	0.0117	1.2438	182	SNORD14A	0.0092	1.0930	222	CCDC85A	0.0113	-1.0310
143	TAGLN3	0.0043	1.2381	183	RAPSN	0.0240	1.0926	223	TMEM176A	0.0243	-1.0371
144	DPF3	0.0111	1.2376	184	MIR100HG	0.0010	1.0925	224	SIGLEC15	0.0061	-1.0386
145	LINC02584	0.0371	1.2374	185	SLC10A6	0.0107	1.0917	225	LINC00638	0.0012	-1.0396
146	ADAM8	0.0030	1.2340	186	PLAUR	0.0172	1.0901	226	SPOCK2	0.0449	-1.0404
147	SLC6A15	0.0116	1.2330	187	LINC00973	0.0152	1.0891	227	ENO4	0.0220	-1.0416
148	EVI2B	0.0008	1.2308	188	TACR2	0.0345	1.0882	228	TMEM59L	0.0306	-1.0418
149	JUN	0.0011	1.2218	189	TFCP2L1	0.0006	1.0705	229	PIK3IP1	< 0.0001	-1.0453
150	AREG	0.0013	1.2149	190	VGLL2	0.0039	1.0695	230	ZBTB20	0.0089	-1.0457
151	PHACTR3	0.0303	1.2062	191	SACS	< 0.0001	1.0616	231	KLHL24	0.0079	-1.0521
152	NEK10	0.0423	1.2035	192	MUC1	0.0194	1.0599	232	HOXC4	0.0015	-1.0530
153	MMP9	0.0120	1.1917	193	LINC02809	0.0300	1.0594	233	ZNF704	0.0011	-1.0545
154	ADD2	0.0079	1.1888	194	PLAU	0.0315	1.0450	234	PLCD4	0.0352	-1.0548
155	MFSD2A	0.0002	1.1875	195	PLD6	0.0018	1.0397	235	LINC01126	0.0190	-1.0567
156	GLYATL1	0.0411	1.1852	196	NKX3-1	0.0015	1.0390	236	MEGF6	0.0016	-1.0588
157	NTM	0.0105	1.1813	197	LIF	0.0360	1.0315	237	SLC39A2	0.0092	-1.0593
158	HYDIN	0.0066	1.1778	198	GLB1L3	0.0112	1.0216	238	ZNF345	0.0129	-1.0599
159	FST	0.0055	1.1683	199	PMP22	0.0354	1.0161	239	CEL	0.0381	-1.0626
160	PLK3	0.0001	1.1659	200	BMX	0.0473	-1.0006	240	OSCAR	0.0112	-1.0657

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (3/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
241	IL36RN	0.0105	-1.0657	281	PGLYRP3	0.0204	-1.1503	321	CYP2A13	0.0013	-1.2694
242	GDF9	0.0095	-1.0666	282	ZNF425	0.0007	-1.1525	322	ATP8A1	0.0049	-1.2727
243	CFAP52	0.0032	-1.0683	283	LINC02057	0.0034	-1.1528	323	NOTCH3	0.0135	-1.2758
244	AHNAK2	0.0003	-1.0707	284	ACKR2	0.0387	-1.1529	324	VWA7	0.0385	-1.2810
245	SYNC	0.0171	-1.0754	285	FBP1	0.0182	-1.1530	325	SCARF1	0.0385	-1.2878
246	EPHA4	0.0083	-1.0763	286	SALL2	0.0105	-1.1538	326	GPR173	0.0185	-1.2887
247	LGR6	0.0021	-1.0769	287	VAV3	0.0005	-1.1566	327	NANOS1	0.0001	-1.2954
248	CFAP70	0.0433	-1.0769	288	DYRK1B	0.0103	-1.1670	328	CYP3A7	0.0311	-1.3006
249	ACSM3	0.0034	-1.0776	289	SCGB1A1	0.0024	-1.1680	329	EYA2	0.0010	-1.3025
250	RTL8B	0.0077	-1.0796	290	TP53INP2	0.0044	-1.1701	330	ABCA4	0.0155	-1.3029
251	JAK3	0.0067	-1.0811	291	NPAS1	0.0002	-1.1708	331	B3GALT4	0.0126	-1.3039
252	RHOBTB3	0.0086	-1.0851	292	NATD1	0.0037	-1.1767	332	GPB1	0.0003	-1.3135
253	SEC14L5	0.0123	-1.0898	293	STX1B	0.0210	-1.1776	333	BEST1	0.0084	-1.3138
254	LINC01224	0.0264	-1.0916	294	HOTAIR	0.0025	-1.1785	334	GRAMD2A	0.0123	-1.3150
255	ZNF396	0.0070	-1.0942	295	CYP26A1	0.0041	-1.1809	335	GDF6	0.0013	-1.3213
256	FLJ37453	0.0019	-1.0944	296	GPR1	0.0033	-1.1887	336	H3C2	0.0184	-1.3239
257	GSTA4	0.0372	-1.0983	297	KRT13	0.0001	-1.1953	337	TMEM191B	0.0018	-1.3267
258	CYP27A1	0.0106	-1.1020	298	RAET1E	0.0326	-1.2038	338	C12orf54	0.0192	-1.3272
259	DUOXA2	0.0055	-1.1029	299	KLHDC9	0.0026	-1.2048	339	DLX4	0.0092	-1.3298
260	FAM66C	0.0178	-1.1041	300	CTF1	0.0001	-1.2063	340	SLC29A3	0.0002	-1.3299
261	AGR2	0.0038	-1.1060	301	WFDC3	0.0323	-1.2072	341	SOST	0.0023	-1.3345
262	GLUL	0.0003	-1.1072	302	FAM181B	0.0209	-1.2072	342	SOX5	0.0097	-1.3391
263	TCEANC	0.0006	-1.1081	303	TBC1D10C	0.0111	-1.2097	343	RNA5SP311	0.0046	-1.3437
264	HOXC13	0.0015	-1.1082	304	LINC01970	0.0017	-1.2122	344	LINC02004	0.0069	-1.3480
265	ADA2	0.0418	-1.1112	305	ABTB1	0.0113	-1.2162	345	ABAT	0.0075	-1.3501
266	NEURL1B	0.0190	-1.1140	306	LINC01704	0.0246	-1.2214	346	SDK1	0.0096	-1.3575
267	H2BC9	0.0054	-1.1200	307	ELMOD1	0.0403	-1.2261	347	PCDH18	0.0017	-1.3617
268	H3C15	0.0474	-1.1226	308	NALT1	0.0257	-1.2288	348	CHAD	0.0374	-1.3623
269	MYL9	0.0036	-1.1238	309	CLU	0.0001	-1.2311	349	RN7SKP23	0.0306	-1.3641
270	ZNF837	0.0113	-1.1280	310	COL5A1	0.0066	-1.2324	350	LZTS1	0.0035	-1.3643
271	HOXC13-AS	0.0030	-1.1301	311	YPEL2	0.0375	-1.2344	351	WNT5B	0.0107	-1.3738
272	BLNK	0.0177	-1.1313	312	SHF	0.0013	-1.2366	352	KCNH3	0.0012	-1.3739
273	MPPED1	0.0432	-1.1315	313	LINC01226	0.0471	-1.2382	353	NPSR1	0.0494	-1.3770
274	UPK2	0.0054	-1.1334	314	RAD51AP2	0.0437	-1.2399	354	LINC02298	< 0.0001	-1.3826
275	PADI3	0.0235	-1.1335	315	PRRT2	0.0345	-1.2461	355	ZBTB8B	0.0159	-1.3828
276	PSCA	0.0069	-1.1373	316	ID1	0.0177	-1.2492	356	MYO1A	0.0286	-1.3833
277	HECW2	0.0101	-1.1377	317	LRRC29	0.0266	-1.2506	357	OR2B6	0.0054	-1.3880
278	CTSF	0.0001	-1.1396	318	HMCN1	0.0021	-1.2577	358	VWA5B2	0.0064	-1.3885
279	EFNB3	0.0140	-1.1455	319	MYO1F	0.0035	-1.2625	359	TSC22D3	0.0005	-1.3990
280	XKRX	0.0285	-1.1460	320	SALL4	0.0019	-1.2659	360	PELI2	0.0060	-1.4034

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (4/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
361	POU5F1B	0.0187	-1.4130	401	VSX2	0.0182	-1.5788	441	KLHDC8B	0.0232	-1.7152
362	ADAM1B	0.0499	-1.4195	402	CAPNS2	0.0003	-1.5874	442	HSPB3	0.0001	-1.7185
363	FAM184B	0.0454	-1.4208	403	MTUS2	0.0004	-1.5882	443	TXNIP	0.0007	-1.7249
364	STPG3	0.0150	-1.4270	404	CACNG4	0.0012	-1.5892	444	LGALS7B	0.0113	-1.7266
365	CAMK2A	0.0170	-1.4280	405	FAM201B	0.0060	-1.5910	445	WSCD2	0.0327	-1.7454
366	RAB26	0.0091	-1.4300	406	KCTD16	0.0043	-1.5992	446	ZNF610	0.0356	-1.7470
367	FGD3	0.0003	-1.4323	407	ST6GALNAC1	0.0022	-1.5996	447	ALPP	0.0045	-1.7476
368	LINC02541	0.0030	-1.4350	408	TLCD3B	0.0083	-1.6066	448	LINC02481	0.0491	-1.7550
369	CFAP94	0.0012	-1.4355	409	ID3	0.0007	-1.6077	449	LINC01952	0.0306	-1.7577
370	MPPED2	0.0003	-1.4434	410	BTBD16	0.0180	-1.6094	450	AOC1	0.0003	-1.7613
371	LINC01679	0.0008	-1.4435	411	DNAAF1	0.0336	-1.6105	451	LINC01348	0.0009	-1.7679
372	CYRIA	0.0070	-1.4471	412	ANXA9	0.0035	-1.6122	452	VTCN1	0.0010	-1.7688
373	PPARGC1A	0.0047	-1.4501	413	CYP4F3	0.0154	-1.6132	453	TP53INP1	0.0024	-1.7727
374	CDKN2B	0.0014	-1.4502	414	ID2	0.0151	-1.6137	454	FAM131B	0.0015	-1.7770
375	NPBWR1	0.0043	-1.4514	415	PKD1L2	0.0014	-1.6178	455	TNFRSF18	0.0107	-1.8022
376	RIMKLBP2	0.0002	-1.4578	416	TNNT2	0.0053	-1.6229	456	COLCA1	0.0129	-1.8057
377	KLK13	< 0.0001	-1.4596	417	PROC	0.0003	-1.6348	457	RBBP8NL	0.0072	-1.8071
378	TNFSF10	0.0021	-1.4620	418	HOGA1	0.0345	-1.6404	458	WTAPP1	0.0186	-1.8170
379	ASCL5	0.0405	-1.4652	419	NAALADL2	0.0130	-1.6450	459	CBFA2T3	0.0373	-1.8303
380	DAPK2	0.0033	-1.4715	420	NEBL	0.0011	-1.6463	460	DIO2	0.0012	-1.8319
381	GPR132	0.0030	-1.4735	421	GRID2IP	0.0106	-1.6546	461	SYTL5	0.0244	-1.8382
382	ACKR3	0.0007	-1.4786	422	STON1	0.0004	-1.6591	462	MYOCD	0.0022	-1.8474
383	DNAJC22	0.0003	-1.4882	423	H2BC17	0.0334	-1.6611	463	PAUPAR	0.0226	-1.8535
384	SCN5A	0.0049	-1.4926	424	LAMB4	0.0293	-1.6690	464	EIF4EBP3	0.0203	-1.8614
385	ALDH3B1	0.0001	-1.4967	425	CCDC151	0.0318	-1.6695	465	APCDD1	0.0002	-1.8703
386	IFITM10	0.0013	-1.4972	426	GPR45	0.0304	-1.6700	466	BMF	0.0023	-1.8800
387	SCEL	0.0007	-1.4974	427	CTXN3	0.0491	-1.6837	467	ACTBL2	0.0106	-1.8862
388	YPEL3	0.0041	-1.5076	428	RFX8	0.0491	-1.6837	468	ID4	0.0016	-1.8947
389	STRA6	0.0167	-1.5184	429	RPS27AP11	0.0491	-1.6837	469	LDB3	0.0309	-1.9005
390	CYP4F12	0.0150	-1.5332	430	BHLHE22	0.0489	-1.6842	470	MIR2116	0.0112	-1.9355
391	SVOPL	0.0089	-1.5353	431	JAKMIP2	0.0489	-1.6842	471	LYNX1	0.0456	-1.9519
392	ITGA11	0.0015	-1.5387	432	MYOM3	0.0489	-1.6842	472	SPON2	0.0024	-1.9814
393	PTGIS	0.0177	-1.5413	433	PRAC2	0.0489	-1.6842	473	DPP6	0.0185	-1.9919
394	SLC7A7	0.0005	-1.5457	434	SULT4A1	0.0489	-1.6842	474	LINC01144	0.0114	-1.9922
395	TMEM37	0.0080	-1.5509	435	UGT3A1	0.0489	-1.6842	475	C7orf65	0.0162	-1.9935
396	FOLR1	0.0032	-1.5597	436	ZNF608	0.0025	-1.7021	476	HSPB9	0.0403	-2.0022
397	RAET1G	0.0056	-1.5606	437	GAS1RR	0.0183	-1.7054	477	RPL35AP26	0.0394	-2.0022
398	DOCK8	0.0030	-1.5608	438	FLJ31356	0.0200	-1.7056	478	RPL35AP9	0.0403	-2.0022
399	MAFTRR	0.0421	-1.5627	439	LY6D	0.0092	-1.7084	479	SNORD124	0.0403	-2.0022
400	DLX5	0.0033	-1.5697	440	PDE3A	0.0217	-1.7108	480	METTL7A	0.0002	-2.0058

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (5/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
481	VWF	0.0158	-2.0072	521	MIR4505	< 0.0001	-2.2339	561	NLGN3	0.0452	-2.5835
482	LINC01695	0.0018	-2.0077	522	MIR548N	< 0.0001	-2.2339	562	ALPG	0.0007	-2.5868
483	ACE	0.0387	-2.0085	523	SLC14A2	< 0.0001	-2.2339	563	USH1G	0.0002	-2.5980
484	HK3	0.0376	-2.0085	524	TTBK1	< 0.0001	-2.2339	564	SULT1E1	0.0080	-2.6010
485	MIR4432HG	0.0387	-2.0085	525	ZFP28	< 0.0001	-2.2339	565	ATP6V1B1	0.0226	-2.6031
486	SINHCAFP1	0.0376	-2.0085	526	LINC01873	0.0248	-2.2420	566	ALDH1A1	0.0018	-2.6165
487	VIL1	0.0378	-2.0085	527	MMP13	< 0.0001	-2.2743	567	MST1L	0.0431	-2.6201
488	C8orf74	0.0366	-2.0170	528	TMPRSS11E	0.0008	-2.2788	568	CYP4F2	0.0030	-2.6246
489	INHCAP	0.0355	-2.0170	529	EPX	0.0131	-2.2860	569	LINC02747	0.0139	-2.6338
490	5S_rRNA	0.0356	-2.0176	530	UPP2	0.0327	-2.3051	570	ATP5MGP1	0.0229	-2.6689
491	MIR4666A	0.0364	-2.0176	531	LINC02021	0.0322	-2.3051	571	LINC00964	0.0214	-2.6837
492	NFATC4	0.0356	-2.0176	532	MIR6512	0.0323	-2.3051	572	PPIAP51	0.0092	-2.6837
493	RPL10AP1	0.0364	-2.0176	533	TRPC4	0.0322	-2.3051	573	UBXN10	0.0394	-2.7061
494	RSF1-IT2	0.0364	-2.0176	534	LGALS4	0.0361	-2.3105	574	IL21R	0.0263	-2.7104
495	POU2F3	0.0015	-2.0311	535	CLIC3	0.0010	-2.3151	575	IVL	0.0001	-2.7344
496	LINC01058	0.0152	-2.0334	536	PSG5	0.0019	-2.3338	576	WFDC10B	0.0171	-2.7403
497	SEMA6D	0.0001	-2.0384	537	CCDC180	0.0237	-2.3356	577	ACTN2	0.0017	-2.7622
498	DSG4	0.0042	-2.0407	538	LINC00637	0.0235	-2.3356	578	LINC01395	0.0017	-2.7622
499	LNC-LBCS	0.0187	-2.0461	539	INSL6	0.0219	-2.3418	579	SLC2A10	0.0015	-2.7622
500	CYP4B1	0.0179	-2.0661	540	PKHD1	0.0400	-2.3503	580	SAMD11	0.0036	-2.7663
501	LINC02593	0.0014	-2.0679	541	CYP2C18	0.0205	-2.3509	581	GRK7	0.0240	-2.7762
502	DACH1	0.0030	-2.0768	542	HRCT1	0.0213	-2.3509	582	MIR646HG	0.0434	-2.8269
503	CADM2	0.0081	-2.0812	543	KLHL33	0.0205	-2.3509	583	EFHB	0.0149	-2.8335
504	HS3ST6	0.0152	-2.0938	544	KRT3	0.0146	-2.3514	584	PRR29	0.0345	-2.8382
505	FOXN1	0.0119	-2.0980	545	ATOX1	0.0202	-2.3720	585	PSORS1C2	0.0202	-2.8488
506	MIR3124	0.0295	-2.1037	546	IGHE	0.0056	-2.4288	586	LINC00639	0.0194	-2.8639
507	SLC27A6	0.0298	-2.1037	547	MIR4795	0.0292	-2.4520	587	LINC01889	0.0186	-2.8639
508	CRB2	0.0378	-2.1250	548	LINC02672	0.0012	-2.4562	588	NAT16	0.0088	-2.8639
509	ZNF665	0.0472	-2.1778	549	CGB8	0.0282	-2.4588	589	CA9	0.0001	-2.8692
510	FDPSP5	0.0297	-2.1962	550	PALM	0.0022	-2.4892	590	FILIP1	0.0116	-2.8776
511	MAFA	0.0020	-2.2077	551	MMP10	0.0123	-2.4972	591	CCDC187	0.0001	-2.9005
512	KRTAP29-1	0.0383	-2.2126	552	EIF4EP1	0.0217	-2.5368	592	CD38	0.0001	-2.9005
513	CALML5	0.0026	-2.2139	553	EVPLL	0.0212	-2.5368	593	CD5	0.0001	-2.9005
514	PSAPL1	0.0006	-2.2184	554	CNR1	0.0117	-2.5605	594	CEACAMP10	0.0001	-2.9005
515	CRTAC1	< 0.0001	-2.2339	555	SSC5D	0.0002	-2.5672	595	KIF25	0.0001	-2.9005
516	F2	< 0.0001	-2.2339	556	SYNPO2L	0.0002	-2.5672	596	LINC00316	0.0002	-2.9005
517	IL9RP1	< 0.0001	-2.2339	557	LINC02889	0.0003	-2.5672	597	RNASEK-C17orf49	0.0001	-2.9005
518	LINC02284	< 0.0001	-2.2339	558	RNU4-1	0.0002	-2.5672	598	SEMA5B	0.0002	-2.9005
519	LINC02577	< 0.0001	-2.2339	559	RNVU1-4	0.0003	-2.5672	599	WEE2	0.0033	-2.9005
520	M1AP	< 0.0001	-2.2339	560	RPL23AP95	0.0003	-2.5672	600	LINC01639	0.0162	-2.9462

APÊNDICE C - 641 DEGs em queratinócitos após tratamento com sEV-LCCT por 24 h (6/6)

Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange	Nº	Gene	Valor de p	Foldchange
601	KRT4	0.0004	-2.9469	615	OLFM4	0.0298	-3.1368	629	MMP12	0.0024	-3.4249
602	C10orf82	0.0297	-2.9512	616	MPIG6B	0.0400	-3.1729	630	POU2AF1	0.0010	-3.4288
603	UPB1	0.0306	-2.9534	617	CPAMD8	0.0008	-3.1770	631	KRT77	0.0075	-3.4726
604	COL3A1	0.0193	-2.9712	618	KIT	0.0263	-3.1859	632	LCE1E	0.0041	-3.4995
605	KCNH4	0.0113	-2.9872	619	LINC01132	0.0101	-3.1907	633	RNF225	0.0271	-3.5000
606	RNF157	0.0092	-3.0022	620	LINC00113	0.0221	-3.2120	634	CLEC3A	0.0090	-3.5486
607	MIR4783	0.0186	-3.0022	621	CFAP206	0.0465	-3.2693	635	GLULP4	0.0033	-3.6378
608	MIR454	0.0060	-3.0078	622	CLCA4	0.0196	-3.2805	636	ADAMTS18	< 0.0001	-3.7622
609	DYNLRB2	0.0269	-3.0551	623	TRAV38-1	0.0065	-3.3045	637	C1QTNF8	< 0.0001	-3.7622
610	CASP14	0.0010	-3.0620	624	LINC02560	0.0210	-3.3574	638	LINC01239	< 0.0001	-3.8188
611	BCAS1	0.0265	-3.0918	625	LUM	0.0041	-3.3922	639	CCN5	0.0180	-3.9447
612	LDLRAD1	0.0403	-3.0933	626	SLC12A3	0.0070	-3.3922	640	KRT1	0.0012	-4.1542
613	MOV10L1	0.0006	-3.0955	627	ISLR	0.0182	-3.4038	641	ADAMTS5	0.0054	-4.6942
614	RAD21L1	0.0006	-3.0955	628	ADAD2	0.0349	-3.4201				