

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Júlia Abbade Tronco**

**Avaliação da expressão proteica em exossomos de  
sangue periférico de gestantes em Trabalho de Parto Pré-  
Termo e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Mestre em ciências- área  
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Dra. Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Botucatu  
2020**

Júlia Abbade Tronco

**Avaliação da expressão proteica em exossomos de sangue periférico de gestantes em Trabalho de Parto Pré-Termo e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em ciências- área Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Márcia Guimarães da Silva  
Coorientadora: Dra. Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Botucatu  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tronco, Júlia Abbade.

Avaliação da expressão proteica em exossomos de sangue periférico de gestantes em trabalho de parto pré-termo e rotura prematura de membranas pré-termo / Júlia Abbade Tronco. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Márcia Guimarães da Silva  
Coorientador: Bruna Ribeiro de Andrade Ramos  
Capes: 40103005

1. Prematuros. 2. Exossomos. 3. Trabalho de parto prematuro. 4. Membranas fetais, Ruptura prematura.

Palavras-chave: Exossomos; Parto pré-termo; Prematuridade; Rotura prematura de membranas pré-termo; Trabalho de parto pré-termo.

Dedico essa dissertação de mestrado aos meus pais, Dorival e Ana Clélia, a quem devo tudo que sou. Se hoje escrevo aqui é por eles e para eles. Eu amo vocês.

Agradeço à Deus e aos meus anjos que me guiam sempre nos meus caminhos, nem sempre fáceis, mas sempre certos e tornando todas as tempestades passageiras e repletas de aprendizados.

Aos meus pais, Dorival e Ana Clélia, por todo amor, suporte e carinho de sempre, mas também ao longo desses seis anos longe de casa e, principalmente, durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por sempre acreditarem no meu potencial e por sempre me ajudarem de todas as formas possíveis e imagináveis em todas as situações. Não existiriam páginas suficientes para agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim. Espero um dia poder retribuir pelo menos um pouco de tudo isso. Vocês são mais que meus pais, são meus anjos na terra, minha base, meu porto seguro e minha inspiração. Te amo, papis. Te amo, mamis.

Ao meu irmão, Arthur, por ser o melhor irmão que eu poderia pedir. Atencioso, amoroso e amigo. Sempre orgulhoso e vibrando por mim. Meu irmão, minha admiração e minha inspiração desde pequena. Te amo demais.

A minha família: meu avô Dorival, meu avô Dyrson (*in memoriam*) que sei que está sempre olhando por mim, minha avó Maria Elena, minha avó Nydia, aos meus tios e tias, aos meus primos e primas e à minha amada afilhada, Alice. Obrigada por fazerem parte de quem eu sou hoje. Amo vocês.

Ao meu namorado, Jorge, por todo amor, carinho, apoio e companheirismo ao longo desses três anos de namoro. Obrigada por lidar da forma mais pacífica e amorosa possível com todas as minhas crises de estresse ao longo desses anos de mestrado e obrigada por me ajudar em tudo que estava ao seu alcance. Sem você no meu dia-a-dia para me confortar, me distrair e me divertir tudo teria sido bem mais difícil e menos colorido. Obrigada por ser esse namorado e ser humano incrível que você é, não podia pedir presente maior na minha vida. Te amo, te amo e te amo, meu amor.

As minhas amigas, Alessandra (Piga), Bárbara (Mafa) e Tamara (Bat), e ao meu amigo Rafael (Pakas) que durante esses anos foram o meu lar em Botucatu. Obrigada por dividirem comigo tantas alegrias na nossa casinha. Meus melhores anos de Botucatu com certeza foram com vocês. Amo vocês.

As minhas amigas de graduação que se tornaram minhas amigas da vida, Alessandra (Piga), Aline (Crau), Ana Carolina (Joinha), Carolina (Gudão), Isabela (Pole), Juliana (Ellen), Natália (Saibro) e Virgínia (Bolas). Obrigada pelos tantos momentos divertidos que vou levar pra sempre comigo, pela amizade durante nossos quatro anos juntas e que permanece até hoje.

As minhas amigas de São Paulo, Júlia Dias e Maria Carol, pela amizade mais linda ao longo desses 14 anos. Obrigada pelo apoio ao longo desses anos, mesmo vivendo cada uma em uma cidade a nossa amizade sempre se mostrou mais forte que qualquer distância. Amo vocês.

Aos meus amigos, Giovana (Tucu), Jeniffer (Guenta), Júlia Morales (Xorona), Mariana (Murta) e Rafael (Pakas). Obrigada por todo apoio e ajuda, por todos as nossas festinhas, por todos os “Will” pós lab, por todas as sessões de Vikings e, principalmente, pela amizade. Cresci muito graças ao apoio e conselhos de vocês ao longo desses dois anos. Sentirei saudades da nossa rotina juntos.

A minha psicóloga, Amanda, que me acalmou em todos os momentos no último ano e facilitou meu crescimento, me ensinando a lidar da melhor forma com todos os contratempos da vida.

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal e que, de alguma forma, acrescentaram à minha jornada.

A minha orientadora, professora Márcia e minha coorientadora, Bruna. Agradeço imensamente a oportunidade de ter realizado meu mestrado sob orientação e coorientação de pessoas que admiro muito profissionalmente. Obrigada por todos os ensinamentos, por terem contribuído de forma significativa para o meu crescimento e por terem permitido que eu chegasse até aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pela bolsa concedida a mim para que eu desenvolvesse essa dissertação de mestrado.

A UNIPEX e todos seus funcionários por sempre estarem à disposição para ajudar.

À Faculdade de Medicina de Botucatu pelo acolhimento nessa nova fase da minha vida após a graduação e ao Instituto de Biociências e a Unesp por toda minha formação.

Se desejo, o meu desejo faz subir marés de sal e  
sortilégio. Eu ando de cara pra o vento, na chuva e  
quero me molhar. O terço de Fátima e o cordão de  
Gandhi cruzam o meu peito.  
Sou como a haste fina que qualquer brisa verga  
Mas nenhuma espada corta.

-Maria Bethânia



## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>28</b>
<b>5. ANEXOS .....</b>	<b>46</b>

## 1. RESUMO

A gestação é um período caracterizado por diversas alterações fisiológicas, hormonais e imunológicas do organismo materno. Em condições fisiológicas, entre a 37<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana de gestação, a sequência de eventos que levam ao parto inclui o aumento da contratilidade uterina, dilatação cervical e ruptura das membranas corioamnióticas. O trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra (TPP) é definido pelo trabalho de parto que ocorre antes da 37<sup>a</sup> semana de gestação. O parto pré-termo é uma consequência desse desfecho e é a causa principal de morbidade e mortalidade neonatal. A Rotura Prematura de Membranas Pré-termo (RPM-PT) é outra complicação obstétrica, que ocorre em 3% de todas as gestações e pode ser identificada em 30-40% dos casos de TPP. Tanto o TPP quanto a RPM-PT possuem etiologia ainda pouco elucidada.

Apesar da compreensão de algumas vias moleculares ativadoras destes desfechos adversos e dos diversos estudos sobre este tema, não existem biomarcadores capazes de prever tais condições. Nesse contexto, os exossomos desempenham um papel como mediadores de comunicação intercelular e podem atuar na gestação e influenciar seu desfecho. Além disso, seu conteúdo, composto por proteínas, lipídios e RNAs tem sido bastante estudado como potenciais biomarcadores de diversas doenças. No campo da prematuridade, a relação entre os exossomos ou o conteúdo deles e o parto pré-termo ainda é pouco elucidada. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a expressão proteica de exossomos isolados de sangue periférico de gestantes em Trabalho de Parto Pré-termo (TPP) e Rotura de Membranas Pré-termo (RPM-PT).

Para tal, foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes no terceiro trimestre de gestação em TPP, RPM-PT, Termo em trabalho de parto (T+TP) e Termo fora de trabalho de parto (T). Os exossomos foram isolados a partir do plasma obtido, caracterizados por análise de partículas, quantificação proteica e Western Blot (WB) e, posteriormente, essas amostras foram submetidas à avaliação da expressão das proteínas de interesse (Hemopexina, Alfa-2-macroglobulina e C1INH) por WB. Por meio de análise semi-quantitativa foi possível observar um aumento da expressão da proteína Alfa-2-macroglobulina nos grupos Pré-termo (TPP + RPM-PT) em relação aos grupos Termo (T+TP e T) [ $1.07 \pm 0.30$  vs  $0.42 \pm 0.17$ ,  $p < 0.0001$ ]. A Alfa-2-macroglobulina é uma proteína envolvida em processos inflamatórios e no remodelamento de matriz extracelular. Considerando que o parto pré-termo é uma complicação

com base fisiopatológica em processos inflamatórios e de remodelação dos tecidos gestacionais, o achado obtido no estudo é de importante relevância e pode contribuir para a literatura no contexto dos exossomos e prematuridade.

**Palavras-chave:** Vesículas Extracelulares, Exossomos, Trabalho de Parto Pré-termo, Rotura Prematura de Membranas Pré-termo, Parto Pré-termo, Prematuridade, Gestação, Humano.

## 2. ABSTRACT

Pregnancy is a period characterized by many physiological, hormonal and immunological changes on maternal organism. On physiological conditions, between the 37<sup>th</sup> and 40<sup>th</sup> week of pregnancy, the sequence of events that lead to birth include the increase of uterine contractility, cervical dilatation and rupture of chorioamniotic membranes. Preterm labor (PTL) is defined by labor happening before the 37<sup>th</sup> week of pregnancy. Preterm birth is the consequence of this obstetrical complication and is the main cause of neonatal morbidity and mortality. Preterm premature rupture of membranes (PPROM) is another obstetrical complication, affects 3% of all pregnancies and can be identified in 30-40% of PTL cases. Both PTL and PPRM have multifactorial etiology and is still poorly elucidated.

Despite the comprehension of many molecular pathways that can activate those adverse pregnancy outcomes and the numerous studies about this subject, there are no biomarkers capable of predicting such complications. In this context, the exosomes present on maternal circulation have the potential of representing the utero-placental environment from samples obtained by non-invasively ways. They are secreted by almost any cell types and are present on body fluids.

Recent studies showed that this nanovesicles play an important role of intercellular communication mediators and can act on pregnancy and influence its outcome. Besides that, its content, composed by proteins, lipids and RNAs, have been studied as potential biomarkers of many diseases. On the prematurity context, the relation between exosomes, its content and preterm birth is still poorly understood. In this context, the aim of this study was to evaluate the exosome's protein expression isolated from peripheral blood of women with preterm labor (PTL) and preterm premature rupture of membranes (PPROM).

Therefore, samples of peripheral blood from patients with PTL, PPRM, term in labor (TL) and term out of labor (T) were collected. Exosomes were isolated from plasma and characterized by nanoparticle analysis, protein quantification and Western Blot (WB). Further, a WB was performed to identify the proteins of interest (hemopexin, alpha-2-macroglobulin and C1 inhibitor). By semi-quantitative analysis it was possible to observe a higher expression of alpha-2-macroglobulin on preterm groups (PTL + PPRM) when compared to term groups (TL + T) [ $1.07 \pm 0.30$  vs  $0.42 \pm 0.17$ ,  $p < 0.0001$ ]. Alpha-2-macroglobulin is a protein involved in inflammatory processes and on extracellular matrix remodeling.

Considering that preterm birth is a complication with a pathophysiological basis on inflammatory processes and gestational tissues remodeling, the obtained data of this study is relevant and can contribute to the knowledge on the context of exosomes and prematurity.

**Key words:** Extracellular vesicles, Exosomes, Preterm Labor, Preterm Premature Rupture of Membranes, Preterm Birth, PrematuritY.

---

# Revisão de Literatura

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A gestação é definida por um período em que ocorrem significativas mudanças anatômicas, hormonais, fisiológicas e imunológicas no organismo materno. O feto representa uma entidade estranha ao sistema imune materno devido a presença dos antígenos paternos e, portanto, é fundamental que o organismo materno crie um balanço dinâmico entre mediadores da resposta imune para que a gestação progrida de forma saudável.

Durante a gestação a progesterona é responsável por manter a quiescência uterina inibindo vias ativadoras das proteínas contráteis, além de reduzir a produção de prostaglandinas e inibir a liberação de ocitocina<sup>(1)</sup>. Próximo ao término gestacional, entre a 37<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana, o feto já se encontra fisiologicamente pronto para o nascimento e a supressão imunológica da gravidez é inibida. Concomitantemente, ocorre um aumento na habilidade de induzir sinais inflamatórios no endométrio/decídua<sup>(2)</sup>.

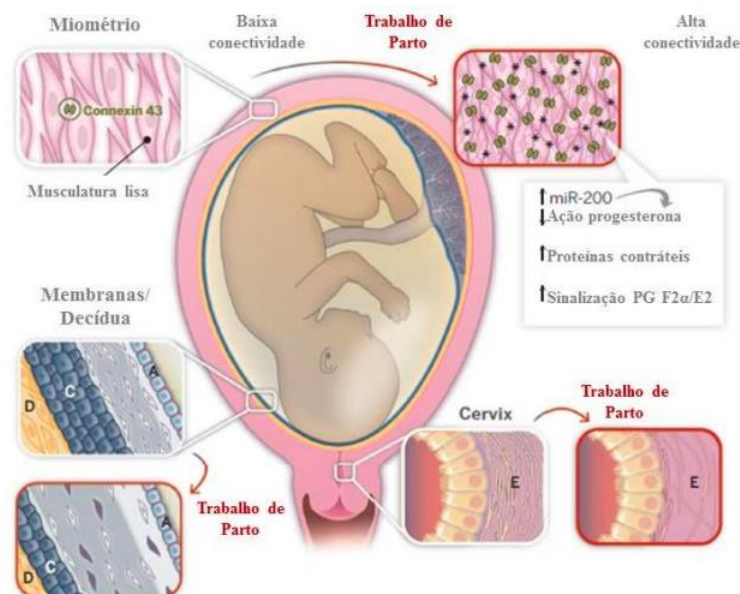
Nesse período, alterações morfológicas e moleculares nos tecidos gestacionais como a produção e liberação de uma grande variedade de mediadores inflamatórios (prostaglandinas [PGs], citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio) na interface materno-fetal<sup>(2)</sup> acarretam na sequência de eventos que caracterizam o parto, incluindo o aumento da contratilidade uterina, dilatação cervical e ruptura das membranas corioamnióticas [Figura 1]. As membranas fetais são compostas pela camada mais interna - âmnio- e a camada mais externa - cório – conferindo sustentação e uma barreira protetora ao feto em desenvolvimento. Idealmente, a ruptura dessas membranas ocorre durante o parto. Quando essas membranas se rompem antes do início do parto, mas após a 37<sup>a</sup> semana de gestação, denomina-se Ruptura Prematura de Membranas. A causa dessa ruptura muitas vezes é desconhecida, no entanto, a infecção intrauterina assintomática é um frequente precursor <sup>(3)</sup>.

Sabe-se que o início da sinalização do parto está primariamente ligado a mudanças endócrinas maternas e fetais incluindo produção de cortisol e queda da progesterona, além de

mudanças imunológicas como a infiltração leucocitária nos tecidos da interface materno-fetal. Além disso, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumentam ao final da gestação devido, principalmente, a elevada demanda metabólica do feto, depleção de antioxidantes e uma redução do aporte de substratos metabólicos materno, gerando estresse oxidativo. O aumento desse processo leva à ativação de moléculas inibidoras de autofagia - processo intracelular de catabolismo necessário à homeostasia celular - como o fator nuclear -kB e a proteína de choque térmico HSPA1A<sup>(4)</sup>. A redução da autofagia é uma característica de placentas avaliadas por microscopia eletrônica após partos vaginais<sup>(4)</sup>.

O desequilíbrio das funções endócrinas, imunológicas e a sobrecarga de estresse oxidativo levam a uma sobrecarga inflamatória que perturba a manutenção da gestação, resultando em mudanças que podem culminar no trabalho de parto<sup>(5)</sup>. A mudança do miométrio de seu estado quiescente para o contrátil é acompanhada por uma mudança na sinalização das vias anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas (Interleucina-8), citocinas (Interleucina-1) e proteínas associadas a contração como receptores de ocitocina e de prostaglandinas<sup>(6)</sup>. Essa via comum do parto é ativada fisiologicamente no caso do trabalho de parto a termo, enquanto diversos processos patológicos ativam um ou mais componentes dessa via na iminência de um parto pré-termo.





**Figura 1.** Eventos de contratilidade miométrial, apagamento cervical e enfraquecimento das membranas corioamnióticas que culminam no parto. Figura adaptada de Romero et al. (2013) e retirada de: de Andrade Ramos, BR. Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré termo. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. 2015.

O trabalho de parto pré-termo com bolsa íntegra (TPP) é uma intercorrência obstétrica definida pelo trabalho de parto que ocorre antes da 37<sup>a</sup> semana de gestação e que pode ser causado por múltiplos processos patológicos. O parto pré-termo é uma consequência dessa complicação e é a causa principal de morbidade e mortalidade neonatal. Mundialmente, a incidência de parto pré-termo é de aproximadamente 15 milhões por ano, com prevalência aproximada superior a 10% das gestações<sup>(7)</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil está entre os 10 países com maior número de partos pré-termo no mundo<sup>(8)</sup>. Um estudo de prevalência multicêntrico realizado em 2014 e que envolveu mais de 5 mil gestantes das 5 regiões geográficas brasileiras demonstrou que a taxa de prematuridade no país é de 12,3%, variando de 14,7% na região nordeste a 11,1% no Sudeste<sup>(9)</sup>.

A cada ano, aproximadamente 1 milhão de crianças morrem devido a complicações do parto pré-termo<sup>(10)</sup>. As complicações neonatais relacionadas ao parto pré-termo podem incluir síndrome do desconforto respiratório, sepse, hemorragia intraventricular, enterocolite

necrosante, hipotermia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia e dificuldades de amamentação<sup>(11, 12)</sup>. As consequências a longo-prazo podem afetar a qualidade de vida desses recém-nascidos e incluem retinopatia da prematuridade, comprometimento do desenvolvimento neuronal e paralisia cerebral<sup>(13)</sup>.

A Rotura Prematura de Membranas Pré-termo (RPM-PT) é outra complicação obstétrica e é definida pela ruptura das membranas corioamnióticas anterior à 37<sup>a</sup> semana de gestação. Ocorre em 3% de todas as gestações<sup>(14)</sup> e pode ser identificada em 30-40% dos casos de TPP<sup>(15)</sup>.

Tanto o Trabalho de Parto Pré-termo quanto a Rotura Prematura de Membranas Pré-termo possuem etiologias ainda não completamente elucidadas. Porém, dentre os fatores sabidamente associados ao TPP e à RPM-PT, podemos citar patologias gestacionais (e.g. múltiplas gestações, disfunções endócrinas, eclâmpsia, etc), distensão uterina (e.g. provocada por polidrâmnio ou gemelaridade), insuficiência istmo-cervical, estresse materno, vaginose bacteriana e infecção da cavidade amniótica<sup>(16-20)</sup>.

Outros fatores, como fatores comportamentais, ambientais, sociodemográficos, étnicos e predisposição genética também já foram associados a essas complicações<sup>(6)</sup>, com possibilidade de haver mais de um fator de risco presente em pacientes acometidas por esses resultados adversos da gestação. Visto que muitos desses fatores resultam num aumento da inflamação sistêmica, o estímulo das vias inflamatórias pode explicar o aumento de partos pré-termos associados a múltiplos fatores de risco<sup>(3)</sup>.

Sabe-se atualmente que alterações nos mecanismos de inflamação, estresse oxidativo e autofagia estão diretamente envolvidos na patogenia do TPP e da RPM-PT<sup>(4, 21)</sup>, mas não foram descritos, até o momento, biomarcadores capazes de prever tais condições. Essa dificuldade se deve a enorme complexidade que envolve a imunologia da relação materno-fetal e ao difícil acesso a amostras biológicas que representem o ambiente uterino de maneira fidedigna. Nesse contexto, as vesículas extracelulares presentes na circulação materna têm sido objeto de

diversos estudos devido ao seu potencial de representar o ambiente útero-placentário a partir de amostras obtidas de maneira não invasiva.

Essas vesículas extracelulares foram descritas pela primeira vez por Pan e Johnstone em 1983<sup>(22)</sup> como uma família heterogênea de vesículas delimitadas por membranas originadas do endossoma ou da membrana do plasma<sup>(23)</sup>. Elas são secretadas por quase todos os tipos celulares e são encontradas em fluidos corpóreos, incluindo sangue periférico, urina, saliva e leite materno. Podem ser classificadas quanto ao tamanho ou modo de liberação celular, dentre eles as microvesículas, corpos apoptóticos e os exossomos [Figura 2]. Nesta última classificação, os exossomos possuem formato arredondado e achatado e são compostos por uma bicamada lipídica<sup>(24)</sup> com um diâmetro que varia entre 30 e 150 nm<sup>(23)</sup>.

De forma geral, a origem dos exossomos consiste em três estágios: a formação de vesículas endocíticas da membrana do plasma, a invaginação da vesícula endossomal da membrana resultando no que é chamado de Corpúsculo de microvesículas (Microvesicle Bodies- MVB) que consiste em Vesículas intraluminais (ILVs) e, por fim, a fusão dessas MVBs com a membrana plasmática que, por sua vez, libera o conteúdo vesicular chamado de exossomos por meio de exocitose<sup>(25)</sup> [Figura 3].

Inicialmente, os exossomos foram descritos como um mecanismo de eliminação de excedentes celulares, no entanto, pesquisas mais recentes demonstraram que estas vesículas desempenham papel como importantes mediadores de comunicação intercelular, podendo agir sistemicamente e atuar de forma endócrina além de estarem envolvidas em processos fisiológicos, bem como na progressão de patologias<sup>(23)</sup>.

De fato, Valadi et al.<sup>(26)</sup> observaram que exossomos originados de células dendríticas são especificamente englobados pelo mesmo tipo celular, demonstrando que a ação dos exossomos pode ocorrer de maneira célula/tecido-específica. Além disso, uma característica

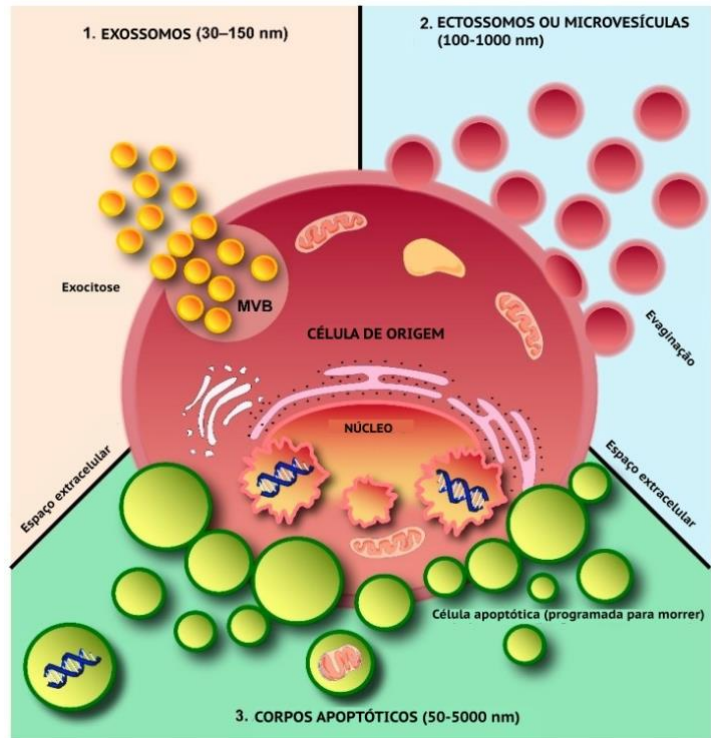
que também se destaca nessas vesículas é sua alta estabilidade pois, mesmo após descongelamento, os exossomos mantêm sua integridade<sup>(27)</sup>.

Estudos recentes apontam para o potencial papel destas vesículas na comunicação intercelular também durante o período gestacional e, de forma importante, no terceiro trimestre gestacional, atuando na sinalização que culmina no trabalho de parto<sup>(28)</sup>. As células trofoblásticas, placentárias e fetais secretam exossomos e já foi demonstrado que a concentração de vesículas derivadas de células placentárias aumenta significativamente ao longo dos trimestres gestacionais, além de ser significativamente maior em gestantes quando comparadas a não-gestantes<sup>(29)</sup>.

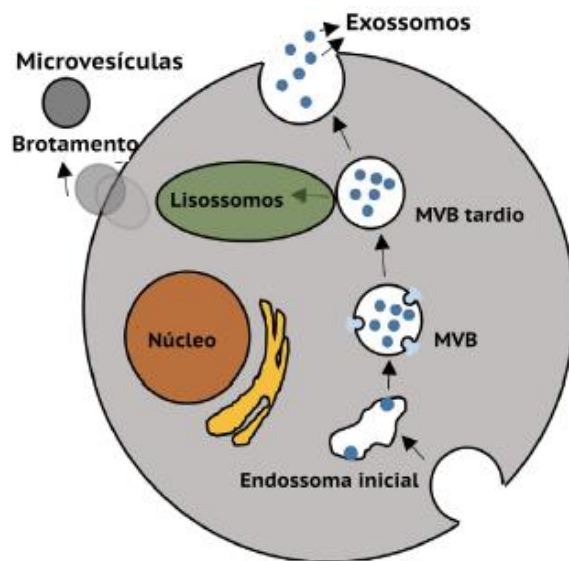
Devido a sua origem endossomal, os exossomos contém em sua superfície proteínas de transporte e fusão de membranas (GTPases, Annexinas, Flotillinas), tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), proteínas de choque térmico (Hsc70, Hsp90), proteínas envolvidas na biogênese do corpúsculo de microvesículas [MVB] (Alix, TSG101)<sup>(30)</sup> [Figura 4]. Adicionalmente, carregam em seu interior inúmeras moléculas que podem variar de acordo com sua célula de origem, como, por exemplo, moléculas de MHC-I e MHC-II (de origem de células apresentadoras de antígeno), lipídios e também ácidos nucleicos, como RNA mensageiro (mRNA), RNArribossômico (rRNA) e microRNA (miRNA). Um estudo recente<sup>(28)</sup> identificou um aumento de moléculas como Hsc70 e MAPK P-p38 ativas em exossomos derivados de células epiteliais do âmnio após a indução de estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que os exossomos derivados das células epiteliais do âmnio refletem as características fisiológicas da sua célula de origem e que seu conteúdo pode influenciar mudanças funcionais na interação materno-fetal<sup>(28)</sup>.

Estas moléculas, principalmente proteínas e miRNAs, têm sido alvo de diversos estudos, devido ao seu potencial como biomarcadores de diferentes doenças como câncer gástrico<sup>(31)</sup>, doença renal crônica<sup>(32)</sup> e asma<sup>(33)</sup>. De acordo com a base de dados ExoCarta<sup>(34)</sup>, existem

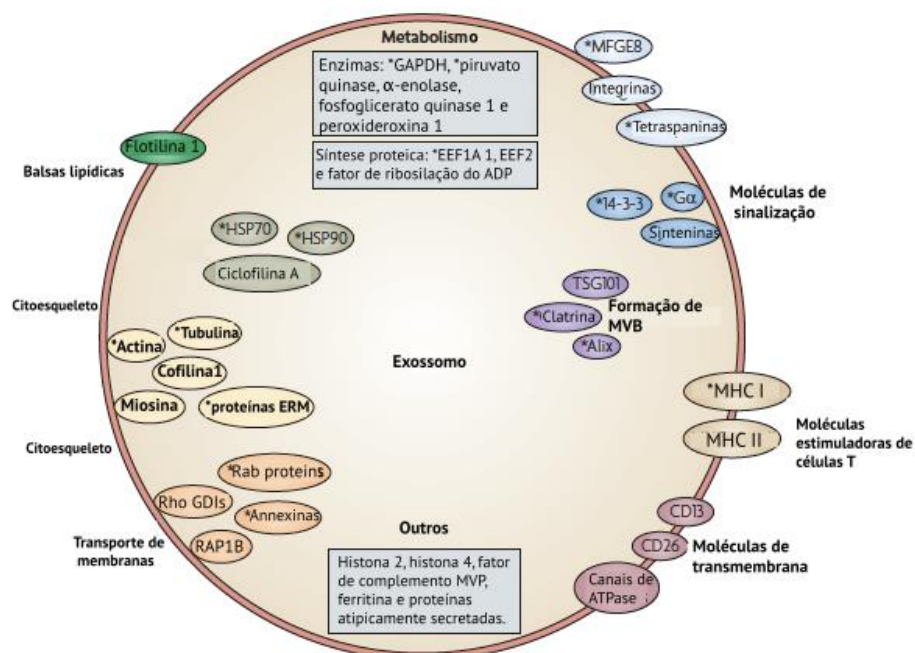
atualmente cerca de 8000 proteínas e 194 lipídios já descritos como associados aos EXOSSOMOS(25).



**Figure 2.** Representação esquemática de subtipos de vesículas extracelulares liberadas por uma célula. Três subtipos de vesículas extracelulares chamados exossomos, microvesículas ou ectossomos e corpos apoptóticos são secretados por uma célula no espaço extracelular. Os exossomos são liberados por exocitose, enquanto as microvesículas são secretadas por evaginação da membrana plasmática. Os corpos apoptóticos são liberados pelas células em morte celular durante os últimos estágios da apoptose para que o debris celular possa ser facilmente eliminado pelas células do sistema imune e células vizinhas. Imagem adaptada de Kalra, 2016 (35).



**Figura 3.** Formação dos exossomos e microvesícula. O exossomo é derivado do endossoma, a invaginação acontece e forma a corpo multivesicular contendo numerosas vesículas intraluminais (ILV). O corpo multivesicular pode ser degradado por lisossomos ou ocorrer uma fusão com a membrana e liberar os exossomos. As microvesículas, por sua vez, originam do brotamento do plasma da membrana. Imagem adaptada de: Ha, 2016.(25)



**Figura 4.** Composição proteica de um exossomo. Esse esquema que exemplifica a composição de um exossomo característico é baseado em dados de 15 análises proteômicas conduzidas em exossomos purificados de culturas celulares e fluidos biológicos. As proteínas encontradas em pelo menos 30% deles estão listadas e as proteínas presentes em pelo menos 50% está indicado por um asterisco. Imagem adaptada de Théry, 2009 (36).

No contexto da prematuridade, pouco se sabe ainda sobre a relação dos exossomos e o desenvolvimento do trabalho de parto pré-termo. Um estudo de Menon et al. (2019)(5) buscou caracterizar e estabelecer o conteúdo proteico de exossomos circulantes no plasma materno de gestantes com desfecho de parto pré-termo, rotura prematura das membranas pré-termo (PPROM) e de gestantes controle. Os autores puderam identificar expressão diferencial de proteínas por grupo e a principal rede de sinalização associada a essas mudanças mostrou ser de metabolismo lipídico e de transporte molecular, primariamente associada à inflamação durante o parto. Esses dados denotam que mudanças no conteúdo exossômico refletem

mudanças funcionais que contribuem para o desfecho gestacional e demonstram o potencial dos exossomos como biomarcadores.

Um estudo desenvolvido por Cantowine et al.(2016)<sup>(37)</sup> analisou 120 proteínas de micropartículas circulantes do plasma materno de gestantes com desfecho de parto pré-termo e gestantes com desfecho a termo no 1º trimestre da gestação. Dessas 120 proteínas, foi possível relacionar 32 delas ao parto pré-termo como fator de risco ou fator de proteção. Dentre as proteínas relacionadas ao parto pré-termo como fator de risco<sup>(37)</sup>, as mais significativas foram a alfa-2-macroglobulina, a C1INH (inibidor de C1) e a hemopexina.

A alfa-2-macroglobulina (A2M) é uma grande glicoproteína plasmática que funciona como inibidora de proteinase de amplo-espectro. Em mamíferos é sintetizada principalmente no fígado e é responsável por aumentar propriedades pró-coagulantes<sup>(38)</sup>. Nos exossomos, essas proteínas podem ser identificadas em células B, endoteliais, mesenquimais, entre outras. A A2M é também conhecida por estar envolvida na diferenciação de células tronco, coagulação sanguínea e organização da matriz extracelular (ExoCarta).

Já a C1INH é uma inibidora de esterase da molécula de complemento C1 da família das Serpinas (inibidoras de protease) e produto do gene *SERPING1*<sup>(39)</sup>, cuja principal função é inibir a ativação espontânea do sistema complemento. Esta proteína está envolvida no envelhecimento, na ativação plaquetária, e em respostas da imunidade inata e ativação do sistema complemento pela via clássica. Tanto a A2M quanto a C1INH já foram encontradas em exossomos circulantes<sup>(40, 41)</sup> e estão relacionadas à regulação negativa do sistema complemento na via da lectina.

A hemopexina é uma glicoproteína de plasma que é expressa principalmente no fígado<sup>(42)</sup>. Nos exossomos, essa proteína foi identificada em células de câncer colorretal<sup>(43)</sup>, urina<sup>(44)</sup>, timo e células tronco mesenquimais (ExoCarta). Além disso, possui um importante papel de transportar a molécula heme e está envolvida na regulação positiva da resposta imune

humoral mediada pela imunoglobulina circulante e processos virais. A hemopexina pode ser encontrada no lúmen vesicular endocítico, micropartículas de sangue e exossomos.

O possível envolvimento das proteínas citadas na patogênese do TPP e da RPM-PT pode ser explicado pelo *cross-talk* entre vias nas quais estas proteínas estão implicadas, a saber, organização da matriz extracelular (A2M), regulação de ativação espontânea do complemento (C1NH) e inibição da formação de radicais livres (hemopexina); e das vias desencadeadoras do parto relacionadas a estes mecanismos de remodelamento de tecidos gestacionais, ativação da imunidade inata e aumento de estresse oxidativo não contrabalançado por mecanismos compensatórios.

O crescente número de estudos nesta área nos últimos anos aponta para o aumento do interesse científico a respeito da correlação entre o conteúdo dos exossomos e os desfechos adversos da gestação em questão, porém os estudos nesta área se encontram em fase inicial e suas específicas associações permanecem alusivas. Ainda, apesar de evidências apontando para o efeito de algumas proteínas como fator de risco ao TPP, a busca de um biomarcador capaz de prever o parto pré-termo ainda permanece distante da realidade científica. Estudos que busquem aprofundar essa correlação contribuirão, não só para a melhor compreensão do processo molecular que culmina no desfecho prematuro da gestação, mas para a minimizar complicações advindas da prematuridade.



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnston T ST. Mechanisms and Management of normal labour. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 2013;23:7(Elsevier):208-13.
2. Norwitz ER, Bonney EA, Snegovskikh VV, Williams MA, Phillippe M, Park JS, et al. Molecular Regulation of Parturition: The Role of the Decidual Clock. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(11).
3. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
4. de Andrade Ramos BR, Witkin SS. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(5):755-62.
5. Menon R, Dixon CL, Sheller-Miller S, Fortunato SJ, Saade GR, Palma C, et al. Quantitative Proteomics by SWATH-MS of Maternal Plasma Exosomes Determine Pathways Associated With Term and Preterm Birth. *Endocrinology*. 2019;160(3):639-50.
6. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760-5.
7. Organization WH. Preterm birth: Fact Sheet <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/2016>
8. Howson CP KM, Lawn JE. . Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. World Health Organization; 2012.
9. Passini R, Jr., Cecatti JG, Lajos GJ, Tedesco RP, Nomura ML, Dias TZ, et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. *PLoS One*. 2014;9(10):e109069.
10. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet*. 2016;388(10063):3027-35.
11. Arpino C, D'Argenzio L, Ticconi C, Di Paolo A, Stellin V, Lopez L, et al. Brain damage in preterm infants: etiological pathways. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(2):229-37.
12. Patel RM, Kandefer S, Walsh MC, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR, et al. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med*. 2015;372(4):331-40.

13. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*. 2015;120(6):1337-51.
14. Assefa NE, Berhe H, Girma F, Berhe K, Berhe YZ, Gebreheat G, et al. Risk factors of premature rupture of membranes in public hospitals at Mekele city, Tigray, a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018;18(1):386.
15. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med*. 1998;338(10):663-70.
16. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(4):389-94.
17. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery--a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;127(2):145-59.
18. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;117 Suppl 1:S2-5.
19. Ferrero DM, Larson J, Jacobsson B, Di Renzo GC, Norman JE, Martin JN, Jr., et al. Cross-Country Individual Participant Analysis of 4.1 Million Singleton Births in 5 Countries with Very High Human Development Index Confirms Known Associations but Provides No Biologic Explanation for 2/3 of All Preterm Births. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162506.
20. Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Conoscenti G, Kim JC, Kim YM. The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001;15 Suppl 2:41-56.
21. Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol*. 2014;5:567.
22. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-78.
23. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301-12.
24. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569-79.
25. Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(4):287-96.

26. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
27. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med.* 2014;12:204.
28. Sheller S, Papaconstantinou J, Urrabaz-Garza R, Richardson L, Saade G, Salomon C, et al. Amnion-Epithelial-Cell-Derived Exosomes Demonstrate Physiologic State of Cell under Oxidative Stress. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157614.
29. Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: a possible role in cell fusion? *Placenta.* 2014;35(5):297-302.
30. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):940-8.
31. Ma M, Chen S, Liu Z, Xie H, Deng H, Shang S, et al. miRNA-221 of exosomes originating from bone marrow mesenchymal stem cells promotes oncogenic activity in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:4161-71.
32. Lange T, Stracke S, Rettig R, Lendeckel U, Kuhn J, Schluter R, et al. Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183435.
33. Gon Y, Maruoka S, Inoue T, Kuroda K, Yamagishi K, Kozu Y, et al. Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house-dust mite allergen-induced airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(12):1586-98.
34. ExoCarta. A web-based compendium of exosomal cargo. Jan, 2020.
35. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):170.
36. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-93.
37. Cantonwine DE, Zhang Z, Rosenblatt K, Goudy KS, Doss RC, Ezrin AM, et al. Evaluation of proteomic biomarkers associated with circulating microparticles as an effective means to stratify the risk of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214(5):631 e1- e11.

38. Shimomura R, Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Sugimoto T, Kinoshita N, et al. Alpha-2-macroglobulin as a Promising Biological Marker of Endothelial Function. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(4):350-8.
39. Schmaier AH. The hereditary angioedema syndromes. *J Clin Invest.* 2019;129(1):66-8.
40. Bastos-Amador P, Royo F, Gonzalez E, Conde-Vancells J, Palomo-Diez L, Borrás FE, et al. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *J Proteomics.* 2012;75(12):3574-84.
41. Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR $\gamma$  as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(3):433-8.
42. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(2):305-20.
43. Xu R, Greening DW, Rai A, Ji H, Simpson RJ. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods.* 2015;87:11-25.
44. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):363-79.