MARIA FERNANDA DE PAULA RIBEIRO

**Papel do Secretoma de Linhagens de Câncer de Mama em Modelo
de Angiogênese Experimental**

São Paulo

2019

MARIA FERNANDA DE PAULA RIBEIRO

**Papel do Secretoma de Linhagens de Câncer de Mama em Modelo
de Angiogênese Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira
Nishiyama

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3858
FMVZ

Ribeiro, Maria Fernanda de Paula
Papel do secretoma de linhagens de câncer de mama em modelo de angiogênese experimental / Maria Fernanda de Paula Ribeiro. – 2019.
66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama.

1. Câncer de mama. 2. Exossomos. 3. Angiogênese. 4. Ensaio de CAM. I. Título.

ERRATA

Ribeiro, M. F. P. **Papel do secretoma de linhagens de câncer de mama em modelo de angiogênese experimental.** 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
FICHA CATALOGRÁFICA	66 f.	65 f.
RESUMO	Papel do secretoma de linhagem de câncer de mama em modelo de angiogênese experimental 66 f.	Papel do secretoma de linhagens de câncer de mama em modelo de angiogênese experimental 65 f.
ABSTRACT	66 f	65 f.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel do secretoma de linhagens de câncer de mama em modelo de angiogênese experimental", protocolada sob o CEUA nº 7979130916 (ID 003784), sob a responsabilidade de **Ana Claudia Oliveira Carreira e equipe; Maria Fernanda de Paula Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/07/2017.

We certify that the proposal "Role of breast cancer cell lines secretome in angiogenesis experimental", utilizing 200 Birds (males and females), protocol number CEUA 7979130916 (ID 003784), under the responsibility of **Ana Claudia Oliveira Carreira and team; Maria Fernanda de Paula Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **06/2018**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **02 a 03 dias**

N: **200**

Linhagem: **ovos de galinha**

Peso: **0 a 0 g**

Local do experimento: Sala de cultura do NUCEL/NETCEM FMUSP

São Paulo, 08 de outubro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIBEIRO, Maria Fernanda de Paula

Título: **Papel do Secretoma de Linhagens de Câncer de Mama em Modelo de Angiogênese Experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jose Antonio e Denise, e meu irmão Carlos Eduardo, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não seriam possíveis. Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo este agradecimento, é porque eu consegui. O caminho percorrido desde o processo seletivo até a conclusão do Mestrado não foi fácil, e mais longo que o esperado, mas cheguei ao fim. Caminho qual eu não teria trilhado se não fosse o auxílio, incentivo e compreensão de algumas pessoas.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela minha vida, por todas as oportunidades que colocou em meu caminho até aqui e por ter me mantido nele. Sou grata por ter me dado saúde e forças para superar todas as dificuldades encontradas durante essa jornada.

Agradeço meus pais, Jose Antonio e Denise, por todo esforço investido em minha educação. Obrigada por apostarem todas as fichas sempre. Obrigada por acreditarem em meus sonhos e fazer não só o possível, mas inúmeras vezes o impossível para que meus sonhos se tornassem realidade. Obrigada por me ensinar a correr atrás dos meus objetivos. Obrigada por sempre colocarem esperança, amor e fé no meu coração. Seus corações estão comigo e o meu com vocês.

Ao meu irmão, Carlos Eduardo, que foi minha força em momentos de angústia e desespero. Por sempre me encher de amor e carinho. Por ser dono de um coração incrível, me apoiar e incentivar. E mesmo cobrando minha presença quase que diariamente, compreendeu a distância e ausência necessárias para a realização deste sonho. A distância não nos separa. Sem você, nada disso seria possível.

À minha avó Maria Aparecida, *in memoriam*, por todo amor de uma vida. Por ser exemplo de força e garra até o último momento. Por nunca deixar de estar presente durante minha criação e pelo orgulho que sempre demonstrou ter por minhas escolhas. Obrigada pelo amor, colo e carinho. Por me dar seu cantinho da cama, puxões de orelha e longas histórias. Agradeço a Deus por ter vindo ao mundo por ti.

Ao meu tio Aécio, *in memoriam*, e minha tia Mariângela por ajudarem a tornar meu sonho possível. Pelo incentivo, apoio e orgulho do caminho trilhado.

Agradeço minha família pela força e carinho de sempre. À minha tia Rosângela, sempre disposta a ouvir e ajudar.

À minha cunhada Juliana pela força e incentivo de anos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama, primeiramente pela confiança depositada em mim e por todo incentivo durante a jornada. Agradeço pela disponibilidade, por se fazer sempre

presente. Pelas valiosas contribuições, por todo aprendizado e questionamentos. Pela paciência, disposição e dedicação.

Aos meus colegas de curso pelo convívio e contribuições. Especialmente à Luana pelo companheirismo único durante esses anos, Bruna pela contribuição e disposição de sempre, Poliana e Fausto pelo apoio e abraços disponibilizados ao longo da jornada.

Aos meus amigos da vida. Todos aqueles que de certa forma contribuíram para meu crescimento, que não me deixaram desistir e apoiaram durante minhas infinitas crises. Obrigada pela paciência e por não desistirem de mim, por aceitarem meu afastamento e ausência em diversos momentos. À Fernanda e Raquel, pela força e por ficarem na torcida.

Ao Dr. Munir e Fabiana, por me ajudarem a me reestruturar nos piores momentos.

Também quero agradecer à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária, pela oportunidade única de ser aluna dessa instituição. Aos professores incríveis que tive oportunidade de estar em sala de aula.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Silvestres e Domésticos em atividade durante meu período acadêmico, aos professores Doutor José Roberto Kfoury Jr., Doutora Maria Angélica Miglino e Doutor Antônio Chaves de Assis Neto.

Aos professores que aceitaram compor minha banca de qualificação e defesa, pela disposição e significativas considerações.

Ao CADI – Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, à Doutora Rose Eli Grassi Rici.

Ao técnico do laboratório Ronaldo Agostinho.

Às secretárias que estiveram no departamento durante esse período, Daura Taciana Vaz Alves e Jaqueline M. de Santana.

Aos demais funcionários da universidade. Administração, secretarias e não menos importante, da limpeza. À toda equipe da biblioteca pela ajuda prestada e cursos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho: muito obrigada!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

- Carl Sagan

RESUMO

RIBEIRO, MFP. **Papel do Secretoma de Linhagem de Câncer de Mama em Modelo de Angiogênese Experimental**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. O câncer de mama é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células da mama que adquiriram características anormais, e pode se apresentar de formas distintas como: carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo, carcinoma metastático, adenocarcinoma e sarcoma. Cerca de 25% dos novos casos de câncer ao ano são de mama, entre eles apenas 1% atinge os homens. Atualmente tem sido descritas moléculas secretadas em vesículas de diferentes tamanhos por células que atuam como comunicadores celulares carregando diferentes tipos de proteínas, citocinas, fatores de crescimento e RNAs não codificadores. Dentre essas vesículas estão os exossomos, que são vesículas de membranas secretadas com 40-150nm de diâmetro, formadas durante o invaginamento de endossomos tardios e que são potentes fatores pró-angiogênicos. Além de induzir a angiogênese, são importantes biomarcadores tumorais. Estimulam a proliferação celular endotelial, migração e a formação do tubo *in vitro*. Promovem a proliferação de células endoteliais e formação de vasos. Influenciam a progressão do tumor, metástase e a eficácia terapêutica. Neste trabalho comparamos dois protocolos de isolamento de exossomos utilizando meios condicionados de células de linhagem de mama não maligna MCF10A e maligna Hs578T utilizando a estratégia de ultrafiltração combinada apenas à ultracentrifugação ou à ultracentrifugação e precipitação com um kit comercial visando a análise do papel angiogênicos em modelos experimentais de angiogênese. Analisamos o potencial angiogênico de exossomos isolados de meio condicionado da linhagem mais maligna de células de câncer de mama através de um modelo experimental de angiogênese utilizando células da veia do cordão umbilical (HUVEC) em gel de fibrina, e padronizamos a histologia da membrana corioalantoide de embrião de galinha para futuros ensaios com os exossomos isolados. Determinamos que o melhor protocolo para o isolamento de exossomos das linhagens de mama foi o protocolo que envolveu a estratégia de ultrafiltração seguida apenas de ultracentrifugação. Foi isolado maior quantidade de

exossomos nas células não malignas MCF10A em ambos os protocolos testados. O teste da adição dos exossomos isolados das células Hs578T no gel de fibrina, contendo células HUVEC semeadas em microcarregadores, mostrou o papel angiogênico dessas partículas após 6 dias em cultura. Análises futuras da aplicação dos exossomos isolados na membrana corioalantide de embrião de galinha (CAM) poderão comprovar o papel angiogênico *ex-vivo* dessas partículas isoladas de diversas células de mama com diferentes graus de malignidade. Espera-se desta forma determinar o nível angiogênico do secretoma das linhagens de câncer de mama, visando um modelo para testar drogas e medicamentos que possam diminuir a angiogênese no câncer.

Palavras-chave: Câncer de mama. Exossomos. Angiogênese. Ensaio de CAM.

ABSTRACT

RIBEIRO, MFP. **The Role of Secretome of Breast Cancer Cell Lines in an Angiogenesis Experimental Model**. 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cancer is the name given to a group of over 100 diseases that have in common the disordered growth of cells that invade the tissues and organs. Breast cancer is characterized by uncontrolled growth of breast cells that have acquired abnormal characteristics, and may present in different forms such as carcinoma *in situ*, invasive carcinoma, metastatic carcinoma, adenocarcinoma and sarcoma. About 25% of new cancer cases a year are breast cancer, among them only 1% affects men. Molecules secreted in vesicles of different sizes by cells that act as cellular communicators carrying different types of proteins, cytokines, growth factors and non-coding RNAs have been described. Among these vesicles are exosomes, which are secreted membrane vesicles 40-150nm in diameter, formed during late endosome invagination and which are potent pro-angiogenic factors. In addition to inducing angiogenesis, they are important tumor biomarkers. They stimulate endothelial cell proliferation, migration and tube formation *in vitro*. They promote endothelial cell proliferation and vessel formation. They influence tumor progression, metastasis and therapeutic efficacy. In this work we compare two protocols for isolation of exosomes using conditioned media from MCF10A and malignant Hs578T non-malignant breast cells lineages using the ultrafiltration strategy combined only with ultracentrifugation or ultracentrifugation and precipitation with a commercial kit aiming at the analysis of angiogenic role in experimental angiogenesis models. We analyzed the angiogenic potential of exosomes isolated from conditioned media from the most malignant breast cancer cell line through an experimental model of angiogenesis using fibrin gel umbilical vein cells (HUVEC), and standardized the histology of the chorioallantoid membrane of chicken embryo for future trials with isolated exosomes. We determined that the best protocol for isolation of breast exosomes from breast cell lines was the protocol that involved the ultrafiltration strategy followed only by ultracentrifugation. High amount of exosomes in non-malignant MCF10A cells were isolated in both protocols tested. Testing for the addition of exosomes isolated from Hs578T cells to the fibrin gel containing HUVEC cells seeded on microcarriers showed the angiogenic role of these

particles after 6 days in culture. Future analysis of the application of isolated exosomes in the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) may prove the *ex-vivo* angiogenic role of these particles isolated from various breast cells with different degrees of malignancy. Thus, it is expected to determine the angiogenic level of the secretoma of breast cancer strains, aiming at a model for to test drugs and drugs that may decrease angiogenesis in cancer.

Keywords: Breast cancer. Exosomes. Angiogenesis. CAM assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Embriões de galinha com 11 dias de desenvolvimento	39
Figura 2 - Embriões de galinha em E11 abertos na incubadora	40
Figura 3 - Amostra de CAM retirada de embrião em E11 mostrando a rede vascular formada	41
Figura 4 - Linhagens de células de mama não maligna MCF10A e maligna Hs578T	44
Figura 5 - Gráficos obtidos da análise quantitativa de exossomos no Nanosight, de dois tipos de células de mama, MCF10A não maligna e Hs578T maligna, comparando os diferentes protocolos de isolamento Ultracentrifugação+Total Exosome Isolation Kit (UC+TEI) e apenas Ultracentrifugação (UC). É possível observar maior concentração de vesículas no tamanho estabelecido para exossomos (entre 50-150 nm)	49
Figura 6 - Quantidade de partículas/mL (Exossomos) liberados pelas linhagens celulares MCF10A e Hs578T utilizando dois diferentes protocolos de isolamento Ultracentrifugação+Total Exosome Isolation Kit (UC+TEI) e apenas Ultracentrifugação (UC)	50
Figura 7 - Western blot para exossomos isolados de células de mama MCF10 A e Hs578T utilizando o anticorpo anti-CD81. Amostras: 1- Marcador de Massa Molecular de Proteína (Protein Ladder); 2- Controle Negativo: Meio condicionado contendo SFB; 3- Exossomos isolados de células Hs578T com protocolo UC+TEI; 4- Sobrenadante da amostra 3; 5- Exossomos isolados de células Hs578T com protocolo UC; 6- Sobrenadante da amostra 5; 7- Controle Negativo: PBSA	51
Figura 8 - Análise da formação de brotamentos de vasos em ensaio de gel de fibrina com células HUVEC. C-: Controle negativo sem adição de VEGF; C+: Controle Positivo com adição de VEGF recombinante; Exo: adição de exossomos isolados de células Hs578T. D0: Dia de adição dos microcarregadores contendo as células HUVEC no gel de fibrina; D6: 6 dias após a adição dos microcarregadores ao gel de fibrina. Setas indicam a formação de brotamentos. Aumento 40x.....	52
Figura 9 - Análise histológica de membrana corioalantóide de galinha fixada em PFA4% por 5 horas, corado com H&E. A e B: Embrião 1. C e D: Embrião 2. Setas: vasos sanguíneos.....	53
Figura 10 - Análise histológica de membrana corioalantóide de galinha fixada em PFA4% por 24 horas, corado com H&E. A e B: Embrião 1. C e D: Embrião 2. Setas: vasos sanguíneos.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação molecular dos subtipos tumorais de mama	20
Quadro 2 - Vantagens e limitações do modelo de CAM.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÂNCER	18
2.1.1 Câncer de Mama	19
2.1.1.1 Prevenção	20
2.1.1.2 Diagnóstico.....	21
2.1.1.3 Tratamento	22
2.1.1.4 Dados Atuais	23
2.2 ANGIOGÊNESE	24
2.2.1 Angiogênese em Câncer	25
2.3 EXOSSOMOS	27
2.3.1 Exossomos em Câncer	30
2.4 ENSAIO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÃO DE GALINHA (CAM).....	32
2.4.1 Avaliação Angiogênica de Células Tumorais em Ensaio de CAM	36
3 OBJETIVO	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO	39
4.2 ENSAIOS DE MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE EMBRIÃO DE GALINHA ...	40
4.3 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA CÉLULAS DE MAMÍFEROS	42
4.4 LINHAGENS CELULARES.....	42
4.5 CONDIÇÕES DE CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES	43
4.6 ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS	44
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE EXOSSOMOS	45
4.8 WESTERN BLOT	46
4.9 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE ANGIOGÊNESE: FORMAÇÃO DE VASOS EM GEL DE FIBRINA	46
4.10 ENSAIO <i>EX-OVO</i> PARA ANGIOGÊNESE – ENSAIO CAM – MEMBRANA CORIOALANTÓIDE	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS.....	48
5.2 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE VASOS EM GEL DE FIBRINA.....	51
5.3 ENSAIO EM MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE EMBRIÃO DE GALINHA	52
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. O segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres é o de mama (INCA, 2015).

Atualmente as terapias anti-angiogênicas são o padrão no tratamento do câncer. Porém, alguns tumores vêm desenvolvendo resistência às drogas quando não utilizados em combinação com imunoterapia (RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do brotamento de vasos já existentes (NISHIDA, 2006; VONG; KALLURI, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012; OWEN; MOHAMADZADEH, 2013; WANG et al., 2015; BAHMANI et al., 2016; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017), promovendo processos como a proliferação celular, migração, diferenciação e comunicação célula-célula (ADAMS; ALITALO, 2007). Angiogênese patológica é uma característica do câncer (CARMELIET; JAIN, 2000).

A progressão tumoral e metástase dependem da angiogênese, que auxilia na capacidade de espalhar as células tumorais para órgãos adjacentes ou distantes. A agressividade das células tumorais é reflexa da expressividade dos fatores angiogênicos. A inibição da angiogênese destrói o tumor, sem suprimento a neoplasia não cresce (NISHIDA, 2006; VONG; KALLURI, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; PADUCH, 2016). A supressão tumoral é mediada pela inibição da neovascularização, e o crescimento tumoral é resultado da angiogênese (DIMOVA; POPIVANOV; DJONOV, 2014).

Exossomos são potentes fatores pró-angiogênicos. Eles estimulam a proliferação celular endotelial, migração e a formação do tubo *in vitro* (QIN et al. 2016) através da transmissão de sua carga (ONO et al. 2014, CONIGLIARO et al. 2015). O conteúdo molecular de exossomos pode variar significativamente em função das condições fisiológicas e o tipo de célula original (BRINTON et al. 2015, CONIGLIARO et al. 2015). Os exossomos transferem informações genéticas, modulam a resposta

imune e um nicho metastático. Além de induzir a angiogênese, são importantes biomarcadores tumorais. Influenciam a progressão do tumor, metástase e a eficácia terapêutica (BRINTON *et al.* 2015). A progressão tumoral, metástase e quimiorresistência dependem da capacidade do tumor e o seu microambiente para comunicar (BRINTON *et al.* 2015, CONIGLIARO *et al.* 2015).

Apesar do papel na quimiorresistência, são importantes biomarcadores de doenças e também capazes de atuar como carreadores projetados, e alcançar alvos terapêuticos pré-estabelecidos. São promissores indicadores de carga tumoral, prognóstico e tratamento. Sua característica capacidade nanocarreadora pode ser um caminho para subverter a resistência terapêutica (LI; NABET, 2019).

A proposta deste estudo foi analisar o potencial angiogênicos *in vitro* de exossomos isolados de meios de cultivo condicionados por células de câncer de mama para avaliar se causam indução da angiogênese visando no futuro ter um modelo para tratamento com drogas e analisar se estas diminuem a angiogênese.

A escolha para testar a indução angiogênica foi o modelo *in vitro* utilizando células da veia do cordão umbilical (HUVEC) e padronizar o ensaio de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM) visando sua utilização também. Estudos o apontam como um modelo interessante por sua alta vascularização, fácil reprodutibilidade e baixo custo (LOKMAN *et al.*, 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento e divisão descontrolados de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (NALL, 2018; “Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019). O câncer é classificado de acordo com a localização e os tecidos que o formam (ex. sarcoma, carcinoma e adenocarcinoma), e é possível ter mais de um tipo ao mesmo tempo (NALL, 2018). Alguns tipos de câncer tem um rápido crescimento, outros são mais lentos. Podem ser visíveis, formando tumores (nódulos malignos são câncer, nódulos benignos não são), ou não visíveis, como por exemplo a leucemia, que cresce nas células sanguíneas (“American Cancer Society”, 2015; NALL, 2018). O câncer afeta os sistemas imunológico, linfático e hormonal (“Cancer Research UK”, 2019).

As células tem funções específicas e certo tempo de vida. A morte natural das células (apoptose) é benéfica. Quando uma célula morre, o corpo substitui por outra nova, que funciona melhor. Porém, as células cancerígenas não possuem esse mecanismo que as fazem morrer, assim, não param de se dividir e acabam se acumulando no organismo. É esse acúmulo que forma os tumores e prejudica o sistema imunológico. Além da proliferação celular local, estas células podem migrar e se espalhar pelos gânglios linfáticos. O suprimento para manter as células cancerígenas é o mesmo que mantém as células saudáveis, tanto oxigênio quanto nutrientes. Os genes influenciam a produção de proteínas que carregam comandos de crescimento e divisão celular. Outras proteínas tem função reparadora de células danificadas, por isso alterações gênicas podem levar ao câncer. Essas alterações podem ocorrer após o nascimento devido à fatores externos ou serem mutações genéticas herdadas (NALL, 2018).

Existem mais de 200 tipos de câncer (“Cancer Research UK”, 2019). O tipo mais comum entre as mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, é o câncer

de mama, que anualmente corresponde a cerca de 29,5% dos novos casos em mulheres no Brasil (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019). O mais comumente detectado é o carcinoma mamário, que se origina a partir do epitélio dos ductos das glândulas mamárias (ALINE RAMOS MAIA LOBBA, 2014).

21.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença resultante da multiplicação de células anormais da mama, que forma um tumor. Há vários tipos de câncer de mama. Alguns se desenvolvem rapidamente, outros não (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019). O câncer de mama é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células da mama que adquiriram características anormais, causadas por uma ou mais mutações no material genético da célula. Essas mutações transformam células em cancerosas, com propriedades específicas, e geram tumores. Porém, em alguns casos essas células podem se multiplicar exageradamente e não ter a capacidade de invadir outros tecidos, quando isso acontece os tumores causados são benignos (“American Cancer Society”, 2015). Fenômenos indicam que as células do câncer de mama sobrevivem por um longo tempo em algum lugar do corpo em estado de latência, nas quais as células cessam a divisão, mas sobrevivem em um estado quiescente enquanto esperam por condições adequadas para começar a proliferação (ONO et al., 2014).

O câncer de mama pode se apresentar em formas distintas de carcinoma: carcinoma *in situ*, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário; carcinoma invasivo, no qual as células tumorais podem atravessar os limites teciduais; e carcinoma metastático, no qual as células tumorais migram para órgãos distantes (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001); adenocarcinoma, que começa no tecido glandular; e sarcoma, que começa no tecido conjuntivo, mas são raros (“American Cancer Society”, 2015).

Devido à dificuldade de se diferenciar morfológicamente os tipos de tumor mamário, foi estabelecido em 2001, uma nova classificação molecular baseada no perfil de expressão gênica desses tumores. Essa nova classificação, além de

complementar a anatomia patológica, também se tornou uma alternativa para avaliar a alta heterogeneidade tumoral característica do carcinoma mamário que normalmente dificulta a rotina de prognósticos e a estratégia terapêutica a ser utilizada (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001).

De acordo com o perfil molecular estabelecido por Sorlie e colaboradores, foram definidos, então, cinco grandes subgrupos de tumores mamários, classificados como Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, tipo basal (basal-like) e tipo mama normal (normal breast-like) (SORLIE et al., 2001) (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação molecular dos subtipos tumorais de mama

Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcacão
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+
HER2+	RE-, RP-, HER2+++
Tipo basal (<i>Basal-like</i>)	RE-, RP-, HER2-, EGFR+
Tipo mama normal (Normal <i>breast-like</i>)	RE-, RP-, HER2-, EGFR-

Características dos subtipos tumorais de mama. HER2 receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrógeno; RP receptor de progesterona.

2.1.1.1 Prevenção

As causas mais comuns e evitáveis são o tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, sedentarismo, má nutrição e exposição solar. O inevitável envelhecimento é considerado importante fator quando aproximadamente 87% dos novos casos de câncer são diagnosticados em pacientes com 50 anos ou mais. Assim sendo não existe causa única, pois podem ser fatores ambientais e comportamentais, histórico reprodutivo e hormonal, fatores genéticos e hereditários (NALL, 2018).

Evitar a obesidade é uma recomendação básica para prevenir o câncer de mama, e a ingestão de álcool é contraindicada assim como a exposição a radiações

ionizantes em idade inferior aos 35 anos. Estima-se que 30% dos casos podem ser evitados se adotadas práticas saudáveis (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019).

Podem estar mais predispostas a ter a doença mulheres que tiveram menarca precoce; menopausa após os 55 anos; usaram contraceptivos orais de dosagens elevadas de estrogênio, que fizeram uso da medicação por longo período e as que usaram anticoncepcional em idade precoce, antes da primeira gravidez; não ter filhos, ou ter após os 30 anos; não ter amamentado; fazer reposição hormonal pós menopausa; ter histórico familiar de câncer de ovário ou mama, ou possuir alteração genética, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2 (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019).

2.1.1.2 Diagnóstico

A maioria dos casos de câncer de mama é identificada em exames de rotina, como a mamografia, por isso sua importância. Pode ser notado em exame clínico ou de imagens.

Os principais sintomas deste tipo de câncer são caracterizados pelo aparecimento de caroço, pequenos nódulos nas axilas ou pescoço, alterações na pele da mama e/ou bico do seio, saída de líquido dos mamilos (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019).

Todos os exames de imagem devem terminar com a classificação BI-RADS® do achado, que varia de zero a VI. Essa classificação é utilizada para o médico saber os próximos passos, como por exemplo, se é necessário fazer biópsia (“Sociedade Brasileira de Mastologia”, 2016).

2.1.1.3 Tratamento

O tratamento do câncer é multidisciplinar. Pode ser feito através de imunoterapia, hormonioterapia, radioterapia, quimioterapia, transplante de células-tronco, terapias direcionadas (ex. terapia com anticorpos monoclonais) e cirurgia (NALL, 2018). Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019). Geralmente o paciente é tratado com um cirurgião, um oncologista e um radio-oncologista. Ao que se refere em tratamento cirúrgico, a mama pode ser retirada total ou parcialmente. Ainda pode ser necessário retirar um linfonodo (sentinela) ou todos da axila. Do tratamento clínico, pode ser adjuvante (após a cirurgia), ou neoadjuvante (antes da cirurgia). O paciente pode ser submetido à quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia, de acordo com as características do tumor (“Hospital do Câncer de Barretos”, 2016).

Os tratamentos com a terapia hormonal, só é empregada para câncer de mama com células que apresentam positividade para receptores hormonais, pois nem todas as células tumorais crescem a partir do estímulo hormonal, apenas aquelas que possuem receptores para estrogênio e/ ou progesterona na sua superfície. Esses receptores funcionam como “portas de entrada” para o estrogênio, permitindo sua penetração e ação nas células (“ALBERT EINSTEIN SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA”, 2019). A hormonioterapia é a classe mais efetiva no tratamento de tumores que tenham expressão de receptores hormonais (“American Cancer Society”, 2015; “ALBERT EINSTEIN SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA”, 2019).

De acordo com o INCA, a radioterapia é um método de tratamento que pode ser indicado de forma exclusiva ou associada a outros métodos terapêuticos. Capaz de destruir células tumorais através de um feixe de radiações ionizantes, é importante ter cuidado com o direcionamento para a região e a quantidade emitida, não podendo exceder os limites.

A quimioterapia pode utilizar um ou mais compostos químicos. Os medicamentos são aplicados, em sua maioria, na veia, podendo também ser dados por via oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intratecal. Os medicamentos se

misturam com o sangue e são levados a todas as partes do corpo, destruindo as células doentes que estão formando o tumor e impedindo, também, que elas se espalhem pelo corpo (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2016).

E por último, os tratamentos para algumas doenças malignas que afetam as células do sangue consistem na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2016).

2.1.1.4 Dados Atuais

Segundo o INCA, em 2018 o Brasil teve 582.690 novos casos de câncer, sendo de mama 59.700 destes. Dos 218.640 óbitos registrados de câncer, 16.724 foram por câncer de mama. No biênio 2018-2019, a cada 100 mil mulheres, 56,33 foram diagnosticadas com câncer de mama (“Inst. Nac. do Câncer INCA”, 2019).

Segundo dados da Globocan e do INCA, é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo mundo, depois do de pele não-melanoma, sendo considerado um problema de saúde pública mundial (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019). A mutação para câncer de mama de caráter genético/hereditário corresponde de 5% a 10% do total de casos da doença (NALL, 2018).

Atualmente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estados avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (SAÚDE; INCA, 2017).

De acordo com uma publicação da American Cancer Society em 2018, a partir de janeiro de 2016, cerca de 15,5 milhões de pessoas viviam com câncer nos EUA. Em 2014, mais de 480 mil morreram em decorrência do uso de tabaco. Segundo o National Cancer Institute (“NIH National Cancer Institute”, 2015), após o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o tipo de maior incidência nos EUA também, seguido pelos de pulmão e próstata.

Segundo o Cancer Research UK, no Reino Unido, 1 em cada 2 terá câncer.

2.2 ANGIOGÊNESE

O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos tem significativa função tanto no crescimento e desenvolvimento, regeneração de tecidos e órgãos, quanto em algumas condições patológicas. Esse processo é importante para reparo, expansão ou remodelação de tecidos. A angiogênese tem papel marcante em diferentes processos, como cicatrização de feridas e patologias como câncer (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018). Células malignas e algumas imunológicas são capazes de iniciar a angiogênese pela expressão e secreção de fatores de crescimento e indução de hipóxia (LI; NABET, 2019).

A formação de vasos sanguíneos ocorre através de células provenientes da medula óssea que migram para a região e se diferenciam em células endoteliais, tanto na saúde quanto na doença (WANG et al., 2015). Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do brotamento de vasos já existentes (NISHIDA, 2006; VONG; KALLURI, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012; OWEN; MOHAMADZADEH, 2013; WANG et al., 2015; BAHMANI et al., 2016; LOU et al., 2017; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017; NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018; MASHOURI et al., 2019), promovendo processos como a proliferação celular, migração, diferenciação e comunicação célula-célula (ADAMS; ALITALO, 2007). Existem dois tipos de angiogênese. A angiogênese fisiológica ocorre durante o desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo feminino e cicatrização. A patológica ocorre em uma série de doenças neoplásicas, isquêmicas e inflamatórias (CARMELIET; JAIN, 2000; FOLKMAN, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; OWEN; MOHAMADZADEH, 2013; DIMOVA; POPIVANOV; DJONOV, 2014; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017; NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

As etapas da angiogênese podem ser avaliadas e quantificadas através de bioensaios (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

2.2.1 Angiogênese do Câncer

Nem sempre é possível visualizar com precisão o processo angiogênico, porém, foram desenvolvidos diferentes bioensaios e técnicas para entender os diferentes estágios do processo angiogênico. Essa verificação é fundamental para a avaliação de medicamentos que modulam a função dos vasos. No câncer os bioensaios tem sido importante para o desenvolvimento de drogas angiostáticas para o tratamento, para projetar terapias combinadas com inibidores de angiogênese, relacionar angiogênese e imunidade e estudar mecanismos de resistência a drogas (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

A angiogênese patológica é uma característica do câncer (CARMELIET; JAIN, 2000), tem papel crucial na progressão tumoral, invasão e metástase (TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012; DIMOVA; POPIVANOV; DJONOV, 2014; BAHMANI et al., 2016; PADUCH, 2016; RAICA; CIMPEAN; RIBATTI, 2017). Durante a progressão do tumor, células tumorais se disseminam através desses vasos desenvolvidos (PADUCH, 2016). Células tumorais secretam grande quantidade de fatores pró-angiogênicos que criam uma rede vascular anormal, com vasos desorganizados, imaturos e permeáveis, com péssima perfusão (VIALARD, 2017). Porém, mesmo a angiogênese sendo conhecida como essencial para tumores sólidos, existe outros modos de formação de novos vasos (RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

O tumor precisa de nutrientes e oxigênio para crescer e se disseminar, ele envia sinais que estimulam a angiogênese. A vasculatura do tumor está relacionada com o suporte nutricional, trocas gasosas, retirada de metabólitos, porta de entrada e saída do sistema imune, migração das células provenientes da medula óssea e disseminação metastática (ADAMS; ALITALO, 2007; TAMMELA; ALITALO, 2010; TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2012; PADUCH, 2016). Sem suprimento sanguíneo de tumor as neoplasias não crescem mais que 2mm³ (VONG; KALLURI, 2011).

Nos tecidos normais existe uma homeostasia entre fatores ativadores e inibidores da angiogênese, porém, no tumor há uma quebra nesse equilíbrio, assim tendo mais fatores pró-angiogênicos para dar início à angiogênese (HANAHA; WEINBERG, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; PADUCH, 2016). A progressão tumoral e metástase dependem da angiogênese, que auxilia na capacidade de espalhar as células tumorais para órgãos adjacentes ou distantes. A agressividade das células tumorais é reflexa da expressividade dos fatores angiogênicos. A inibição da angiogênese destrói o tumor, sem suprimento a neoplasia não cresce (NISHIDA, 2006; VONG; KALLURI, 2011; AL-HUSEIN et al., 2012; PADUCH, 2016). A supressão tumoral é mediada pela inibição da neovascularização, e o crescimento tumoral é resultado da angiogênese (DIMOVA; POPIVANOV; DJONOV, 2014).

A hipóxia é o principal fator desencadeante da angiogênese (OWEN; MOHAMADZADEH, 2013; WANG et al., 2015). O microambiente hipóxico pode promover a seleção de células tumorais mais invasivas e agressivas, e também impedir a morte do tumor. A perfusão anormal reduz também a difusão de drogas (VIALARD, 2017).

As regiões de hipóxia no microambiente são onde tem menor quantidade de oxigenação e nutrição, o que faz ativar o HIF (fator indutor de hipóxia), que leva à expressão de uma gama de fatores de crescimento (WANG et al., 2015; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). Os principais fatores pró-angiogênicos são VEGF – principal indutor da angiogênese, PDGF – induz a proliferação das células do estroma, como fibroblastos, células endoteliais e outras células presentes no microambiente, MMPs – degradam a matriz e liberam os fatores de crescimento, abrem espaço para novos vasos serem formados, quimiocinas – atraem células imunes, TSP1 – inibidor da célula endotelial e ANG – direciona o brotamento e é responsável pela maturação dos vasos (WANG et al., 2015).

O principal fator indutor de angiogênese é o VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular. Os VEGFs são uma família de glicoproteínas diméricas, e cada uma delas exerce um papel nos efeitos fisiológicos (AL-HUSEIN et al., 2012). A alta expressão de VEGF está ligada à metástase e reincidência do tumor na maioria dos casos. O VEGF tem efeito sobre o crescimento das células endoteliais e aumenta a

permeabilidade vascular (OWEN; MOHAMADZADEH, 2013; DIMOVA; POPIVANOV; DJONOV, 2014).

Os vasos sanguíneos tumorais são importante alvo para terapia do câncer (VIALARD, 2017). Atualmente as terapias anti-angiogênicas são o padrão no tratamento do câncer. Porém, alguns tumores vêm desenvolvendo resistência às drogas quando não utilizados em combinação com imunoterapia. Essa abordagem estratégica da combinação de fármacos com imunoterapia é fundamental para o tratamento oncológico, ela reprograma o microambiente tumoral para aumentar a imunidade antitumoral (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

2.3 EXOSSOMOS

Exossomos são pequenas vesículas que contêm proteínas, lipídios e material genético. São mediadores da comunicação célula-célula, e no microambiente tumoral atuam como importantes sinalizadores e ainda podem participar da progressão tumorigênica e resistência à terapia. No microambiente tumoral, exossomos podem atuar de forma impactante tanto no sucesso do tratamento quanto na progressão do câncer. Apesar do papel na quimiorresistência, são importantes biomarcadores de doenças e também capazes de atuar como carreadores projetados, e alcançar alvos terapêuticos pré-estabelecidos. São promissores indicadores de carga tumoral, prognóstico e tratamento. Sua característica capacidade nanocarreadora pode ser um caminho para subverter a resistência terapêutica (LI; NABET, 2019).

São nanovesículas extracelulares liberadas de corpos multivesiculares (LI; NABET, 2019), encontradas em fluidos corporais que contém moléculas de sinalização biológica, tendo como principal função a comunicação intercelular. Eles têm a capacidade de carregar diferentes cargas e ainda podem ser modificados com proteínas para fornecer cargas e ter função terapêutica agindo em tecidos alvos (MASHOURI et al., 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). A biogênese exossomal consiste nas fases de iniciação, endocitose, desenvolvimento multivesicular e sua liberação em si (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019).

Exossomos são vesículas de membranas com 30-100nm de diâmetro (MASHOURI et al., 2019) formadas durante o invaginamento de endossomos tardios, que se desenvolvem dentro de endossomos multivesiculares intracelulares (QIN et al., 2016). O primeiro passo para a formação de endossomos é a fusão das vesículas endocíticas. Exossomos contêm um complexo de proteínas, proteínas de matriz extracelular, fatores de transcrição, enzimas, lipídios, receptores e ácidos nucleicos. Os exossomos possuem conteúdo em comum e também algumas proteínas específicas que refletem a composição de sua célula de origem (MASHOURI et al., 2019). Muitas células, incluindo os reticulócitos, células dendríticas, células B, células T, mastócitos, células epiteliais e células tumorais, segregam exossomos. Os exossomos transportam RNA-codificador, RNA-não codificador, proteínas, moléculas de apresentação de antígeno e DNA entre as células. Exossomos modulam as células receptoras e outros órgãos de função a uma grande distância. A partir de células B incorporam e transportam complexos de antígenos funcionais. As vesículas anexam ou se fundem com a membrana da célula-alvo através da superfície do exossomos (QIN et al., 2016; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Ao contrário de outras vesículas extracelulares como microvesículas, ectosomas e partículas de membrana, os exossomos não se originam pelo brotamento direto ou derramamento da membrana plasmática. Eles são derivados de MVEs, comumente referidos como corpos multivesiculares (MVBs), sua formação ocorre quando a membrana da MVE ao se comprimir para dentro cria pequenas vesículas, com conteúdos citoplasmáticos como proteínas, RNA e DNA genômico. Uma secreção de exossomos ocorre quando MVEs fundem-se com a membrana plasmática e libertam seu conteúdo para o meio extracelular (BRINTON et al., 2015; CONIGLIARO et al., 2015). Exossomos são secretados a partir de numerosos tipos celulares e tem função na comunicação intercelular via transporte de conteúdo, como proteína, RNAm e microRNAs. Exossomos secretados por células cancerosas podem desempenhar importante papel na progressão do câncer através da promoção da angiogênese e infiltração neutrofílica. Exossomos secretados por células do estroma no microambiente tumoral podem contribuir para a progressão do câncer através da transmissão de sua carga para células neoplásicas (ONO et al., 2014; CONIGLIARO et al., 2015). Após a ativação das células por determinados agentes, a liberação dos exossomos é aumentada significativamente. Os exossomos contêm tetraspaninas como CD9, CD63, CD81, Alix, TSG101 e proteínas de choque térmico. O conteúdo molecular de

exossomos pode variar significativamente em função das condições fisiológicas e o tipo de célula original (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019).

A primeira descrição de exossomos foi implicada na maturação de reticulócitos e, mais tarde, foi demonstrado que têm um papel importante nas respostas imunológicas (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Exossomos foram purificados a partir de fluidos corporais, liberando proteínas funcionais, lipídeos, RNAm, microRNAs, GF e outras moléculas bioativas (TORREGGIANI et al., 2014; CONIGLIARO et al., 2015), e, por causa do seu conteúdo específico, têm sido propostos como biomarcadores adequados para diferentes doenças.

Os exossomos podem estimular a regeneração de tecidos e de órgãos como coração, pulmão, fígado e rim. As funções dos órgãos se beneficiam do tratamento. Exossomos não só previnem a apoptose como também reforçam a resistência celular. Essas vesículas viajam entre as células e entregam cargas funcionais, como fatores de crescimento, proteínas e RNA. Regulam a diferenciação, comprometimento, função e proliferação das células. Estudos atuais mostram tratamento exossomal em neuroregeneração, regeneração de pele e regeneração óssea *in vitro* e *in vivo*. Exossomos são potentes fatores pró-angiogênicos. Eles estimulam a proliferação celular endotelial, migração e a formação do tubo *in vitro*. Promovem a proliferação de células endoteliais e formação de vasos através do grupo exossomal miR-129, miR-136 e miR-17-92. Estudos recentes exploram a aplicação de exossomos, porém é necessário compreender melhor seu papel, pois o mecanismo de sua ação ainda permanece indefinido (QIN et al., 2016).

Exossomos podem ser isolados de fluidos biológicos ou sobrenadantes de cultura celular através de diferentes técnicas como ultracentrifugação (LI; NABET, 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019), filtração e cromatografia, além de hoje também existir kits comerciais que facilitam o processo (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Métodos de enriquecimento têm sido implantados para produzir populações puras de exossomos sem necessidade de ultracentrifugação. Recentemente, foram desenvolvidos também métodos de abordagens acostofluídicas, que usam ondas acústicas para a separação e são livres de contato. Citometria de fluxo é comumente utilizada para sua quantificação indireta. Outro meio de quantificação, direto, é a análise por meio de rastreamento de partículas através

da tecnologia NanoSight, uma técnica de espelhamento de luz. Já a pureza e qualidade é geralmente avaliada através da microscopia eletrônica, pela sua forma, ou pela presença de marcadores de proteínas como TSG101, CD81 e CD9 (LI; NABET, 2019).

Atualmente, com as tecnologias de sequenciamento de próxima geração, foi possível identificar e entender o conteúdo exossômico. Conteúdo qual foi catalogado para a criação de diferentes bancos de dados, como ExoCarta, Vesiclepedia e exRNA (LI; NABET, 2019).

2.3.1 Exossomos em Câncer

Sabe-se hoje que exossomos possuem importante papel quando se fala de microambiente tumoral. São capazes de promover tanto o início do tumor quanto o processo metastático e através dessa comunicação intercelular ainda desempenham papel na resistência terapêutica (LI; NABET, 2019; MASHOURI et al., 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Participam de todas as etapas, desde a indução do fenótipo invasivo até as metástases distantes. Exossomos influenciam diferentes vias tumorigênicas. Alguns estudos indicam que a eliminação de exossomos pode inibir a progressão tumoral (MASHOURI et al., 2019).

Mesmo diante de tantas evidências negativas descritas por sua atuação na progressão tumoral, quando falamos dos derivados de células imunes, podemos considerar sua capacidade de matar células tumorais (LI; NABET, 2019). Porém, quanto mais malignas as células, maior a probabilidade migratória para locais mais distantes, criando assim um nicho metastático. As células tumorais tornam-se mais agressivas pois são células epiteliais que perdem suas características e se transformam funcional e morfológicamente para se tornarem mais invasivas (MASHOURI et al., 2019).

Exossomos são responsáveis pela ativação do estroma, a indução do interruptor angiogênico, aumento da permeabilidade vascular, e de escape imunológico. Os exossomos além de contribuir para a metástase, auxiliando na

transição epitelial para mesenquimal e formação dos nichos pré-metastáticos, protegem as células de tumor contra os efeitos citotóxicos de drogas de quimioterapia e transferem propriedades de quimiorresistência de células vizinhas (BRINTON et al., 2015).

Estudos sugerem que exossomos regulam o efluxo de drogas e são capazes e alterar as vias de transdução de sinal para criar resistência à medicamentos. Além de possuírem também a capacidade de remover biomoléculas desfavoráveis, portanto as células cancerígenas podem se tornar resistentes à terapia expulsando os medicamentos quimioterápicos para fora da célula tumoral (MASHOURI et al., 2019).

Condições de estresse, como a hipóxia, aumentam a liberação de exossomos de origem maligna, o que resulta na progressão tumoral (MASHOURI et al., 2019). Estudos abordam efeitos da hipóxia sobre os exossomos quando comparado com células cultivadas em condições normais de oxigenação. Estas microvesículas secretadas contém fatores carcinogênicos como RNAm, microRNA, citocinas e fatores de crescimento. Há uma correlação positiva entre a quantidade de exossomos secretados e o estágio do câncer. A hipóxia pode afetar a reparação do DNA por meio de vários mecanismos. Por dificultar o processo normal do ciclo celular, a hipóxia está relacionada com a resistência às drogas que tem como alvo a proliferação celular. Mecanismos de resistência à radiação em células tumorais também foram implicados à essas condições. Exossomos têm papel na mediação de quimioresistência (PARK et al., 2010; THOMAS et al., 2013).

A progressão tumoral, metástase, e quimiorresistência dependem da capacidade do tumor e o seu microambiente para comunicar (BRINTON et al., 2015; CONIGLIARO et al., 2015). O microambiente contém fatores e tipos celulares, como células imunes, estromáticas e endoteliais, que influenciam na progressão do câncer. Células neoplásicas e não neoplásicas interagem através da excreção de exossomos. A infiltração de neutrófilos promove formação tumoral e metástase (ONO et al., 2014). Apesar das células tumorais liberam exossomos para reprogramar as células ao redor para serem tumor-permissivas, exossomos produzidos por células do sistema imunológico têm efeitos opostos. Assim, nas fases iniciais do câncer, o sistema imune do hospedeiro pode reprimir a progressão do tumor ativando vias supressivas (BRINTON et al., 2015).

Apesar das funções das muitas funções exossomais na progressão tumoral, estudos relatam que essas nanovesículas também são capazes de auxiliar. É possível ser um meio bastante funcional na administração de fármacos quando bem utilizados na bioengenharia. Além de pequenos, podem ultrapassar várias barreiras e são facilmente manipulados. Exossomos podem ser modificados e direcionados às células cancerígenas carregando drogas efetivas, e obter sucesso no tratamento (MASHOURI et al., 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Sua capacidade de transferir materiais genéticos favorece a projeção de vesículas para a terapia gênica. O material pode ser compactado em exossomos e transfectado de células ou também através de fusão genética de polipeptídios com proteínas. É possível também outros meios de abordagem passiva. A eficiência do encapsulamento depende da quantidade de material que visa ser transportado para o interior da célula (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019).

2.4 ENSAIO DE ENSAIO DE MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÃO DE GALINHA (CAM)

O embrião de galinha tem sido utilizado para estudos desde a época de Aristóteles, mas foi em 1911 o primeiro relato do uso de ensaio de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM), pelos cientistas Rous e Murphy. A utilização do modelo de CAM possui inúmeras vantagens, a começar com a disponibilidade e fácil visualização dos embriões, o que o tornou um procedimento clássico. Este ensaio pode ser utilizado não só para visualização vascular, mas também em bioengenharia, desenvolvimento de vacinas, drogas e cosméticos, pesquisas oncológicas, terapias vaso oclusivas e biologia de transplantes. Porém, apesar da falta de imunidade, o modelo não suporta implantes de tecidos ricos em linfócitos, nem implantes derivados da medula óssea, o que é considerado uma limitação. Existem variações de protocolos experimentais, mas todos incluem injeção intravenosa ou aplicação direta de material para teste na CAM (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

A membrana corioalantóide, é uma membrana extraembrionária altamente vascularizada que envolve o embrião em desenvolvimento. Formada pela fusão do córion (membrana mais externa, permite trocas gasosas) com o alantoide (derivado do saco vitelino, serve para armazenar resíduos urinários e mediar trocas de gases e nutrientes).

Do desenvolvimento da CAM, entre os dias 4 e 5 é formado o corioalantóide. Entre os dias 5 e 6 o plexo capilar respiratório começa a se formar por angiogênese e vasculogênese. Nos dias 8 a 10 a CAM é totalmente desenvolvida e está pronta para brotar em resposta a estímulos pró-angiogênicos. Até o dia 11 ou 12 o sistema de vasos sanguíneos da CAM é altamente angiogênico. No dia 12 a CAM envolve completamente o embrião. Até o 17º dia embrionário, este modelo é naturalmente imunocompetente, o que permite o enxerto de diferentes células.

Mesmo com a clara diferença entre as espécies, um artigo publicado pelo International Chicken Genome Sequencing Consortium destacou semelhança entre o genoma humano e do frango, provando que 60% dos genes de frango têm contrapartes em humanos (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

No ensaio padrão, é realizada a aplicação de substância ou enxerto na CAM do ovo incubado através de uma janela criada nele. Após esse implante, o ovo é selado e, posteriormente, é realizada coleta do material para análise química ou histológica (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Apesar da variação dos protocolos, a maioria deles se inicia com incubação a 39,4°C e posteriormente cai para 37,5°C. O enxerto é colocado geralmente no dia 7, que é quando o crescimento começa a diminuir, anteriormente as células da CAM ainda estão proliferando rapidamente. Mas deve-se atentar para a linhagem dos ovos utilizada, pois pode haver variação de 12 a 18 horas na idade do desenvolvimento embrionário (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

O resultado do teste depende não só das condições utilizadas, mas também do modo de inserção e localização do enxerto na CAM. Existem estágios embrionários mais adequados para diferentes tipos de teste pois é possível encontrar vasos de diversos tamanhos devido à variação da vascularização de acordo com o período (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Para a avaliação angiogênica ser mais objetiva, a realização do enxerto deve ser preferencialmente no dia 7 da incubação, pois, as áreas entre os grandes vasos são menos vascularizadas, o sistema imunológico não está desenvolvido e o microambiente está adequado para a sobrevivência, desenvolvimento e ganho de vasos por enxertos angiogênicos (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Outra possibilidade é realizar o ensaio em ovos sem casa. Esse procedimento é chamado ensaio ex ovo e envolve a transferência do conteúdo do ovo, ainda em estágio inicial (entre os dias 2 e 3), para outro recipiente (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Tanto no protocolo in ovo quanto ex ovo, existem diferenças no uso de placas e recipientes, mas os mesmos procedimentos podem ser desenvolvidos. O método in ovo possui vantagens como melhor visibilidade, aplicação em diferentes locais, múltiplas manipulações e monitoramento de lapso de tempo. Porém, exige controle mais rigoroso na incubação devido ao maior risco de infecção e tem significativa taxa de mortalidade. A eluição de proteínas pode ser um problema por poder levar à contaminação do pool de proteínas por proteínas não específicas (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Huang et al. descreveu recentemente um novo modelo, utilizando uma casca de ovo transparente, artificial. A avaliação dos vasos da CAM foi melhorada através desse método pois possui diferentes câmaras e é possível injetar e triar reagentes em cada uma delas e observar em microscópio (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

No modelo de CAM a visualização e avaliação do padrão vascular é a etapa mais difícil do ensaio. A quantificação da angiogênese pela aparência é variável. É difícil distinguir neovascularização e vasodilatação ou inibição e vasoconstrição. Algumas opções para a visualização dos vasos da CAM são imuno-histoquímica, injeção intravenosa de dextranos fluorescentes, ressonância magnética e PET, microscopia eletrônica de varredura ou tomografia Doppler (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

A membrana corioalantóide é comumente usada com enxerto de células tumorais para avaliar o potencial angiogênicos e tem uma série de vantagens e algumas limitações, apresentadas no Quadro 2. Serve como bom indicador das

propriedades anti/pró-angiogênicas, analisa o potencial angiogênico e permite a quantificação. Também em transplante de tecidos, testes toxicológicos e farmacológicos, e como modelo *in vivo* para triagem de terapias. Os modelos CAM permitem identificar etapas individuais da cascata metastática onde moléculas específicas ou processos bioquímicos manifestam seu envolvimento funcional. Esse método foi introduzido por Judah Folkman em 1974 e pode ser realizado tanto em modelo de frango quanto codornas.

Quadro 2: Vantagens e limitações do modelo de CAM (adaptada de (LOKMAN et al., 2012)).

Vantagens	Limitações
Ensaio experimental curto (dias)	Período curto de observação (dias)
Baixo custo	Rápidas mudanças morfológicas
Facilmente reprodutível e alto rendimento	Anticorpos limitados para caracterização
Sistema fechado - permite a avaliação de pequenas quantidades de agentes terapêuticos	
Naturalmente imunodeficiente	
Múltiplos testes por CAM individual	
Permite triagem em larga escala	
Biologia e fisiologia bem conhecidas	
Disponibilidade de imagem <i>in vivo</i>	
Permite a visualização direta	
Os animais não precisam ser restringidos	
Pode ser usado com linhas primárias de células humanas	

2.4.1 Avaliação Angiogênica de células tumorais em Ensaio de CAM

A angiogênese do câncer é semelhante à angiogênese fisiológica e envolve a formação de novos vasos sanguíneos através da proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais usando estruturas vasculares pré-existentes. Os três estágios do câncer são: avascular, vascular e metastático. A angiogênese é essencial para o crescimento descontrolado de tumores. No estágio avascular, o tumor obtém nutrientes e oxigênio necessários para o crescimento por difusão passiva (LOU et al., 2017).

A capacidade da CAM para apoiar o crescimento de células tumorais xenogênicas inoculadas facilita a análise da metástase de células tumorais humanas. A angiogênese desempenha papel crucial no crescimento, invasão e metástase do tumor. Durante a progressão do câncer, esses vasos nutrem o tumor e podem disseminá-lo para outros pontos. Para avaliar a progressão tumoral é acompanhada a angiogênese e a secreção de enzimas.

Células tumorais podem ser enxertadas na CAM da galinha e desenvolver tumor vascularizado. A maneira como a implantação do tumor é feita depende do tipo de tumor. Geralmente no décimo dia embrionário é realizado o enxerto de tumor. É feito também o monitoramento diário dessas células em meio de cultura isento de soro durante 7 a 8 dias. Após esse mesmo período, em E17 o E18, é realizada a análise da CAM. Os embriões eclodem em torno do dia 21, portanto, recomenda-se não exceder o dia 18 para testes experimentais (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Tumores altamente angiogênicos crescem bem nos dias 3 e 4 após implantação. Em tumores altamente metastáticos, nódulos tumorais estão invadindo profundamente o tecido CAM e são cercados por vasos sanguíneos. Amostras de tumor da CAM podem ser analisadas por métodos como qPCR, Western blot, marcação imunológica, etc. (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

Outra variante é o ensaio de metástases, que pode ser utilizado para apontar metástases espontâneas ou experimentais após injeção intravenosa de células

tumorais na veia corioalantóica. O que permite o estudo da disseminação de células tumorais através da vascularização (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o papel angiogênico de exossomos isolados de linhagens celulares células de mama em modelo experimental de angiogênese *in vitro* utilizando células HUVEC em gel de fibrina e padronizar o modelo de membrana corioalantóide de galinha (CAM) para estudo futuros *ex-vivo* de angiogênese com os exossomos isolados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar as linhagens de mama e coletar o meio condicionado;
- Padronizar um protocolo para isolamento de exossomos dos meios condicionados de células de mama e caracterizá-los quanto ao tamanho, quantidade e presença de um marcador (tetraspanina) de membrana;
- Tratar células HUVEC com os exossomos isolados e analisar a formação de vasos em gel de fibrina;
- Padronizar o ensaio de membrana corioalantoide de embrião de galinha (CAM) e as análises histológicas visando o futuro teste dos exossomos isolados das diferentes linhagens de mama.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Os animais utilizados no presente estudo foram embriões de galinha (*Gallus gallus domesticus*) (Figura 1), obtidos no Departamento de Reprodução da FMVZ, aprovados pela Comissão de Ética da FMVZ-USP nº7979130916.

Figura 1 – Embriões de galinha com 11 dias de desenvolvimento

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

4.2 ENSAIOS DE MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE EMBRIÃO DE GALINHA

Os testes para a padronização da metodologia que será utilizada em posterior avaliação angiogênica dos meios de cultivo foram realizados com sete amostras de embriões de galinha.

Ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) foram adquiridos em E0 (E: dia embrionário), esterilizados com solução 70% etanol e incubados a 37,5°C e 70% umidade relativa em incubadora apropriada. Em E3 os ovos foram abertos e devolvidos à incubadora nas mesmas condições e mantidos até E11(Figura 2).

Figura 2 – Embriões de galinha em E11 abertos na incubadora

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

Foram retiradas quatro amostras da membrana corioalantóide de cada embrião em E11 para processamento histológico (Figura 3). O experimento foi testado com dois tempos distintos de fixação em PFA 4%: 5 horas e 24 horas, que serão descritos a seguir.

Figura 3 – Amostra de CAM retirada de embrião em E11 mostrando a rede vascular formada

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

As amostras após serem fixadas em PFA 4% por 5 ou 24 horas foram lavadas em PBSA, seguidas de desidratação em etanol. A desidratação foi realizada em uma sequência de concentração crescente de álcoois. Posteriormente foi realizado a diafanização em xilol e seguinte a esses passos as amostras foram embebidas em parafina para serem emblocadas. Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica, German) com a espessura de 5 μ m, aderidos às lâminas histológicas, colocados em estufa para desparafinização a 60°C e corados pela utilização da técnica de hematoxilina e eosina.

As imagens para análise morfológica foram obtidas em microscópio de luz Nikon Eclipse 80i, do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem FMVZ-USP.

4.3 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA CÉLULAS DE MAMÍFEROS

- Meios de cultura: DMEM: (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). DMEM F12 suplementado com insulina, toxina colérica, EGF, hidro cortisona, sofo fetal de cavalo.
- Soluções: Solução salina: PBSA ("Phosphate Buffered Saline" – sem cálcio e magnésio), solução salina tamponada pH 7.2, composta por NaCl 140mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1.5mM. Tripsina: solução 0.1% de tripsina (Gibco) em PBSA contendo EDTA 1mM pH 8.0).
- Suplementos: Soro fetal bovino: SFB (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). Soro fetal cavalo: SFC (ThermoFisher Scientific, USA). Ampicilina: Concentração utilizada: 25mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Estreptomicina: Concentração utilizada: 10mg/mL (Sigma-Aldrich). Hidrocortisona: Concentração utilizada: 5mg/mL (Fisher Scientific, USA). Insulina: Concentração utilizada: 10mg/mL (Sigma-Aldrich). Enterotoxina colérica: Concentração utilizada: 10µM (Sigma-Aldrich). EGF: Concentração utilizada: 20ng/mL (ThermoFisher Scientific, USA).

4.4 LINHAGENS CELULARES

MCF10A: linhagem celular epitelial não tumoral derivada de doença fibrocística mama humana (ATCC: CRL10317). A linhagem parental foi isolada de tecido primário da mama de uma mulher de 36 anos (SOULE et al., 1990). Foi doada pela Dra. Nathalie Cella.

Hs578T: linhagem celular epitelial derivada de um carcinosarcoma mamário humano (ATCC: HTB-126). A linhagem parental foi isolada de tecido primário da mama de uma mulher de 74 anos (HACKETT et al., 1977). Foi adquirida da ATCC.

HUVEC: culturas primárias de veia de cordão umbilical humana (*Human umbilical vein endothelial cells*) foram adquiridas da ATCC. Os ensaios foram realizados com as células no máximo em passagem 4.

4.5 CONDIÇÕES DE CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem não-tumorigênica de mama MCF10A foi cultivada conforme descrito por Soule e colaboradores (Soule et al., 1990) (Figura 4).

As linhagens de carcinoma mamário humano Hs578T foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina (Figura 4).

As células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) foram cultivadas em meio EBM2 Basal Medium (Lonza) com 10% SFB e suplementos EGM2 (Lonza) kit para os ensaios de formação de vasos.

As linhagens MCF10A e Hs578T foram cultivadas a temperatura de 37 °C em frascos plásticos descartáveis em atmosfera úmida de 2% CO₂/98% ar, para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células HUVEC foram mantidas na mesma temperatura, porém em atmosfera úmida de 5% CO₂/95% ar. Ao atingirem, aproximadamente, 80% da densidade de saturação as culturas celulares foram lavadas com PBSA e subcultivadas utilizando solução de tripsina. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo completo contendo SFB e 10% DMSO (dimetilsufóxido estéril) a -190 °C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

Figura 4 – Linhagens de células de mama não maligna MCF10A e maligna Hs578T

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P.,2017).

Todas as linhagens utilizadas neste estudo foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma* spp., por reação de PCR com *primers* específicos, conforme protocolo determinado no laboratório NUCEL/FMUSP.

4.6 ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS

Células HS-578T e MCF10A foram cultivadas em suas condições de cultivo específicas até atingirem 90% da confluência, quando, então, o meio de cultivo contendo SFB foi descartado, as células foram lavadas com PBSA e adicionado meio de cultivo sem SFB. Após 48h de cultivo na ausência de SFB, o meio condicionado (MC) foi coletado, centrifugado a 400xg e armazenado a -80°C até o momento de isolamento dos exossomos.

Para o isolamento dos exossomos, os meios condicionados foram descongelados em gelo e submetidos a dois protocolos de isolamento de exossomos descritos a seguir para comparação da melhor eficiência.

Primeiramente, 50mL de MC coletado para cada tipo de linhagem celular foi filtrado em filtro 0,22µm previamente lavado com 10mL de PBSA. Em seguida, o volume foi centrifugado a 2.000xg por 15 minutos a 4°C, para retirada dos debris celulares, e o sobrenadante foi coletado em tubos eppendorf de 2 mL. 25 tubos contendo 2 mL de MC foram centrifugados a 16.000 xg por 40 minutos a 4°C para

retirar possíveis organelas como mitocôndrias e lisossoma, e o sobrenadante foi coletado em um tubo falcon de 50mL para, então, ser ultrafiltrado e concentrado. O MC foi ultrafiltrado em filtro Amicon Ultra-15 10K que foi previamente lavado com 10mL de água miliQ e centrifugado a 3000 xg por 10 minutos. Para concentração foram adicionados 15 mL de MC e centrifugado em rotor Swinging a 3000 xg por 10 minutos e o procedimento foi repetido até completar os 50mL. O volume permeado foi coletado em um novo tubo falcon e o volume retido foi de 1mL resultando numa concentração de 50 vezes. O volume concentrado foi dividido em duas alíquotas de 500uL para teste de dois protocolos:

- Protocolo 1- Ultracentrifugação (UC) uma amostra foi levada para ultracentrifugação por 3 h a 100.000 xg em ultracentrífuga Beckman Coulter MAX-XP em tubos de 1 mL e, após esse período, o pellet contendo os exossomos foi ressuspensionado em 120 uL de PBSA e armazenado para futuras análises.
- Protocolo 2- Ultracentrifugação + Kit TEI (UC+TEI): a outra alíquota foi incubada com 250uL do reagente do *Total Exosome Isolation Kit TEI* (Invitrogen) overnight a 4°C, e então centrifugada a 10000 xg por 1h, e o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 300uL de PBSA, e, em seguida, ultracentrifugadas, conforme descrito anteriormente.

Para avaliar a recuperação de exossomos foram realizados diferentes caracterizações descritos nos itens a seguir.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE EXOSSOMOS

Após serem isoladas do meio condicionado pelas células, as amostras de exossomos obtidas e ressuspensionadas em PBSA foram analisadas e quantificadas no aparelho Nanosight LM14C no Centro de Pesquisa do Hospital AC Camargo.

4.8 WESTERN BLOT

As proteínas presentes nas amostras foram tratadas com tampão de amostra 1X (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% de SDS, 10% glicerol, e 0.3% azul de bromofenol) em condição não-redutora (sem beta-mercaptoetanol) e desnaturadas à 99 °C por 5 min. As proteínas presentes nas amostras foram fracionadas por SDS-PAGE a 12%, sendo, em seguida, transferidas para membranas de nitrocelulose, por transferência úmida, em tampão contendo 0.3% de Tris-HCl, 1.44% de glicina, 0.1% de SDS e 20% metanol, por eletroforese à 100V por 2h à 4 °C. As membranas de nitrocelulose serão bloqueadas em solução de bloqueio StartingBlock PBS Solution (Pierce) acrescida de 0,05% Tween-20 overnight à 4°C em agitação. Após o bloqueio das membranas, as mesmas serão lavadas com PBSA contendo 0,05% Tween-20 e incubadas com o anticorpo monoclonal anticorpo anti-CD81 (Anti-TAPA1 antibody [M38] Abcam ab79559) na concentração de 1:1.000 por 1:30h à temperatura ambiente em agitação. Em seguida, as membranas serão lavadas quatro vezes em solução tampão PBSA contendo 0.1% de Tween-20 (v/v) por 5min cada, sob leve agitação. As membranas serão então incubadas por 2h com o anticorpo secundário anti-IgG de mouse conjugado à Horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich) na concentração de 1:2.000. Após a incubação, as membranas serão novamente lavadas como descrito acima, incubadas durante 5min à temperatura ambiente com o substrato Clarity Western ECL Substrate Kit (Bio-rad). Após a retirada do excesso de solução, as membranas serão fotodocumentadas com o sistema ImageQuant LAS4000 Mini (GE) e as imagens adquiridas com tempo de exposição de 5 minutos.

4.9 ENSAIO *IN VITRO* DE ANGIOGÊNESE: FORMAÇÃO DE VASOS EM GEL DE FIBRINA

Células HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) foram incubadas em microcarregadores (*beads*) Cytodex (GE Healthcare) hidratados em meio EBM2 + fatores de crescimento + 10% SFB na proporção de 400 células/microcarregador por 2 h. Em seguida, as células foram colocadas em garrafas não-aderentes e incubadas

à 37 °C *overnight* e 5% CO₂ / 95% ar em atmosfera úmida. O gel de fibrina foi preparado e adicionado em poços de placas de 24 poços. Após a formação do gel, as células semeadas nos microcarregadores foram adicionadas. Após 5 min, os diferentes meios de cultivo condicionados ou exossomos a serem testados foram adicionados. (Adaptado de NAKATSU, et al. 2003). As células foram documentadas todos os dias para análise da formação de vasos.

4.10 ENSAIO *EX-OVO* PARA ANGIOGÊNESE – ENSAIO CAM – MEMBRANA CORIOALANTÓIDE

No *CAM assay* foi utilizada a abordagem *ex-ovo*. Ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) foram adquiridos em E0 (E: dia embrionário), esterilizados com solução 70% etanol e incubados a 37,5 °C e 70-75% umidade relativa em incubadora apropriada, sem rotação e mantendo-se o eixo de simetria do ovo paralelo ao plano do chão. Para cada experimento, o número inicial de ovos variou de 3 a 6 dúzias. Em E3 os ovos foram abertos. Todos os embriões foram devolvidos à incubadora nas mesmas condições de incubação (37,5 °C, 70-75% umidade relativa) e mantidos por dez dias nessas condições. Em E13 foram adicionados papel filtro contendo os meios condicionados ou exossomos para análise da indução de angiogênese. As induções com os fatores foram de 48-72h sob as mesmas condições de incubação, chegando até o dia E15 ou 16. Nesse dia, as regiões contendo os implantes foram fixadas com solução 37% formaldeído, removidas do embrião e sua porção interna foi documentada com imagem obtida de estereomicroscópio (aumento de 8x) e analisada para determinar a percentagem de indução da angiogênese.

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

Para o isolamento dos exossomos foram utilizados dois diferentes protocolos com os meios condicionados durante 48 h coletados na ausência de SFB para as células de mama MCF10A não malignas e para Hs578T malignas, sendo isolados por ultracentrifugação apenas (UC) ou combinados o processo de ultracentrifugação com o isolamento com o kit TEI (UC+TEI).

As amostras foram analisadas no aparelho Nanosight em três leituras de 1 minuto cada, em diferentes campos para contagem das partículas existentes de acordo com o tamanho, o que representa replicatas conforme recomendação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV). Por esta análise ambos os protocolos foram eficientes mostrando o tamanho das partículas isoladas variando entre 50 e 150nm em ambos os protocolos (Figura 5), confirmando a presença de exossomos.

Figura 5- Gráficos obtidos da análise quantitativa de exossomos no Nanosight, de dois tipos de células de mama, MCF10A não maligna e Hs578T maligna, comparando os diferentes protocolos de isolamento Ultracentrifugação+Total Exosome Isolation Kit (UC+TEI) e apenas Ultracentrifugação (UC). É possível observar maior concentração de vesículas no tamanho estabelecido para exossomos (entre 50-150 nm)

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

A quantidade de exossomos isolados mostrou-se menor com a utilização o do protocolo 2 combinando Ultracentrifugação + TEI kit. Esse dado foi evidenciado claramente para a linhagem celular MCF10A. Para a linhagem Hs578T pode-se observar uma barra de erro, indicando uma diferença no segundo protocolo (Figura 6). A quantidade de exossomos isolados foi maior para a linhagem MCF10A em relação à linhagem Hs578T, mesmo utilizando-se o mesmo número de células (Figura 6).

Figura 6- Quantidade de partículas/mL (Exossomos) liberados pelas linhagens celulares MCF10A e Hs578T utilizando dois diferentes protocolos de isolamento Ultracentrifugação+Total Exosome Isolation Kit (UC+TEI) e apenas Ultracentrifugação (UC)

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

A presença de exossomos foi analisada nas amostras pela técnica de Western blot utilizado o anticorpo CD81, que marca proteínas presentes na superfície de exossomos (Figura 7). Foi observada a presença de exossomos nas amostras obtidas em ambos os protocolos de isolamento, e ausência no sobrenadante das mesmas, confirmando o sucesso do isolamento.

Figura 7- Western blot para exossomos isolados de células de mama MCF10 A e Hs578T utilizando o anticorpo anti-CD81. Amostras: 1- Marcador de Massa Molecular de Proteína (Protein Ladder); 2- Controle Negativo: Meio condicionado contendo SFB; 3- Exossomos isolados de células Hs578T com protocolo UC+TEI; 4- Sobrenadante da amostra 3; 5- Exossomos isolados de células Hs578T com protocolo UC; 6- Sobrenadante da amostra 5; 7- Controle Negativo: PBSA

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

5.2 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE VASOS EM GEL DE FIBRINA

Células HUVEC foram semeadas em microcarregadores e, então, foram adicionados em gel de fibrina após 18h para análise de formação de brotamentos (sprouting) de vasos após 6 dias. Este ensaio é dependente de um estímulo angiogênicos para a formação dos brotamentos após 6 dias. Foram testados três diferentes condições: Controle negativo sem adição de VEGF; Controle Positivo com adição de VEGF recombinante; e adição de exossomos isolados de células Hs578T (Figura 8).

Figura 8- Análise da formação de brotamentos de vasos em ensaio de gel de fibrina com células HUVEC. C-: Controle negativo sem adição de VEGF; C+: Controle Positivo com adição de VEGF recombinante; Exo: adição de exossomos isolados de células Hs578T. D0: Dia de adição dos microcarregadores contendo as células HUVEC no gel de fibrina; D6: 6 dias após a adição dos microcarregadores ao gel de fibrina. Setas indicam a formação de brotamentos. Aumento 40x

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

5.3 ENSAIO EM MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE EMBRIÃO DE GALINHA

A técnica de análise histológica da membrana corioalantoide de embrião de galinha foi padronizada neste trabalho visando os ensaios com os exossomos isolados das linhagens celulares de mama. Nas análises histológicas, foi possível observar detalhadamente na análise microscópica os vasos sanguíneos da membrana corioalantoide (Figuras 9 e 10). Ficando assim comprovado a eficácia da técnica para visualização angiogênica. Conforme citado anteriormente, foram testados tempos distintos da técnica para padronização. Como não houve significativa alteração entre os tempos, foi determinado o tempo de 5 horas para fixação da CAM para testes angiogênicos futuros com os exossomos isolados das células de mama.

Figura 9- Análise histológica de membrana corioalantóide de galinha fixada em PFA4% por 5 horas, corado com H&E. A e B: Embrião 1. C e D: Embrião 2. Setas: vasos sanguíneos

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

Figura 10- Análise histológica de membrana corioalantóide de galinha fixada em PFA4% por 24 horas, corado com H&E. A e B: Embrião 1. C e D: Embrião 2. Setas: vasos sanguíneos

Fonte: (RIBEIRO, M. F. P., 2019).

6 DISCUSSÃO

As células cancerígenas se comunicam com as células vizinhas por meio de exossomos ou outras vias para induzir o crescimento primário do tumor e o crescimento metastático. Os exossomos isolados de câncer são moléculas pró-tumorigênicas, contendo proteínas, DNAs, RNAs codificadores e não codificadores de proteínas (microRNAs, RNAs longos) e lipídios, que induzem a polarização de macrófagos, e tem a capacidade de suprimir ou ativar o sistema imunológico através da regulação de várias células imunológicas (OTHMAN, JAMAL, ABU, 2019), promovendo assim o crescimento e as metástases do câncer.

Sabe-se que exossomos são capazes de promover tanto o início do tumor quanto o processo metastático e desempenham papel na resistência terapêutica (LI; NABET, 2019; MASHOURI et al., 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Células tumorais tornam-se mais agressivas e se transformam funcional e morfológicamente para se tornarem mais invasivas. Quanto mais malignas as células, maior a probabilidade migratória para locais mais distantes, criando assim um nicho metastático. (MASHOURI et al., 2019). Sabemos também que o papel exercido pelos exossomos é relacionado com sua carga, e sua carga varia de acordo com a célula de origem. Li e Nabet relatam que podemos considerar a capacidade de exossomos derivados de células imunes de matar células tumorais (LI; NABET, 2019), outros estudos indicam que a eliminação de exossomos pode inibir a progressão tumoral (MASHOURI et al., 2019). Apesar do papel desempenhado na progressão tumoral, estudos relatam que exossomos também são capazes de auxiliar. É possível que ainda sejam um importante meio de administração de fármacos. Exossomos podem ser modificados e direcionados às células cancerígenas carregando drogas efetivas, e obter sucesso no tratamento (MASHOURI et al., 2019; VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019). Sua capacidade de transferir materiais genéticos favorece a projeção de vesículas para a terapia gênica (VAKHSHITEH; ATYABI; OSTAD, 2019).

Já é sabido a importância do papel da hipóxia no microambiente tumoral (WANG et al., 2015; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017), e diversos fatores de vias de sinalização e, principalmente, o fator HIF são ativados e levam à expressão

de uma série de fatores de crescimentos. Alguns trabalhos tem mostrado recentemente o papel de exossomos obtidos em processo de hipóxia na facilitação da angiogênese e na metástase de alguns tumores como o carcinoma de célula escamosa de esôfago (SALEM et al., 2016; MAO et al., 2019).

Neste trabalho nós demonstramos o isolamento de exossomos de células de linhagens de mama e câncer de mama triplo negativo, que são modelos de estudo. As células utilizadas foram: célula não maligna MCF10A (isoladas de doença benigna) e célula maligna Hs578T. Realizamos dois diferentes protocolos e mostramos que o protocolo envolvendo apenas ultrafiltração seguido por ultracentrifugação foi mais efetivo quanto ao número de exossomos obtidos.

A literatura tem mostrado diferentes protocolos para o isolamento de exossomos com diferença em rendimentos (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013; ROCCO, BALDARI e TOIETTA 2016; SCHAGEMAN, et al., 2013). Entretanto há muitos desafios na quantificação de exossomos (Ramirez et al., 2018) e a literatura ainda é confusa quanto às medidas utilizadas devido à falta de informação na normalização dos dados da coleta dos meios. Diferentes técnicas como a ultracentrifugação, geralmente associada à concentração em gradientes de densidade de sacarose e precipitação de polímero, os métodos de imunoafinidade e os kits de extração de exossomos, são métodos amplamente utilizados para a produção de vesículas extracelulares.

Além disso, neste trabalho também foi possível analisar o papel angiogênico dos exossomos isolados de células de tumor de mama Hs578T, com alto potencial invasivo e metastático, utilizando o ensaio de formação de vasos com células da veia do cordão umbilical (HUVEC) em gel de fibrina. Após 6 dias de aplicação dos exossomos nas células embebidas no gel de fibrina foi possível visualizar brotamentos (sprouting), estruturas que indicam a presença da formação de vasos. Novos experimentos são necessários para melhor caracterização dos mesmos, como imunofluorescência com o marcador CD31, por exemplo. Um trabalho anterior de O'Brien e colaboradores (2013) mostrou a formação de vasos em células endoteliais utilizando o kit V2a (TCS-Cellworks) durante 14 dias utilizando 10ug de exossomos isolados de células Hs578T apenas por ultracentrifugação. Entretanto, não é possível a comparação da quantidade de exossomos utilizados pelos dados apresentados

nesse trabalho de Obrien e no nosso, pois utilizamos $1,5 \times 10^6$ partículas, conforme mensurado no Nanosight.

Através do nosso estudo, também foi possível padronizar o ensaio de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM), que permitirá novos testes de angiogênese e análise de diferentes tratamentos com drogas de efeito antitumoral. O ensaio de CAM é extremamente importante para avaliação de angiogênese *ex-vivo* de forma a diminuir o uso de outros animais. Existem diferentes métodos descritos para este ensaio, nos quais alguns transferem o conteúdo do ovo para cascas receptoras artificiais ou novas cascas de outras espécies, ou recipientes plásticos. Entretanto, este experimento tem uma taxa de perda de 50%, o qual é dependente da temperatura, contaminação do ambiente e principalmente da qualidade do ovo embrionado, pois alguns embriões não se desenvolvem bem.

Nosso estudo demonstrou o papel angiogênico de exossomos isolados de células malignas de câncer de mama triplo negativo Hs578T, que pode ter um papel importante na modulação da angiogênese, no crescimento do tumor e na metástase. Entretanto, o conteúdo desses exossomos ainda não foi elucidado e muitas pesquisas ainda são necessárias para análise do seu conteúdo, entendimento do papel e função dessas partículas, que contém muitas proteínas e fosfoproteínas, RNAs codificadores e não codificadores de proteínas, lipídeos e outras moléculas.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível analisar o papel angiogênicos dos exossomos isolados de células malignas de câncer de mama Hs578T isolados pelo método de ultracentrifugação através da formação de brotamentos em células HUVEC após 6 dias em cultivo em microcarregadores em gel de fibrina.

Foi padronizado o modelo de membrana corioalantóide de galinha (CAM) e as técnicas histológicas visando estudo futuros *ex-vivo* de angiogênese com os exossomos isolados das linhagens de mama.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 464–478, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm2183>>.

AL-HUSEIN, B.; ABDALLA, M.; TREPTE, M.; DEREMER, D. L.; SOMANATH, P. R. **Anti-angiogenic therapy for cancer: An update Pharmacotherapy**, dez. 2012. .

ALBERT EINSTEIN SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA. Disponível em: <<https://www.einstein.br/especialidades/oncologia/exames-tratamentos/hormonioterapia-cancer-mama>>. Acesso em: 20 set. 2019.

ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K.; FUQUA, S. A. Histological and Biological Evolution of Human Premalignant Breast Disease. **Endocrine-related cancer**, v. 8, n. 1, p. 47–61, mar. 2001.

American Cancer Society. Disponível em: <cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acesso em: 5 set. 2019.

BAHMANI, M.; SHIRZAD, H.; SHAHINFARD, N.; SHEIVANDI, L.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Cancer Phytotherapy : Recent Views on the Role of Antioxidant and Angiogenesis Activities. p. 1–11, 2016.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3322/caac.21492>>.

BRINTON, L. T.; SLOANE, H. S.; KESTER, M.; KELLY, K. A. Formation and Role of Exosomes in Cancer. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 72, n. 4, p. 659–671, fev. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25336151>>.

Cancer Research UK. Disponível em: <cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>. Acesso em: 5 set. 2019.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249–257, 2000.

CONIGLIARO, A.; COSTA, V.; LO DICO, A.; SAIEVA, L.; BUCCHERI, S.; DIELI, F.; MANNO, M.; RACCOSTA, S.; MANCONE, C.; TRIPODI, M.; DE LEO, G.; ALESSANDRO, R. CD90+ Liver Cancer Cells Modulate Endothelial Cell Phenotype through the Release of Exosomes Containing H19 LncRNA. **Molecular cancer**, v. 14, p. 155, ago. 2015.

DIMOVA, I.; POPIVANOV, G.; DJONOV, V. Angiogenesis in cancer – general pathways and their therapeutic implications. v. 19, n. 1, p. 15–21, 2014.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>>.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

Hospital do Câncer de Barretos. Disponível em: <<https://www.hcancerbarretos.com.br/cancer-de-mama>>.

Instituto Nacional do Câncer INCA, 2016. Disponível em: <<https://inca.gov.br>>

Instituto Nacional do Câncer, 2019. Disponível em: <<https://inca.gov.br/numeros-de-cancer>>

LI, I.; NABET, B. Y. Exosomes in the Tumor Microenvironment as Mediators of Cancer Therapy Resistance. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 32, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30823926>>.

LOBBA, A. R. M. **Presença de marcadores de células-tronco em linhagens celulares humanas de câncer de mama: possível valor em diagnóstico, prognóstico e terapia**. 21-02-2014. 195 f. Tese – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 28-04-2014.

LOKMAN, N. A.; ELDER, A. S. F.; RICCIARDELLI, C.; OEHLER, M. K. Chick

Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. p. 9959–9970, 2012.

LOU, W.; LIU, J.; GAO, Y.; ZHONG, G.; CHEN, D.; SHEN, J.; BAO, C.; XU, L.; PAN, J.; CHENG, J.; DING, B.; FAN, W. MicroRNAs in Cancer Metastasis and Angiogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n. 70, p. 115787–115802, 11 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29383201>>.

MAO, Y.; WANG, Y.; DONG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, C.; ZHANG, Q.; YANG, S.; CAO, L.; ZHANG, X.; LI, X.; & FU, Z.. Hypoxic exosomes facilitate angiogenesis and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma through altering the phenotype and transcriptome of endothelial cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **volume 38**, Article number: 389 (2019).

MASHOURI, L.; YOUSEFI, H.; AREF, A. R.; AHADI, A. M.; MOLAEI, F.; ALAHARI, S. K. Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 75, 2 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30940145>>.

NALL, R. **Medical News Today**. Disponível em: <medicalnewstoday.com/articles/323648.php>. Acesso em: 5 set. 2019.

NIH National Cancer Institute. Disponível em: <cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 5 set. 2019.

NISHIDA, N. Angiogenesis in cancer. v. 2, n. 3, p. 213–219, 2006.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; ALITALO, K.; ALLEN, E.; ANISIMOV, A.; APLIN, A. C.; AUERBACH, R.; AUGUSTIN, H. G.; BATES, D. O.; VAN BEIJNUM, J. R.; BENDER, R. H. F.; BERGERS, G.; BIKFALVI, A.; BISCHOFF, J.; BÖCK, B. C.; BROOKS, P. C.; BUSSOLINO, F.; CAKIR, B.; CARMELIET, P.; CASTRANOVA, D.; CIMPEAN, A. M.; CLEAVER, O.; COUKOS, G.; DAVIS, G. E.; DE PALMA, M.; DIMBERG, A.; DINGS, R. P. M.; DJONOV, V.; DUDLEY, A. C.; DUFTON, N. P.; FENDT, S.-M.; FERRARA, N.; FRUTTIGER, M.; FUKUMURA, D.; GHESQUIÈRE, B.; GONG, Y.; GRIFFIN, R. J.; HARRIS, A. L.; HUGHES, C. C. W.; HULTGREN, N. W.; IRUELA-ARISPE, M. L.; IRVING, M.; JAIN, R. K.; KALLURI, R.; KALUCKA, J.; KERBEL, R. S.; KITAJEWSKI, J.; KLAASSEN, I.; KLEINMANN, H. K.; KOOLWIJK, P.; KUCZYNSKI, E.; KWAK, B. R.; MARIEN, K.; MELERO-MARTIN, J. M.; MUNN, L. L.; NICOSIA, R. F.; NOEL, A.; NURRO, J.; OLSSON, A.-K.; PETROVA, T. V.; PIETRAS, K.; PILI, R.; POLLARD, J. W.; POST, M. J.; QUAX, P. H. A.; RABINOVICH, G. A.; RAICA, M.; RANDI, A. M.; RIBATTI, D.; RUEGG, C.; SCHLINGEMANN, R. O.; SCHULTE-MERKER, S.; SMITH, L. E. H.; SONG, J. W.; STACKER, S. A.; STALIN, J.; STRATMAN, A. N.; VAN DE

VELDE, M.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; VERMEULEN, P. B.; WALTENBERGER, J.; WEINSTEIN, B. M.; XIN, H.; YETKIN-ARIK, B.; YLA-HERTTUALA, S.; YODER, M. C.; GRIFFIOEN, A. W. Consensus Guidelines for the Use and Interpretation of Angiogenesis Assays. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 425–532, ago. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29766399>>.

O'BRIEN, K.; RANI, S.; CORCORAN, C.; WALLACE, R.; HUGHES, L.; FRIEL, A. M.; MCDONNELL, S.; CROWN, J.; RADOMSKI, M. W.; O'DRISCOLL, L.. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *European Journal of Cancer*, May 2013 Volume 49, Issue 8, Pages 1845–1859.

ONO, M.; KOSAKA, N.; TOMINAGA, N.; YOSHIOKA, Y.; TAKESHITA, F.; TAKAHASHI, R.; YOSHIDA, M.; TSUDA, H.; TAMURA, K.; OCHIYA, T. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. v. 7, n. 332, p. 1–11, 2014.

OTHMAN, N.; JAMAL, R.; ABU, N.. Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. *Front. Immunol.*, 04 September 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02103>

OWEN, J. L.; MOHAMADZADEH, M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. **Frontiers in Physiology**, v. 4 JUL, n. July, p. 1–8, 2013.

PADUCH, R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. **Cellular Oncology**, p. 397–410, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13402-016-0281-9>>.

PARK, J. E.; TAN, H. Sen; DATTA, A.; LAI, R. C.; ZHANG, H.; MENG, W.; LIM, S. K.; SZE, S. K. Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1085–1099, 2010.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLÉN, L. A.; FLUGE, Ø.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A.-L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/35021093>>.

QIN, Y.; SUN, R.; WU, C.; WANG, L.; ZHANG, C. Exosome : A Novel Approach to Stimulate Bone Regeneration through Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924–1934, 8 jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.007>>.

RAMIREZ, M.I.; AMORIM, M.G.; GADELHA, C.; MILIC, I.; WELSH, J.A.; FREITAS, V.M.; NAWAZ, M.; AKBAR, N.; COUCH, Y.; MAKIN, L.; COOKE, F.; VETTORE, A.L.; BATISTA, P.X.; FREEZOR, R.; PEZUK, J.A.; ROSA-FERNANDES, L.; CARREIRA, A.C.O.; DEVITT, A.; JACOBS, L.; SILVA, I.T.; COAKLEY, G.; NUNES, D.N.; CARTER, D.; PALMISANO, G.; DIAS-NETO. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*. 2018 Jan 18;10(3):881-906. doi: 10.1039/c7nr08360b.

RAMJIAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited : Is there a role for combinations with immunotherapy ? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185–204, 2017.

RAPOSO, G., & STOORVOGEL, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138

ROCCO, G. D.; BALDARI, S.; & TOIETTA, G. (2016). Towards Therapeutic Delivery of Extracellular Vesicles : Strategies for In Vivo Tracking and Biodistribution Analysis. *Stem Cells International*, 2016. doi:10.1155/2016/5029619

SALEM, K. Z.; MOSCHETTA, M.; SACCO, A.; IMBERTI, L.; ROSSI, G.; GHOBRIAL, I. M.; MANIER, S.; ROCCARO, A. M.. Exosomes in Tumor Angiogenesis. Series: Methods In Molecular Biology > Book: Tumor Angiogenesis Assays2016 Protocol | DOI: 10.1007/978-1-4939-3999-2_3

SAÚDE, Ministério da; INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>

SCHAGEMAN, J., ZERINGER, E., LI, M., BARTA, T., LEA, K., GU, J., ... VLASSOV, A. V. (2013). The Complete Exosome Workflow Solution : From Isolation to Characterization of RNA Cargo. *BioMed Research International*, 2013. doi:10.1155/2013/253957

Sociedade Brasileira de Mastologia. Disponível em: <http://www.sbmastologia.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=901:como-interpretar-o-resultado-do-seu-laudo&catid=115&Itemid=707>.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P. E.; BORRESEN-DALE, A. L. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, set.2001.

TAMMELA, T.; ALITALO, K. Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 460–476, 2010.

THOMAS, S. N.; LIAO, Z.; CLARK, D.; CHEN, Y.; SAMADANI, R.; MAO, L.; ANN, D. K.; BAULCH, J. E.; SHAPIRO, P.; YANG, A. J. Exosomal Proteome Profiling: A Potential Multi-Marker Cellular Phenotyping Tool to Characterize Hypoxia-Induced Radiation Resistance in Breast Cancer. **Proteomes**, v. 1, n. 2, p. 87–108, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2227-7382/1/2/87/%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4029595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TORREGGIANI, E.; PERUT, F.; RONCUZZI, L.; ZINI, N.; BAGLIO, S. R.; BALDINI, N. Exosomes : Novel Effectors of Human Platelet Lysate Activity. v. 28, p. 137–151, 2014.

TUNG, J. J.; TATTERSALL, I. W.; KITAJEWSKI, J. Tips, stalks, tubes: Notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. 1–14, 2012.

VAKHSHITEH, F.; ATYABI, F.; OSTAD, S. N. Mesenchymal Stem Cell Exosomes: A Two-Edged Sword in Cancer Therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 2847–2859, 23 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31114198>>.

VIALARD, C. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. 2017.

VONG, S.; KALLURI, R. The Role of Stromal Myofibroblast and Extracellular Matrix in Tumor Angiogenesis. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1139–1145, 2011. Disponível em: <<http://gan.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1947601911423940>>.

WANG, Z.; DABROSIN, C.; YIN, X.; FUSTER, M. M.; ARREOLA, A.; RATHMELL, W. K.; GENERALI, D.; NAGARAJU, G. P.; EL-RAYES, B.; RIBATTI, D.; CHARLIE, Y.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; NOWSHEEN, S.; AMEDEI, A.;

NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, B.; YANG, X.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; ROSA, M.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; HALICKA, D.; MOHAMMED, S. I.; AZMI, A. S.; BILSLAND, A.; KEITH, W. N.; JENSEN, L. D. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S224–S243, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.01.001>>.