

BÁRBARA DOS SANTOS DIAS

Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de pesquisas Tecnológicas obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2022

BÁRBARA DOS SANTOS DIAS

Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de pesquisas Tecnológicas obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Patricia Severino

Versão original.

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

dos Santos Dias, Bárbara
Quantificação de vesículas extracelulares em
plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil
de miRNAs como potenciais biomarcadores para a
biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe
/ Bárbara dos Santos Dias; orientadora Dra.
Patricia Severino. -- São Paulo, 2022.
114 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biópsia líquida. 2. Carcinoma epidermoide de
cabeça e pescoço. 3. MicroRNAs. 4. Oncologia. I.
Severino, Dra. Patricia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Bárbara dos Santos Dias

Titulo da Tese: Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe.

Orientador: Dra. Patricia Severino

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 25 de julho de 2018.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan

Atesto, para fins de inscrição no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, que o projeto intitulado "Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe" que será desenvolvido pela aluna Bárbara dos Santos Dias constitui subprojeto de "Banco Integrado de Tumores - Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida" submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein.

Documentos comprobatórios estão anexados a esta declaração.

Atenciosamente,

Dra. Patricia Severino
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa
Hospital Israelita Albert Einstein

São Paulo, 20 de julho de 2022.

À Comissão de Pós-Graduação Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo,

Enviamos este documento para comprovação de que o Projeto de Mestrado, da aluna Bárbara dos Santos Dias (código USP 10972400), intitulado **Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe**, faz parte do projeto principal **Banco Integrado de Tumores – Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida** (Anexo A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, estando a aluna sob orientação da Dra. Patricia Severino, pesquisadora participante do estudo e responsável pelo desenvolvimento da parte experimental do estudo.

Objetivos do projeto de pós-graduação:

Objetivo geral

- Avaliar a quantidade relativa e o tamanho de VEs, incluindo exossomos, e o perfil de miRNAs circulantes como biomarcadores para a biópsia líquida no câncer de laringe e de orofaringe.

Objetivos específicos

- Quantificar as VEs em plasma de pacientes e comparar com o perfil observado em controles livres de tumor;
- Caracterizar as VEs presentes em plasma de pacientes quanto ao tamanho e comparar este perfil com VEs obtidas a partir de indivíduos controle livres de câncer.
- Comparar o perfil de miRNAs circulantes em plasma de indivíduos com tumor e sem tumor;
- Comparar o perfil de miRNAs circulantes em plasma com o perfil de miRNAs em amostras de biópsia tecidual conservada em parafina de forma a identificar miRNAs associados com o tecido tumoral;

Objetivos do projeto principal e aqueles que incluem aos objetivos deste projeto (sublinhados):

Titulo do estudo já aprovado: Banco Integrado de Tumores – Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida

Pesquisador responsável: Nelson Hamerschlak

CAAE: 94534318.3.0000.0071

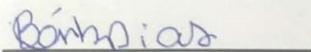
Objetivo Geral:

Desenvolvimento da tecnologia de Biópsia Líquida em nosso meio a fim de permitir o diagnóstico diferencial, com baixo custo e de forma confiável, de neoplasias de orofaringe & laringe, pulmão, cérebro e do tecido linfomatoipoético através da estruturação do Banco Integrado de Tumores no complexo hospitalar Albert Einstein (HIAE e instituições públicas conveniadas).

Objetivos Específicos:

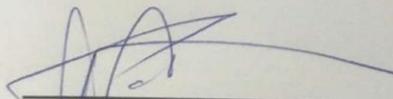
1. Estruturação do Banco de Tumores da Sociedade Beneficente Israelita Albert Einstein (SBI/BAE) com vistas a coleta, processamento, transporte, armazenamento de amostras sangue [plasma e elementos figurados (plaquetas)] de pacientes com câncer primário de Cabeça e Pescoço (carcinoma espinocelular de faringe e laringe); Pulmão (carcinoma não-pequena células); Sistema Nervoso Central (gliomas) e tecido linfomatoipoético (linfomas).
2. Obter os perfis de expressão gênica (transcriptoma) e de microRNAs do material biológico presente no interior das vesículas extracelulares (VEs, exossomos), presentes tanto no plasma, como nas plaquetas do sangue periférico dos pacientes portadores das neoplasias de interesse.
3. Compilar e obter os perfis de expressão genica (transcriptoma) e de microRNAs que estejam mais relacionados a cada tipo de neoplasia.
4. Realizar a análise comparativa dos perfis de expressão gênica e de microRNAs nos diferentes grupos diagnósticos.
5. Validar os perfis de expressão dos RNAs (RNAm e microRNAs) obtidos pela BxLiq com os dos respectivos tecidos tumorais FFEP, nos casos de carcinoma não pequenas células do pulmão e de CEC de orofaringe & laringe.

Segue anexo texto do projeto principal e parecer do CEP.



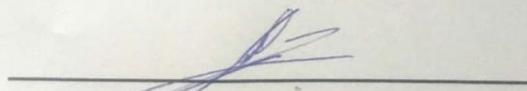
Assinatura da aluna

Bárbara Dias



Assinatura da orientadora

Dra. Patricia Severino



Assinatura Responsável pelo projeto principal

Dr. Nelson Hamerschlak

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Banco Integrado de Tumores - Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida

Pesquisador: Nelson Hamerschlak

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 94534318.3.0000.0071

Instituição Proponente: SOCIEDADE BENEF ISRAELITABRAS HOSPITAL ALBERT EINSTEIN

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.780.449

Apresentação do Projeto:

Emenda ao estudo: "Banco Integrado de Tumores - Base para a Pesquisa de Tradução em Oncologia por Biópsia Líquida", já anteriormente aprovado por este Comitê.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolvimento da tecnologia de Biopsia Líquida em nosso meio a fim de permitir o diagnóstico diferencial, com baixo custo e de forma confiável, de neoplasias de orofaringe & laringe, pulmão, cérebro e do tecido linfomatoipoiético através da estruturação do Banco Integrado de Tumores no complexo hospitalar Albert Einstein (HIAE e instituições públicas conveniadas).

Objetivos Secundário:

1. Estruturação do Banco de Tumores da Sociedade Beneficente Israelita Albert Einstein (SBIBAE) com vistas à coleta, processamento, transporte, armazenamento de amostras sangue [plasma e elementos figurados (plaquetas)] e/ou tecido de pacientes com câncer primário de Cabeça e Pescoço (carcinoma espinocelular de faringe e laringe); Pulmão (carcinoma não-pequena células); Sistema Nervoso Central (gliomas) e tecido linfematoipoiético (linfomas).
2. Obter os perfis de expressão gênica (transcriptoma) e de microRNAs do material biológico presente no interior das vesículas extracelulares (VEs, exossomos), presentes tanto no plasma

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

Continuação do Parecer: 3.780.449

como nas plaquetas do sangue periférico dos pacientes portadores das neoplasias de interesse.

3. Compilar e obter os perfis de expressão gênica (transcriptoma) e de microRNAs que estejam mais relacionados a cada tipo de neoplasia.

4. Realizar a análise comparativa dos perfis de expressão gênica e de microRNAs nos diferentes grupos diagnósticos.

5. Validar os perfis de expressão dos RNAs (RNAm e microRNAs) obtidos pela BxLiq com os dos respectivos tecidos tumorais FFEP, nos casos de carcinoma não pequenas células do pulmão e de CEC de orofaringe & laringe.

6. Obter DNA tumoral livre e circulante em sangue periférico ("DNAct") dos pacientes com câncer e avaliar a presença das principais mutações nas vias canônicas de sinalização celular (EGFR, RAS, BRAF), nos casos de CNPC do pulmão e de CEC de orofaringe & laringe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Haverá riscos relacionados à coleta de sangue e perda de confidencialidade dos dados.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos para os participantes da pesquisa, mas o resultado deste estudo poderá contribuir com novos métodos de diagnóstico e monitoramento do câncer, e assim beneficiar pacientes no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisador envia Emenda para solicitar a inclusão de dois pesquisadores participantes e de suas respectivas instituições: Dr. João Norberto Stavale, da Escola Paulista de Medicina -UNIFESP e Dr. Rafael De Cicco, do Instituto de Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho.

Os objetivos do projeto permanecem os mesmos e foi incluído o documento projeto-pronon-cep-versao-3 para mencionar estes novos membros e suas instituições.

Após análise, não foram encontrados impedimentos éticos e a Emenda foi aprovada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os termos pertinentes à Emenda. Os termos de apresentação obrigatória encontram-se em acordo com as Resoluções vigentes.

Recomendações:

É atribuição do CEP "acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa". Por isso o/a pesquisador/a responsável deverá encaminhar para o CEP

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

Continuação do Parecer: 3.780.449

Einstein os Relatórios Parciais a cada seis meses e o Relatório Final de seu projeto, até 30 dias após o seu término.

Relatório Parcial, Final ou de Suspensão de Estudo:

<https://www.einstein.br/pesquisa/servicos/comite-etica-em-pesquisa/relatorio-pesquisas-aprovadas>

Segundo a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros.

Por favor, se ocorrerem eventos adversos graves, considerar as orientações presentes no link: <http://apps.einstein.br/forms/pesquisa/form-adve.html>

Se ocorrer um evento relacionado ao procedimento do estudo ou medicação em uso, por favor, preencher o Formulário de Evento Adverso Sério Próprio do CONEP: http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/FORMULARIO_EAS_CONEP_2011.doc

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, a Emenda submetida em 06 de Dezembro de 2019 foi aprovada, assim como o Projeto de pesquisa em sua versão 3, datada de Dezembro de 2019.

Considerações Finais a critério do CEP:

EMENDA APROVADA PELO CEP DO HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN EM REUNIÃO REALIZADA EM 17/12/2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_148503_2_É2.pdf	06/12/2019 13:08:14		Aceito
Outros	Carta_Emenda_2_CEP_InclusaoMembros.pdf	06/12/2019 13:02:49	denise pasqualin	Aceito

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

Continuação do Parecer: 3.780.449

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pronon_CEP_versao_3.pdf	04/12/2019 16:20:13	denise pasqualin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pronon_CEP_versao_3_marcad a.pdf	04/12/2019 16:19:55	denise pasqualin	Aceito
Outros	Emenda_1.pdf	27/09/2019 14:16:51	denise pasqualin	Aceito
Outros	ProjetoDoutorado_Larissa_Final.pdf	27/09/2019 14:11:29	denise pasqualin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pronon_Controlos_v3.pdf	27/09/2018 08:28:14	denise pasqualin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pronon_Casos_v3.pdf	27/09/2018 08:28:00	denise pasqualin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pronon_CEP_versao_2.pdf	27/09/2018 08:22:14	denise pasqualin	Aceito
Outros	CEP_esclarecimentos_PRONON.pdf	27/09/2018 08:21:52	denise pasqualin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biobanco_Versao_5.pdf	25/07/2018 15:44:03	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_RESP_SERES_HUMANOS .pdf	25/07/2018 10:00:19	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Gestor_HMVSC.pdf	25/06/2018 19:14:01	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_DGP.pdf	25/06/2018 19:13:37	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_compr_pesquisador.pdf	25/06/2018 19:09:50	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração do Patrocinador	portaria_edital_PRONON.pdf	25/06/2018 19:05:02	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Anuencia_participantes.pdf	25/06/2018 19:00:30	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Declaracao_biobanco.pdf	25/06/2018 18:57:02	Nelson Hamerschlak	Aceito

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 3.780.449

Biorepositório / Biobanco	Declaracao_biobanco.pdf	25/06/2018 18:57:02	Nelson Hamerschlak	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_gestores.pdf	25/06/2018 15:31:08	Nelson Hamerschlak	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_Pronon.pdf	25/06/2018 15:30:45	Nelson Hamerschlak	Aceito
Orçamento	Planilha_orcamento.pdf	19/06/2018 06:04:44	Nelson Hamerschlak	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste estudo e concretização desta fase de evolução tanto profissional quanto pessoal.

À minha orientadora Dra. Patricia Severino, que sempre me impulsionou na busca de conhecimento e dedicou seu tempo a desenvolver meu pensamento crítico assim como me deu oportunidade de fazer parte da sua equipe no desenvolvimento deste projeto. Agradeço ainda a atenção, dedicação, paciência e incentivo, que foram com certeza, fundamentais para o meu crescimento profissional.

A toda equipe do Instituto do Câncer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, se esforçaram ao máximo para realização das coletas utilizadas neste projeto. Gostaria de agradecer especialmente ao coordenador de pesquisa clínica Rafael Souza e ao Dr. Rafael De Cicco.

A todos que fizeram e fazem parte do grupo de pesquisa da Dra. Severino, que estavam sempre dispostos a me auxiliar e incentivar durante o curso deste projeto.

À Dra. Denise Pasqualin por ter disponibilizado seu tempo e conhecimento em patologia histológica.

A equipe de auxílio a pesquisa do laboratório de Biologia Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, especialmente ao Dr. Thiago Aloia e Dr. Alessandro Marins.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, agradeço pela disponibilidade da estrutura física para a realização deste trabalho.

À toda minha família, que sempre me incentivou e apoiou a ir em busca de conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

À Agências de Fomento, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

DOS SANTOS DIAS, B. **Quantificação de vesículas extracelulares em plasma e avaliação do seu conteúdo quanto ao perfil de microRNAs como potenciais biomarcadores para a biópsia líquida de neoplasias de orofaringe e laringe.** 2022. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2022.

A biópsia tecidual é a técnica mais utilizada para o diagnóstico e caracterização molecular do câncer. Entretanto, além de ser um procedimento invasivo, a biópsia tecidual é limitada à região do tecido selecionada, pouco representando a heterogeneidade do tumor. A necessidade de abordagens mais precisas e o avanço de tecnologias, impulsionam estudos que avaliam componentes circulando em biofluidos, a chamada “biópsia líquida”. Neste estudo foram avaliadas duas técnicas para detecção da presença tumoral a partir do plasma: a concentração e a variação no tamanho de vesículas extracelulares circulantes e o perfil de microRNAs circulantes. MicroRNAs são bons candidatos devido à sua estabilidade em plasma, em associação com proteínas específicas ou no interior de vesículas extracelulares. O câncer de cabeça e pescoço é o sétimo tipo de câncer mais comum no mundo. Foram selecionados portadores de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço nos subsítios laringe e orofaringe. A técnica pulso resistivo ajustável (TRPS) e citometria de fluxo foram utilizadas para a caracterização das vesículas extracelulares e microRNAs circulantes foram detectados utilizando a tecnologia nCounter, plataforma Nanostring. Adicionalmente, microRNAs e mRNAs presentes em tecido tumoral foram analisados para inferir a origem dos microRNAs circulantes e sua relação com a progressão tumoral. Observamos alterações na concentração de vesículas celulares na presença do tumor. A TRPS constitui uma técnica com bom potencial para aplicação em laboratórios clínicos por não necessitar de processamento complexo de amostras, entretanto os resultados demonstram que ajustes finos, dificilmente padronizáveis com o atual estado de desenvolvimento da tecnologia, são necessários para esta aplicação no futuro. O perfil de microRNAs no plasma mostrou diferenças significativas entre as amostras coletadas antes e após tratamento. A análise de expressão diferencial indicou 10 microRNAs diferencialmente expressos, sete já descritos em plasma ou soro de pacientes de CEPC e diferencialmente expressos quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis. Em tecido, 79 microRNAs estavam diferencialmente expressos, sendo 48 com maior expressão e 31 com menor expressão em tecido tumoral. MicroRNAs com expressão elevada em tecido tumoral não refletiram nas moléculas mais expressão em plasma, assim como também encontramos microRNAs com menor expressão em tumor e maior expressão em plasma de

paciente antes do tratamento. Como exemplo, o miR-150-5p visto mais expresso em plasma de pacientes antes do tratamento enquanto teve menor expressão no tecido tumoral. Ao analisar os dados de mRNA do tecido, genes preditos como alvos deste microRNA estavam mais expressos. Na literatura, o miR-150-5p já foi descrito como um supressor tumoral em CECP, porém encontrado em vesículas extracelulares derivadas de linhagens celulares, sugerindo um possível mecanismo de encapsulamento seletivo deste miRNA que explicaria a detecção elevada em plasma e não em tecido. A complexidade das interações que envolvem microRNAs e processos de liberação destas moléculas no plasma sugerem que a utilização de um perfil de expressão validado em diferentes coortes e não o uso de moléculas únicas é mais promissor para uma futura utilização como biomarcador para o diagnóstico e acompanhamento de resposta terapêutica em câncer.

Palavras-chave: miRNA; CECP; biópsia líquida; câncer; plasma.

ABSTRACT

DOS SANTOS DIAS, B. **Extracellular vesicles quantification in plasma and its microRNAs content as possible biomarkers in liquid biopsy for oropharyngeal and laryngeal cancer.** 2022. 114f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2022.

Currently, tissue biopsy is still the most used technique for diagnostic confirmation and tumor characterization. However, it is an invasive procedure, and due to tumor heterogeneity, it may represent only a limited part of the tumor, missing out important molecular characteristics. For this reason, liquid biopsy is a promising alternative for diagnostic and early detection of tumors. In this study we evaluated two techniques for the detection of tumor using plasma: the concentration and sizes of extracellular vesicles and circulating microRNAs. MicroRNAs are good candidates for molecular markers due to their stability in plasma in association with proteins or encapsulated in extracellular vesicles. Head and neck squamous cell carcinoma is the seventh most common cancer type worldwide. Patients harboring cancer at the larynx and oropharynx subsites were selected for this study. The tunable resistive pulse sensing technique was used for the characterization of extracellular vesicles and circulating microRNAs were detected using the nCounter technology (NanoString). This technology, based on the digital counting of molecules, detects molecules even in low concentrations using specific probes. Additional analysis included the characterization of extracellular vesicles using flow cytometry, and the evaluation of microRNAs and mRNAs in tumor tissue in order to infer the origin of circulating miRNAs and their association with tumor progression in the tissue. Alterations in the concentration of extracellular vesicles were detected in the presence of tumors. The TRPS technology is an interesting solution for clinical laboratories since there is no need for complicated sample processing but results depend on fine settings hard to implement with the current state of development. Circulating miRNA profiles showed marked differences between plasma samples from HNSCC patients and those obtained when patients were tumor-free. Differential expression analysis indicated 10 miRNA differentially expressed. Seven of these have been previously detected in plasma or serum of HNSCC patients and differently expressed between HNSCC patients and healthy individuals. In tissue, 79 miRNAs were differentially expressed, with 48 upregulated in tumor tissue and 31 downregulated. miRNAs detected in high levels in tissue did not reflect molecules most detected in plasma, as well, miRNAs with lower expression in tumor tissue were found upregulated in plasma from patients with tumor. MiR-

150-5p was downregulated in tumor tissue but upregulated in plasma from patients with tumor. When analyzing tissue data, mRNA from predicted miR-150-5p gene targets were upregulated. In the literature, miR-150-5p has been described as an anti-tumor miRNA in HNSCC, but enriched in extracellular vesicles from HNSCC-derived cell lines, suggesting a selective sorting mechanism of miRNAs into vesicles that could explain its difference in expression pattern in plasma from HNSCC patients and tumor tissue. Circulating miRNA profiling may be a powerful tool to monitor tumor presence, although individual molecules or a small set of miRNAs are unlikely to be directly used as biomarkers due to the variety of processes modulated during tumor progression and that are readily reflected in plasma.

Keywords: miRNA; HNSCC; liquid biopsy; cancer; plasma.