SÍLVIA GUEDES BRAGA CARDIM

**Vesículas extracelulares liberadas pelas células cancerosas modulam a
proliferação, morte e migração celular no melanoma humano?**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Nogueira de
Sousa Andrade

**São Paulo
2017**

SÍLVIA GUEDES BRAGA CARDIM

**Vesículas extracelulares liberadas pelas células cancerosas modulam a
proliferação, morte e migração celular no melanoma humano?**

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Nogueira de
Sousa Andrade

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cardim, Sílvia Guedes Braga

Vesículas extracelulares liberadas pelas células cancerosas modulam a proliferação, morte e migração celular no melanoma humano? / Sílvia Guedes Braga Cardim. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Luciana Nogueira de Sousa Andrade.

Descritores: 1.Melanoma 2.Vesículas extracelulares 3.Hipóxia 4.Terapêutica
5.Proliferação celular 6.Morte celular

USP/FM/DBD-285/17

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIA

Primeiramente gostaria de agradecer e dedicar esse trabalho a Deus, sem Ele nada é possível e para Ele nada é impossível! Muito obrigada Papai por sempre me escutar e me ajudar na minha caminhada. Obrigada por sempre me mostrar quais caminhos devo seguir e em nunca desistir dos planos que tens para mim.

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Roger Chammas por ter acreditado em mim na realização desse trabalho e pela oportunidade a mim concedida.

À minha orientadora Dra. Luciana Andrade, por todos os ensinamentos não somente na bancada, mas também por todas as discussões científicas que contribuíram bastante para o meu aprendizado.

À Tatiane, pela força e incentivo durante todo o mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

À direção do ICESP, por ter concedido toda a estrutura disponível para a realização desse trabalho.

A todos os funcionários que fazem parte do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP e aos professores e funcionários da faculdade de medicina da USP, pela força e apoio.

Aos antigos alunos que fizeram parte do laboratório, especialmente Flávia, Cristina, Carol Rosal, Camila Melo, Iara, Mariana, Karina, Ruana, por todos os momentos prazerosos que tivemos, todas as conversas relacionadas à ciência e à vida. Agradeço a Deus por ter conhecido pessoas tão especiais e espero que possamos manter a amizade ao longo de nossas vidas.

Aos grandes amigos que fiz durante o mestrado, não somente os já citados no parágrafo anterior, mas também aos que continuam no laboratório, Adalberto, Alexandre,

Mayara, Ana Roberta, Lizeth, Samir, agradeço e dedico esse trabalho a vocês e àqueles já mencionados no parágrafo anterior. Muito obrigada por todo apoio, força, incentivo e todo aprendizado não somente científico, mas também àqueles relacionados à vida. Sei que vocês já são grandes cientistas e que continuaram a brilhar onde quer que estejam.

Quero agradecer aos meus pais Sílvio e Teresa, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio não somente financeiro, mas também na realização dos meus sonhos. Muito obrigada mesmo, por todos os ensinamentos ao longo da vida, por me ensinar a buscar ser sempre um ser humano melhor e levar esses ensinamentos para onde quer que eu vá. Esse trabalho só foi possível graças a vocês! Por isso dedico também a vocês, amo-os infinitamente!

Aos meus irmãos Sérgio e Mônica, por todo apoio, força e incentivo que sempre me deram ao longo da vida. Deus realmente escolheu anjos para serem meus queridos amigos-irmãos, esse trabalho também é de vocês. Obrigada por todo carinho e amor, amo vocês!

Ao meu querido marido Rafael, por toda calma, paciência e amor. Obrigada por sempre me ouvir, por todas as horas (foram muitas) que pacientemente me ouvia falar sobre ciência. Amo-te muito e dedico esse trabalho também a você, o mesmo não seria possível sem todo apoio que me deste ao longo de todo esse trabalho.

Ao meu filho amado Sílvio, por todo amor! Muito obrigada meu Pequeno Bolinho de Leite por todos os sorrisos, brincadeiras, por ser minha fonte de inspiração. Você também me ensina a sempre ser uma pessoa melhor. Te amo pra sempre e pra você também dedico esse trabalho.

E por último gostaria de dedicar esse trabalho para todos os amantes da ciência que nunca deixaram de acreditar nos seus sonhos apesar de dificuldades que surgiram ao longo de suas jornadas.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”*

Renato Russo

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências : Associação Brasileira de Normas (ABNT, NBR 6023), 2017.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Conteúdo

1	INTRODUÇÃO	3
1.1	Melanoma.....	3
1.2	Vesículas extracelulares	7
1.3	Indutores de estresse celular: hipóxia e quimioterápicos.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Manutenção das células de melanoma humano SKMel37 em cultura.....	13
3.2	Depleção de vesículas extracelulares do SFB.....	14
3.3	Tratamento das células SKMel37.....	14
3.3.1	Padronização do tratamento com quimioterápico.....	14
3.3.2	Tratamento com TMZ	15
3.3.3	Exposição das células à hipóxia.....	15
3.4	Padronização do isolamento de VEs	15
3.4.1	Isolamento de VEs após submissão à hipóxia e normóxia	15
3.4.2	Isolamento de VEs após submissão ao tratamento com TMZ	16
3.4.3	Caracterização quanto ao tamanho e concentração das vesículas extracelulares.....	16
3.4.4	Lise das vesículas e quantificação do conteúdo protéico	17
3.4.5	Avaliação da internalização das vesículas pelas células de melanoma.....	17
3.5	Ensaio de proliferação, morte celular e migração	18
3.5.1	Proliferação e morte celular (VEs oriundas da hipóxia e normóxia e tratamento com TMZ)	18
3.5.2	Migração celular (VEs oriundas da hipóxia e normóxia).....	19
3.6	Análise Estatística	20
4	RESULTADOS.....	21
4.1	Células SKMel37 liberam vesículas extracelulares	21
4.2	Células SKMel37 incorporam vesículas extracelulares.....	21
4.3	Ensaio de isolamento e caracterização de VEs de células de melanoma humano secretadas em condições de normóxia ou hipóxia.....	23
4.4	Ensaio de migração, proliferação e morte celular após a adição de VEs oriundas de normóxia e hipóxia em células SKMel 37	27

4.5	Padronizações da concentração e tempo de incubação de células de melanoma humano com o quimioterápico Temozolomida (TMZ).....	33
4.6	Ensaio de proliferação e morte celular após adição de VEs oriundas de células SKMel 37 tratadas ou não com TMZ.....	37
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	43
7	BIBLIOGRAFIA	44

Figuras

Figura 1. Os “hallmarks” do câncer (adaptado de HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).....	3
Figura 2. Incidência e mortalidade de melanoma cutâneo (Adaptado de SCHADENDORF et al., 2015).	6
Figura 3. Função das VEs na comunicação intercelular (DESROCHERS et al., 2016).	10
Figura 4. Esquema da metodologia utilizada nesse trabalho.....	20
Figura 5. Imagens da incorporação das VEs obtidas do microscópio de fluorescência.	23
Figura 6. Quantidade de proteínas contidas nas VEs liberadas pelas células de melanoma após hipóxia..	24
Figura 7. Caracterização das VEs secretadas por células de melanoma em normóxia ou hipóxia pelo equipamento NanoSight.	26
Figura 8. (A) e (B) Análise da migração de células SKMel37 pelo aparelho Operetta.	29
Figura 9. (A) e (B) Análise da migração de células SKMel37 pelo aparelho Operetta. .	31
Figura 10. (A) e (B) Análise da proliferação de células SKMel37 após 24 e 48 horas de incubação com 50 µg de VEs oriundas das células condicionadas à normóxia e hipóxia por 24 horas (A) e 48 horas (B).	32
Figura 11. (A) e (B) Taxa de morte de células SKMel 37 após 24 e 48 horas de incubação com 50 µg de VEs oriundas das células condicionadas à normóxia e hipóxia por 24 horas (A) e 48 horas (B). ..	32
Figura 12. (A), (B) e (C). Avaliação da sensibilidade das células SKMel37 ao quimioterápico temozolamida.	34
Figura 13. Quantidade de proteínas das VEs liberadas pelas células tratadas ou não com TMZ.	35
Figura 14. (A) e (B). Caracterização das VEs controle e TMZ pelo equipamento NanoSight Malvern Instruments (Malvern, UK).	36
Figura 15. Análise da proliferação de células SKMel37 após tratamento com a TMZ..	38
Figura 16. Taxa de morte de células SKMel37 após tratamento com a TMZ.	38

Tabelas

Tabela 1. Caracterização das VEs em condição de hipóxia ou normóxia.....	24
Tabela 2. Caracterização das VEs na ausência e presença de TMZ.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

cm²: centímetro quadrado

et al: e outros

g: força centrífuga

h: horas

mg: miligrama

ml: mililitro

mM: milimolar

μM: micromolar

μg: micrograma

nm: nanômetro

rpm: rotações por minuto

VEs: vesículas extracelulares

v/v: volume por volume

RESUMO

Cardim SGB. Vesículas extracelulares liberadas pelas células cancerosas modulam a proliferação, morte e migração celular no melanoma humano? [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2017.

As células que compõem o tumor podem interagir entre si, através da liberação e incorporação de vesículas extracelulares, muitas vezes contribuindo para a progressão tumoral. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo observar se as vesículas extracelulares, como as microvesículas e os exossomos liberados pelas células cancerosas em condições de estresse celular, após quimioterapia e indução de hipóxia conferem alguma vantagem adaptativa às células tumorais. Nossos resultados mostram que vesículas liberadas por células de melanoma humano em hipóxia ou normóxia apresentam tamanho médio característico de exossomos e microvesículas e não modulam os processos de proliferação, morte e migração celular. As vesículas liberadas pelas células após tratamento com o quimioterápico temozolamida também apresentam tamanho característico de exossomos e microvesículas; em adição, o tratamento com a temozolamida induziu um aumento na secreção dessas vesículas pelas células de melanoma. A incubação das células tumorais com vesículas oriundas da terapêutica com a temozolamida aumentou a proliferação celular, conferindo vantagem proliferativa às células de melanoma humano.

Descritores: melanoma; vesículas extracelulares; hipóxia; terapêutica; proliferação celular; morte celular.

ABSTRACT

Cardim SGB. Extracellular vesicles released by cancer cells modulate the cell proliferation, death and migration in human melanoma? [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo”; 2017.

Tumor cells can interact with each other by releasing and incorporating extracellular vesicles, contributing to tumor progression. Therefore, the aim of this study was to evaluate if extracellular vesicles, such as microvesicles and exosomes, released by cancer cells under cell stress conditions like chemotherapy and hypoxia, induce an adaptive advantage to tumor cells. Our results show that vesicles shed by human melanoma cells under hypoxia, or normoxia exhibit the characteristic size of exosomes and microvesicles and do not modulate cell proliferation, death or migration. The vesicles released by melanoma cells after temozolomide treatment also showed the average size of exosomes and microvesicles; moreover, temozolomide treatment induced an increase in extracellular vesicles shedding by tumor cells. Incubation of tumor cells with vesicles released under temozolomide therapeutics caused an increase in cell proliferation, providing a proliferative advantage to human melanoma cells.

Descriptors: melanoma; extracellular vesicles; hypoxia; therapeutics; cell proliferation; cell death.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

As neoplasias surgem quando as células adquirem algumas propriedades que levam a um crescimento descontrolado devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em algumas vias moleculares (DIAZ-CANO, 2012). Dentre essas propriedades, incluem-se: sustentação dos sinais de proliferação celular; evasão de supressores tumorais; resistência à morte celular, replicação ilimitada, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase. Subjacentes a essas propriedades estão a instabilidade genética e mutação, promoção da inflamação tumoral, desregulação energética celular e evasão da resposta imune (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; Figura 1).

Figura 1. Os “hallmarks” do câncer (adaptado de HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Os melanomas são neoplasias malignas de melanócitos que têm apresentado aumento de incidência nas últimas décadas. Devido a essa situação e ao fato do melanoma quando metastático ser um dos seis tipos de cânceres que causa maior mortalidade, o mesmo tem despertado crescente interesse da comunidade científica (HOFF et al., 2013).

Os melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, infundíbulo, e na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e em leptomeninges. Os melanoblastos são células precursoras dos melanócitos e são de origem neuroectodérmica, que migram a partir da crista neural do embrião após duas a três semanas depois da fertilização. Uma vez na derme, os melanoblastos embrionários sofrem um processo de maturação e/ou diferenciação, originando células precursoras de melanócitos, tais como pré-melanócitos precoces e intermediários que na epiderme diferenciam-se completamente em melanócitos. Na epiderme, os melanócitos interagem com os queratinócitos, definindo as unidades de pigmentação da epiderme (HOFF et al; 2013; SCHADENDORF et al., 2015).

Na unidade de pigmentação, os melanócitos estão geralmente quiescentes devido a sua interação com os queratinócitos, porém essa interação é perdida em melanomas, o que leva a um estado replicativo. A radiação ultravioleta e a biossíntese de melanina podem contribuir também para a progressão do melanoma, pois ambas participam da produção de espécies reativas de oxigênio que geralmente estão envolvidas nos três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. As vias de reparo de DNA podem contribuir para o desenvolvimento do melanoma, através da aquisição de mutações carcinogênicas e na progressão da neoplasia mantendo as mutações que levam à metástase (HOFF et al; 2013).

As vias de transdução de sinais que geralmente sofrem alteração em melanomas incluem: via Wnt, associada à transição epitélio-mesênquima e translocação nuclear de β -catenina; perda da função de supressores tumorais como CDKN2A (do inglês, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* e PTEN (do inglês, *Phosphatase and Tensin Homolog*);

mutações somáticas em BRAF (do inglês, *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*; ativação constitutiva da via dependente de FGF-2 (do inglês, *Fibroblast Growth Factor 2*), associada à proliferação e migração celular; perturbação no controle de fosforilação de pRB (do inglês, *Retinoblastoma Protein*), levando à ativação constitutiva de E2F (do inglês, *Transcription Factor 2*) e à proliferação celular descontrolada; ativação de vias de sobrevivência celular com perda de sinalização de vias pró-apoptóticas (HOFF et al; 2013).

A exposição excessiva ao sol ainda é o maior fator de risco para o melanoma cutâneo, porém outros fatores podem contribuir para o aparecimento do mesmo, tais como pele clara, história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, nevo congênito (pinta escura) e o nevo displásico (lesões escuras da pele com alterações celulares pré-cancerosas (SAITO et al., 2015; INCA, 2016).

O melanoma pode se manifestar a partir da pele sem lesão ou com uma lesão pigmentada. Na pele sem lesão prévia pode surgir após o aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares acompanhada de coceira e descamação. Nos casos em que já existe uma lesão pigmentada pode ocorrer aumento no tamanho, alteração na coloração e na forma da lesão, que passa a apresentar bordas irregulares (INCA, 2016).

O prognóstico dessa doença pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos houve uma melhora na sobrevida dos pacientes devido à detecção precoce do tumor. O tratamento dependendo do estágio pode ser por radioterapia ou quimioterapia, mas geralmente o mais indicado é a cirurgia. Quando ocorre metástase, muitas vezes o melanoma é incurável, e dessa maneira seu tratamento serve para aliviar os sintomas do paciente (INCA, 2016).

A taxa de incidência desse tipo de tumor varia em diferentes populações, com altas taxas na Austrália e Nova Zelândia, chegando a sessenta casos por cem mil habitantes por ano

(Figura 2). No Brasil, o câncer de pele é bastante freqüente, embora o melanoma represente apenas três por cento dessa malignidade (SCHADENDORF et al., 2015; INCA, 2016).

Figura 2. Incidência e mortalidade de melanoma cutâneo (Adaptado de SCHADENDORF et al., 2015).

Existem vários mecanismos de resistência no melanoma: hiperativação dos sistemas de reparo do DNA; sistemas de efluxo de droga; aumento dos sinais de sobrevivência devido a alterações nas vias de PI3K/Akt, NF- κ B e Raf/MAPK, expressão alterada de alguns genes, tais como o tumor p53, RAS, BRAF e aumento da regulação de alguns fatores anti-apoptóticos como Bcl-2, survivina, Mel-IAP, FLIPs (HASSAN et al., 2016).

Um dos mecanismos não mencionado no parágrafo anterior, caracteriza-se pela comunicação entre as células vizinhas, através das vesículas extracelulares (SAITO et al.,

2015). Alguns estudos têm mostrado que os exossomas induzem alterações que contribuem para a angiogênese no melanoma, contribuindo para a disseminação do mesmo (HOOD et al., 2011). Hood et al. (2011) mostrou que exossomas liberados pelas células de melanoma prepararam linfonodos sentinela para a metástase tumoral.

Dessa maneira, observa-se que existe uma interação das vesículas extracelulares com as células do melanoma e que essa interação pode contribuir para a progressão tumoral.

1.2 Vesículas extracelulares

Os tumores apresentam-se geralmente de maneira heterogênea e são constituídos tanto por células malignas como por células estromais, que também contribuem para a progressão tumoral e resistência ao tratamento, uma vez que subpopulações celulares diferentes exibem sensibilidade diferencial à terapia. (SAITO et al., 2015; KAPLAN et al., 2005; DIAZ-CANO, 2012)

Além do componente celular, existem alguns fatores que contribuem para a heterogeneidade intratumoral, tais como a interação bidirecional entre as células tumorais e células do estroma, os mecanismos de transferência intercelular de informação genética através de vesículas extracelulares e os componentes ambientais como níveis de isquemia na massa tumoral (HOLLIDAY, 2006; DIAZ-CANO, 2012).

Em relação às vesículas extracelulares, sabe-se que as mesmas fornecem uma nova rota de comunicação entre as células cancerosas e várias células estromais que se infiltram no microambiente tumoral. As vesículas extracelulares são nanopartículas secretadas por vários tipos celulares e carregam materiais biológicos, medeiam a comunicação intercelular e estão envolvidas em processos secretórios, imunomodulação, coagulação e comunicação intercelular (AL-NEDAWI, 2008; HAN et al., 2017).

Em 1981, Trams et al. relatou que culturas de várias linhagens celulares neoplásicas e normais podiam secretar microvesículas. Durante a década de oitenta, dois laboratórios independentes experimentalmente demonstraram a liberação de pequenas vesículas por corpos multivesiculares de reticulócitos para o espaço extracelular, um processo que permite a externalização seletiva e liberação do receptor de transferrina. Mais tarde descobriu-se que as vesículas extracelulares não somente são produzidas por células de mamíferos, mas também estão presentes em organismos eucariotos inferiores e procarióticos (HAN et al., 2017).

Os tumores podem secretar uma população de vesículas extracelulares heterogênea que baseadas no mecanismo de formação, função e tamanho, podem ser divididas em exossomas, microvesículas e corpúsculos apoptóticos (GYÖRGY et al., 2011; D'ASTI et al., 2012; HAN et al., 2017).

Os exossomas são vesículas que variam de tamanho numa faixa de 30 a 150 nm de diâmetro e são gerados intracelularmente dentro de corpos multivesiculares, sendo que a secreção dos mesmos para o compartimento extracelular resulta na fusão da membrana dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática, que pode ser de maneira espontânea ou induzida (RAPOSO et al., 1996; HEIJNEN et al., 1999; THÉRY, OSTROWSKI & SEGURA, 2009; ARSCOTT e CAMPHAUSEN, 2011; ANDALOUSSI et al., 2013; RECORD et al., 2014; SILVA et al., 2015; HAN et al., 2017).

As microvesículas compreendem uma população heterogênea de vesículas maiores que os exossomas (diâmetro na faixa de 100 nm a 1 μ m) que são liberadas a partir da membrana plasmática. O processo de liberação parece ser controlado pelo influxo de cálcio e pela dinâmica da localização do citoesqueleto, resultando no “brotamento” de pequenas protrusões citoplasmáticas delimitadas por membrana sendo liberadas para o meio extracelular (MURALIDHARAN-CHARI, 2009; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010;

MARTINS et al., 2013; HAN et al., 2017). Os corpúsculos apoptóticos possuem diâmetro na faixa de 800 nm a 5 µm e são liberados apenas por células apoptóticas (HAN et al., 2017).

Essas vesículas extracelulares transportam lipídeos, proteínas solúveis e transmembranares, várias espécies de RNA e seqüências de DNA. A composição molecular das vesículas extracelulares varia dependendo do mecanismo de formação, assim como o tipo e estado funcional da célula de origem. Por exemplo, exossomas isolados de pacientes com câncer ovariano contêm antígenos específicos tumorais, como Her2/Neu e pacientes com melanoma, o Mart 1 (ANDRE et al., 2002; DESROCHERS et al., 2016).

Assim, após a liberação de sua célula de origem, muitas vesículas sofrem a ruptura da membrana, levando à liberação de sua carga para o meio extracelular. (TARABOLETTI et al., 2006; DESROCHERS et al., 2016). As vesículas extracelulares também podem ser internalizadas por células ditas receptoras através da sua interação com receptores da membrana plasmática, ou pela fusão com a membrana da célula ou ainda através do processo de endocitose (SVENSSON et al., 2011; CHRISTIANSON et al., 2013). Nesses casos, o conteúdo das vesículas é liberado no interior de células alvo, e assim podem interagir com a maquinaria de sinalização das mesmas (GRANGE et al., 2011), modulando diferentes processos biológicos como crescimento, migração e sobrevivência celular (DESROCHERS et al., 2013; Figura 3).

Figura 3. Função das VEs na comunicação intercelular (adaptado de DESROCHERS et al., 2016).

Algumas vesículas extracelulares podem ainda migrar para distâncias significantes por difusão, e assim entrar em fluidos biológicos, tais como fluido cérebro-espinhal, sangue, saliva e urina (VAN DOORMAAL et al., 2009). Isso permite que ocorram trocas de informações de longo alcance mediadas por essas vesículas, o que é bastante relevante no contexto da formação do nicho pré-metastático (PEINADO et al., 2012). Nesse sentido, o trabalho de Silva et al (2015) mostrou que os exossomas liberados pelas células tumorais no câncer de pâncreas iniciam a formação de um nicho pré-metastático no fígado.

Vários estudos vêm demonstrando que as vesículas extracelulares podem regular vários processos celulares, incluindo a proliferação celular e afetam vários estágios da progressão do tumor, incluindo a angiogênese, a degradação da matriz extracelular e a metástase (CAMUSSI et al., 2011; D'ASTI et al., 2012; VAN DOORMAAL et al., 2009; HAN et al., 2017).

Porém, um trabalho mais recente apresentou que as vesículas extracelulares, como os exossomas, podem agir diferentemente. Kamerkar et al. (2017) demonstrou que os exossomas inibiram a progressão tumoral em camundongos e aumentou significativamente a sobrevida total. Desde então, muitos grupos vêm demonstrando que o número de vesículas extracelulares circulantes está aumentado em pacientes portadores de diferentes tipos de tumor e as mesmas podem carregar marcadores que facilitem a eficácia do diagnóstico da doença. (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2008; BARAN et al., 2010; XU et al., 2017). O trabalho de Xu et al. (2017) relatou que a detecção de miR-145 em vesículas extracelulares na urina aumentou a eficiência do diagnóstico do câncer de próstata.

1.3 Indutores de estresse celular: hipóxia e quimioterápicos

Alguns fatores do microambiente tumoral podem induzir maior secreção de vesículas extracelulares e algumas evidências mostram que esse aumento pode contribuir para a progressão tumoral. Vários estudos mostram que as células liberam vesículas em resposta a diferentes tipos de estresse, tais como a hipóxia e a presença de drogas citotóxicas (WYSOCZYNSKI e RATAJCZAK, 2009; PAROLINI *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2012). Algumas descobertas recentes têm sugerido que o oncogene conhecido como fator indutor de hipóxia HIF- 1 α , por exemplo, pode desencadear a liberação de vesículas extracelulares por células cancerosas. O trabalho de King et al. (2012) demonstrou que HIF- 1 α é responsável por mediar a secreção de exossomas em células do câncer de mama, sendo esse processo então dependente de baixa pressão parcial de oxigênio. Outro estudo feito por Wang et al. (2012) observou que a hipóxia ativa o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e fornece um mecanismo potente para a vesiculação mediada por HIF em resposta à hipóxia.

Outros estudos mostram que quimioterápicos podem induzir um aumento na secreção de vesículas e que as mesmas seriam responsáveis pela aquisição de um fenótipo de resistência pelas células tumorais receptoras. Em câncer de próstata, por exemplo, a

resistência a docetaxel foi mediada por exossomos (Corcoran et al., 2012). Em linhagem de tumor de pulmão, A549, foi demonstrado uma diminuição na sensibilidade à cisplatina em resposta as vesículas secretadas durante o tratamento com esse quimioterápico (Xiao et al., 2012). Recentemente, Zeng et al. (2017) mostraram em glioblastoma que a resistência ao quimioterápico temozolomida foi mediada por exossomos secretados pelas células tumorais portadoras da fusão gênica PTPRZ1-MET e independente dos níveis da enzima MGMT. Esses estudos mostram que a comunicação intercelular no microambiente tumoral pode promover a sobrevivência das células tumorais em situações de estresse.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo observar se as vesículas extracelulares liberadas pelas células cancerosas em resposta a diferentes tipos de estresse, tais como a administração de uma droga citotóxica e condições de hipóxia são as responsáveis por conferir algum tipo de vantagem adaptativa como aumento de proliferação, resistência a drogas e/ou aumento de migração em células de melanoma humano.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar as vesículas extracelulares de células de melanoma humano submetidas à quimioterapia e hipóxia, quanto ao tamanho e quantidade produzida sob essas condições estressoras em relação à condição controle (ausência de droga e condição de normóxia).
2. Analisar a captura de vesículas extracelulares por células de melanoma através de microscopia de fluorescência.
3. Incubar células de melanoma com as vesículas oriundas das 2 situações acima discutidas, avaliando se as vesículas conferem à célula tumoral vantagens adaptativas, como maior capacidade de proliferação, migração e resistência à quimioterápicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção das células de melanoma humano SKMel37 em cultura

As células de melanoma humano cutâneo SKMel37 foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Sonia Nair Bao da Universidade de Brasília. Para a manutenção em cultura, as

células foram lavadas com a solução de fosfato-salino tamponado (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) pH 7.2 com 1 mM de ácido etilenodiamino (EDTA) e depois foi utilizada a enzima tripsina (Life Technologies) para a realização da desadesão celular da placa (Corning). Em seguida foi adicionado o meio mínimo essencial (MEM, do inglês *Minimum Essential Medium*, Life Technologies) em pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Life Technologies) para inativar a ação da tripsina e depois as células foram centrifugadas a 300 g por 4 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante das células foi retirado e as mesmas foram ressuspensas em meio de cultura MEM com 10% de SFB e em seguida 1/5 dessas células foram transferidas para novo frasco de cultura, no qual foi adicionado o meio MEM com a porcentagem de SFB já dita anteriormente. Depois, as células foram mantidas em uma estufa em atmosfera úmida a 37 °C contendo 5% de CO₂.

3.2 Depleção de vesículas extracelulares do SFB

O SFB foi centrifugado em ultracentrífuga (Beckman L8-80M) por 16 horas a 100.000 g a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado (filtro de 0,2 micras) a vácuo e posteriormente armazenado a -20 °C até o momento de uso.

3.3 Tratamento das células SKMel37

3.3.1 Padronização do tratamento com quimioterápico

Foi realizado o método do sal amarelo de tetrazolium [MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para avaliação da atividade metabólica da enzima succinato desidrogenase. Esse método colorimétrico é baseado na clivagem celular do sal MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, e o resultado é a formação de cristais insolúveis de formazam azuis escuros que é solubilizado com isopropanol ou outro solvente inorgânico. Logo, havendo maior existência de células vivas, existirá maior atividade dessa enzima e maior será a absorbância. As células foram plaqueadas (1×10^4) em placas de 96 poços (Corning) e, após 24 horas, foi adicionado o quimioterápico temozolamida (TMZ;

Sigma) ou DMSO (Sigma) no grupo controle. Foram avaliadas 8 concentrações de TMZ: 3 μ M, 9 μ M, 27 μ M, 81 μ M, 243 μ M, 360 μ M, 729 μ M, 1.000 μ M e 3 tempos diferentes de tratamento (24 horas, 48 horas e 72 horas). Após cada tempo, foi adicionado o sal MTT (na concentração de 0,5 mg/ml) em cada poço e em seguida cada placa foi colocada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após esse período, foi adicionado o tampão de solubilização (10% SDS, 10 mM HCl) em cada poço e a placa mantida na estufa por período de 16 horas. No dia seguinte, a leitura da absorbância foi realizada em espectofotômetro a 595 nm (equipamento Biotrack II Visible Plate Reader).

3.3.2 Tratamento com TMZ

Foram plaqueadas 2,5. 10⁶ células em um frasco de cultura de 150 cm² (Corning) e, após 24 horas, o meio foi trocado por meio acrescido de soro depletado de vesículas extracelulares e 360 μ M de TMZ. Após 72 horas de tratamento foi retirado o sobrenadante das células para ser feito o isolamento das vesículas secretadas por ultracentrifugação.

3.3.3 Exposição das células à hipóxia

As células foram plaqueadas na densidade de 5. 10⁶ células em um frasco de cultura de 75 cm² (Corning), conforme tópico referente à manutenção das células. No dia seguinte o meio foi trocado por meio acrescido de soro depletado de vesículas extracelulares e as células foram submetidas à hipóxia em câmara apropriada (H35 hypoxystation, Don Whitley Scientific Ltd., West Yorkshire, UK) a 1% de O₂ por 24 ou 48 horas. Ao final desse período, o meio foi coletado para isolamento das vesículas secretadas pelas células.

3.4 Padronização do isolamento de VEs

3.4.1 Isolamento de VEs após submissão à hipóxia e normóxia

Para separar as VEs secretadas pelas células SKMel37 após submissão à hipóxia, o sobrenadante das células foi coletado e inicialmente centrifugado a 300 g por 2 minutos à

temperatura ambiente. Após esse período de tempo, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante centrifugado em ultracentrífuga (Beckman L8-M-Ultra) a 30.000 g por 15 minutos à 4°C. Depois o *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado em ultracentrífuga a 100.000 g por 2 horas a 4°C. Finalmente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as VEs foi armazenado em PBS a -80°C até o momento de uso.

3.4.2 Isolamento de VEs após submissão ao tratamento com TMZ

Para separar as vesículas secretadas pelas células SKMel37 após o tratamento com a TMZ foi seguido o protocolo de Théry e colaboradores (2006). Após o tratamento, o sobrenadante das células foi coletado e centrifugado a 300 g por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, o sobrenadante foi centrifugado a 2.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente e então centrifugado em ultracentrífuga por 30 minutos a 10.000 g a 4 °C. Após esse período, o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 g por 2 horas a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em PBS filtrado e submetido nova ultracentrifugação (100.000 g por 2 horas a 4 °C). Nessa etapa, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, que contém as VEs, foi ressuspensionado em PBS e armazenado a -80 °C até o momento de uso.

3.4.3 Caracterização quanto ao tamanho e concentração das vesículas extracelulares

Após isolamento, as VEs foram diluídas em PBS na proporção de 1: 20 e rastreadas pelo equipamento NanoSight da Malvern Instruments (Malvern,UK). No equipamento foi mostrada a concentração de partículas por mililitros, a média do tamanho das partículas e a população mais frequente em relação ao tamanho. O equipamento funciona acompanhando e registrando o movimento browniano das partículas. Essa caracterização foi realizada no laboratório da Dra. Vilma Martins, no AC Camargo Cancer Center.

3.4.4 *Lise das vesículas e quantificação do conteúdo protéico*

Após o isolamento das vesículas extracelulares, foi feita a lise das mesmas para a quantificação do conteúdo protéico com tampão de lise NP40 (50 mM de Tris, pH 7.4, 250 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 50 mM de Na_3VO_4 , 0.02% de NaN_3 e 1% de Nonidet P40; Life Technologies) acrescido dos inibidores de protease PMSF (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*) na concentração de 1 mM e aprotinina (2 $\mu\text{g/ml}$). As amostras foram ressuspensas nesse tampão e, posteriormente, mantidas em gelo por 30 minutos. A amostra foi então centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior quantificação. Para a quantificação protéica foi utilizado o método do Ácido Bicinconínico (BCA) segundo instruções do fabricante. O método consiste em duas etapas, na primeira as proteínas reduzem o Cu^{2+} para Cu^{1+} em condições alcalinas, na segunda duas moléculas de BCA que é um reagente cromogênico específico para Cu^{1+} , reagem com um íon Cu^{1+} formando um complexo púrpura com absorvância de 562 nm. A absorvância é diretamente proporcional a quantidade de proteínas presentes nas amostras e pode ser estimada através da comparação com uma curva de concentração conhecida de proteínas, como a curva de albumina sérica bovina (BSA, do inglês, *Bovine Serum Albumin*). A leitura da reação colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro a 562 nm (Biotrack II Visible Plate Reader).

3.4.5 *Avaliação da internalização das vesículas pelas células de melanoma*

Após o procedimento de cultura celular, as células SKMel37 foram plaqueadas na densidade de aproximadamente 1.10^6 células por poço ($1,9 \text{ cm}^2$) contendo uma lâmina circular de 13 milímetros de diâmetro. As VEs foram incubadas com Dio (marcador fluorescente de membrana celular Vybrant Dio, Invitrogen/Life Technologies) na proporção de 1:200 e mantidas na estufa por 2 horas e então ultracentrifugadas por 2 horas a 100000 g e a 4 °C (Beckman L8-M-Ultra) A seguir, adicionou-se 30, 50 ou 100 μg de VEs nas células que

foram então incubadas por 2 horas a 37°C. O grupo controle recebeu somente Dio diluído em PBS. Ao término da incubação, as células foram lavadas e fixadas utilizando-se uma solução de paraformaldeído a 1% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o núcleo das células foi marcado com o marcador fluorescente Hoescht 33258 (na concentração de 25 µg/ml) durante 15 minutos a 37 °C. As lâminas foram montadas utilizando-se glicerol e PBS (na proporção de 1:1) e mantidas ao abrigo da luz até a análise. As análises foram realizadas no microscópio de fluorescência Eclipse E600 (Nikon, Japão), utilizando-se o software ACT-1 (Nikon, Japão) para captura da imagem.

3.5 Ensaios de proliferação, morte celular e migração

3.5.1 *Proliferação e morte celular (VEs oriundas da hipóxia e normóxia e tratamento com TMZ)*

Foram plaqueadas $3 \cdot 10^4$ ou 2×10^4 células por poço em uma placa de 24 poços (Corning) para a realização dos ensaios de proliferação e morte celular com as VEs provenientes do tratamento com a TMZ e hipóxia, respectivamente. Após 24 horas, 50 µg de VEs provenientes das células que foram submetidas à hipóxia ou normóxia por 24 e 48 horas ou 50 µg de VEs oriundas do tratamento com 360 µM de TMZ por 72 horas foram adicionadas nas células. Com relação à hipóxia e normóxia, após 24 e 48 horas, o sobrenadante das células foi retirado e em seguida as células foram lavadas com PBS, depois as mesmas foram destacadas das placas com tripsina e em seguida foram adicionadas aos seus sobrenadantes correspondentes. As amostras foram ressuspensas em meio de cultivo e a contagem do número de células foi realizada com azul de tripan (0,2 %) na câmara de Neubauer no microscópio convencional.

Para a avaliação da influência das VEs na resposta das células à TMZ, as células foram plaqueadas como descrito acima e incubadas com 360 µM de TMZ acrescido ou não de VEs de células previamente tratadas com TMZ por 72 horas. Nesse caso, 50 µg de VEs foram

adicionadas diariamente ao longo das 72 horas e, após esse período, foi realizado o mesmo procedimento descrito ao final do experimento de hipóxia e normóxia.

Para avaliação da morte celular, após incubação com as VEs como descrito acima, as células foram destacadas das placas e adicionadas ao respectivo sobrenadante e, então, centrifugadas a 300 g durante 4 minutos. O *pellet* formado foi ressuspensionado em etanol 70 % e mantido a -20 ° C por até 20 dias. A seguir, cada amostra foi centrifugada a 700 g por 5 minutos (centrífuga eppendorf Mod. 5415D), o etanol foi descartado e cada amostra foi lavada com PBS e submetida a centrifugação a 700 g por 5 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em solução de iodeto de propídeo (PI): PBS (pH 7.2); triton X-100 (0,1% v:v); RNase A (200 µg/ml; Life Technologies); iodeto de propídeo (20 µg/ml; Sigma). As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente protegidas da luz. Em seguida, a análise de morte celular foi realizada através da leitura de fluorescência em citômetro de fluxo (Attune, Life Technologies). A análise do percentual de células hipodiplóides foi realizada utilizando-se o software *Attune® Cytometric*.

3.5.2 Migração celular (VEs oriundas da hipóxia e normóxia)

As células foram plaqueadas na densidade de $7 \cdot 10^4$ células por poço (1,9 cm²) e, após 24 horas, 50 µg das VEs provenientes das células que foram submetidas à hipóxia e normóxia por 24 e 48 horas foram adicionadas nas células. Após a adição das VEs, a migração das células foi analisada ao longo de 16 horas utilizando-se o aparelho Operetta (Life technologies). Esse aparelho acompanha em tempo real o comportamento migratório das células.

Abaixo segue um esquema sobre os passos experimentais acima descritos.

Figura 4. Esquema da metodologia utilizada nesse trabalho.

3.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 4.0 para o Windows (*GraphPad Software*, San Diego California USA). Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (*One-way ANOVA*, *two-way ANOVA* seguido do pós teste de Bonferroni). Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações cujo valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Células SKMel37 liberam vesículas extracelulares

4.2 Para verificar se as células SKMel37 liberam vesículas extracelulares, o sobrenadante de uma cultura de 72 horas foi ultracentrifugado e o *pellet* ressuspendido em tampão de lise para quantificação protéica pelo método de BCA. A leitura da absorbância indicou a presença de proteína que foi de 1,635 mg de proteínas de VEs por 1.10^6 células no *pellet* contendo VEs, sugerindo que células SKMel37 liberam VEs em condições de cultivo. Células SKMel37 incorporam vesículas extracelulares

O próximo passo foi observar se as células SKMel37 internalizam as vesículas extracelulares. Para tal, as VEs foram marcadas com o corante lipofílico Dio. A Figura 5 mostra que as SKMel37 incorporam VEs e após a adição de 50 μg de VEs houve um aumento da captação dessas vesículas quando comparado a quantidade de 30 μg , porém não houve diferença entre 50 μg e 100 μg .

Controle (A)

30 μg (B)

50 μg (C)

100 μ g (D)

Figura 5. Imagens da incorporação das VEs obtidas do microscópio de fluorescência. O núcleo das células foi corado em azul com Hoescht e as VEs na região perinuclear e/ou citoplasma foram coradas em verde com Dio (aumento de 20 vezes). Em (A) controle, (B) células SKMel37 incubadas com 30 μ g de VEs, em (C) células 50 μ g de VEs, em (D) 100 μ g de VEs.

4.3 Ensaios de isolamento e caracterização de VEs de células de melanoma humano secretadas em condições de normóxia ou hipóxia

As células de melanoma humano SKMel37 foram mantidas em normóxia ou hipóxia por 24 e 48 horas e a quantidade protéica contida nas VEs secretadas nessas situações foram avaliadas. O resultado mostra que a hipóxia aumenta a relação entre quantidade de proteínas nas VEs por número de células. No tempo de 24 horas, embora o grupo controle tenha crescido mais comparado ao grupo da hipóxia, a quantidade de proteínas das vesículas liberadas pelas células controle foi menor do que o grupo da hipóxia, sugerindo a ocorrência de alterações na carga protéica carregada pelas vesículas nessa condição. No tempo de 48 horas, a quantidade de proteínas das vesículas liberadas pelas células em ambas situações foi menor comparado ao tempo de 24 horas e não houve diferença entre a situação de normóxia e hipóxia (Figura 6).

Figura 6. Quantidade de proteínas contidas nas VEs liberadas pelas células de melanoma após hipóxia. As células SKMel37 foram submetidas à hipóxia (1% de O₂) ou normóxia por 24 horas e 48 horas. Em seguida as VEs liberadas pelas células foram isoladas através de sucessivas centrifugações. A quantificação protéica foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

Em seguida foram realizados experimentos de caracterização dessas VEs oriundas da hipóxia e normóxia para verificar a concentração de vesículas por mililitros, a média do tamanho e a população mais frequente em relação ao tamanho. Os resultados encontram-se descritos na tabela abaixo e ilustrados nos gráficos subsequentes.

Tabela 1. Caracterização das VEs secretadas em condição de hipóxia ou normóxia.

	Normóxia 24h	Hipóxia 24h	Normóxia 48h	Hipóxia 48h
Partículas (VEs)/ml	7,04. 10 ⁷	7,425. 10 ⁷	6.59.10 ⁷	7,79. 10 ⁷
Média do tamanho	152 nm	145 nm	92 nm	158 nm
População mais frequente	115 nm	114 nm	116 nm	118 nm

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 7. Caracterização das VEs secretadas por células de melanoma em normóxia ou hipóxia pelo equipamento NanoSight. Em (A) VEs liberadas pelas SKMel37 mantidas em condições normais de oxigênio por 24 horas; em (B) hipóxia por 24 horas; em (C) normóxia 48 horas; em (D) hipóxia 48 horas.

Os resultados mostram que em todas situações analisadas as VEs são enriquecidas em exossomas e microvesículas com base no tamanho do diâmetro das mesmas, que variaram nas diferentes situações, apresentando médias de tamanhos de 152 nm na normóxia 24 horas, 145 nm na hipóxia 24 horas, 92 nm na normóxia 48 horas e 158 nm na hipóxia 48 horas, conforme apresentado na Tabela 1. Além disso, tanto em 24 como em 48 horas, a hipóxia induz um aumento na quantidade de VEs liberadas pelas células SKMel37. O próximo passo foi avaliar se essas VEs de diferentes situações modulam os processos de proliferação, morte e migração de células de melanoma humano conforme descrito a seguir.

4.4 Ensaios de migração, proliferação e morte celular após a adição de VEs oriundas de normóxia e hipóxia em células SKMel 37

Foram realizados experimentos de migração celular nos quais as células foram incubadas com 50 μ g de VEs liberadas pelas células em situações de hipóxia e normóxia e observou-se se as mesmas influenciam a migração celular. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos analisados, tanto no tempo de 24 horas como no tempo de 48 horas (Figura 8 A e B; Figura 9 A e B).

(A)

(B)

Figura 8. (A) e (B) Análise da migração de células SKMel37 pelo aparelho Operetta. Foram analisados o padrão de migração das células incubadas com 50 μ g de VEs oriundas da condição de 24 horas de normóxia (verde); das células incubadas com VEs advindas da condição de hipóxia por 24 horas (azul) e das células as quais não foram ofertadas VEs (vermelho). Em (A) cada ponto representa uma célula. Em (B) cada curva representa o deslocamento de cada grupo experimental ao longo do tempo de 16 horas.

(A)

(B)

Figura 9. (A) e (B) Análise da migração de células SKMel37 pelo aparelho Operetta. Foram analisados o padrão de migração das células incubadas com 50 μ g. VEs oriundas da condição de 48 horas de normóxia (verde); das células incubadas com VEs advindas da condição de hipóxia por 48 horas (azul) e das células as quais não foram ofertadas VEs (vermelho). Em (A) cada ponto representa uma célula. Em (B) cada curva representa o deslocamento de cada grupo experimental ao longo do tempo (16 horas).

Foram realizados experimentos de proliferação celular para observar se as VEs oriundas da hipóxia e normóxia por 24 e 48 horas exerceriam alguma influência no crescimento dessas células. Verificou-se que não houve diferença significativa quando as células foram incubadas com 50 μ g de VEs tanto da hipóxia quanto da normóxia por 24 e 48 horas (Figura 10 A e B).

Figura 10. (A) e (B) Análise da proliferação de células SKMel37 após 24 e 48 horas de incubação com 50 µg de VEs oriundas das células condicionadas à normóxia e hipóxia por 24 horas (A) e 48 horas (B). A contagem celular foi realizada com azul de Tripán na câmara de Neubauer (n=3). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. O teste estatístico utilizado foi o Two-Way Anova. C: controle; VN24: VEs liberadas por células mantidas 24 horas em normóxia; VH24: VEs liberadas por células mantidas 24 horas em hipóxia; VN48: VEs liberadas por células mantidas 48 horas em normóxia; VH48: VEs liberadas por células mantidas 48 horas em hipóxia.

Depois foi realizado o experimento de morte celular para observar se as VEs oriundas das situações de hipóxia e normóxia por 24 e 48 horas causariam alguma influência na morte das células. Verificou-se que não houve diferença em relação à morte celular quando as células foram incubadas com 50 µg de VEs oriundas tanto da hipóxia quanto da normóxia nos 2 tempos analisados (Figura 11 A e B).

Figura 11. (A) e (B) Taxa de morte de células SKMel 37 após 24 e 48 horas de incubação com 50 µg de VEs oriundas das células condicionadas à normóxia e hipóxia por 24 horas (A) e 48 horas (B). Foram analisadas as taxas de morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo no DNA e leitura em citômetro de fluxo. (n=3). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. O teste estatístico utilizado foi o Two-Way Anova. C: controle; VN24: VEs liberadas por células mantidas 24 horas em normóxia; VH24: VEs liberadas por células mantidas 24 horas em hipóxia; VN48: VEs liberadas por células mantidas 48 horas em normóxia; VH48: VEs liberadas por células mantidas 48 horas em hipóxia.

4.5 Padronizações da concentração e tempo de incubação de células de melanoma humano com o quimioterápico Temozolomida (TMZ).

O passo seguinte foi fazer uma análise da sensibilidade das células SKMel37 ao quimioterápico temozolamida através da avaliação da atividade metabólica da enzima mitocondrial succinato desidrogenase de células SKMel37 com diferentes concentrações de TMZ (3 μ M, 9 μ M, 27 μ M, 81 μ M, 243 μ M, 360 μ M, 729 μ M, 1.000 μ M) e diferentes tempos de tratamento (24 horas, 48 horas e 72 horas) pelo método MTT. De acordo com as Figuras 12 A, B e C, observou-se que a concentração de 360 μ M de TMZ (aproximadamente a concentração utilizada na clínica) resultou em pouco efeito na atividade metabólica dessas células. Como mencionado nos ensaios descritos abaixo, utilizou-se a concentração de 360 μ M de TMZ por ser uma concentração próxima ao utilizado na clínica e por não induzir morte celular significativa (dados não mostrados). Desse modo, evita-se a liberação de corpos apoptóticos juntamente com as VEs liberadas nessa situação, excluindo-se um fator de confusão nas análises dos experimentos abaixo.

(A)

Figura 12. (A), (B) e (C). Avaliação da sensibilidade das células SKMel37 ao quimioterápico temozolamida. Foram avaliadas diferentes concentrações da TMZ: 3 μ M, 9 μ M, 27 μ M, 81 μ M, 243 μ M, 360 μ M, 729 μ M, 1.000 μ M e sob diferentes tempos de incubação (24 horas, 48 horas e 72 horas) pela técnica do MTT (n=8). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. Isolamento e caracterização das VEs liberadas por células SKMel37 após tratamento com TMZ.

Nos próximos experimentos, foi realizado o isolamento das VEs segundo Théry *et al* (2006), o qual é composto de mais centrifugações, obtendo-se uma amostra de maior pureza e mais enriquecida em VEs. Nesse caso, o tratamento de células SKMel37 com 360 μ M de TMZ por 72 horas aumentou o conteúdo protéico no interior de VEs liberadas pelas células (Figura 13).

Figura 13. Quantidade de proteínas das VEs liberadas pelas células tratadas ou não com TMZ. As células SKMel37 foram submetidas ao tratamento com o quimioterápico temozolomida na concentração de 360 μ M por 72 horas. As VEs das SKMel37 foram isoladas através de sucessivas centrifugações e a extração de proteínas das mesmas foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA). C; grupo controle; TMZ: grupo tratado com temozolomida.

Em seguida, caracterizou-se as VEs oriundas do tratamento e sem tratamento para determinar a concentração de vesículas por mililitros, a média do tamanho dessas partículas e a população mais freqüente em relação ao tamanho, conforme a tabela abaixo e ilustrados nos gráficos subsequentes.

Tabela 2. Caracterização das VEs na ausência e presença de TMZ.

	Ausência de TMZ	360 μ M TMZ
Partículas/mL	206.10 ⁸	326.10 ⁸
Média de tamanho	202 nm	202 nm
População mais freqüente	233 nm	202 nm

(A)

(B)

Figura 14. (A) e (B) Caracterização das VEs controle e TMZ pelo equipamento NanoSight Malvern Instruments (Malvern, UK). Em (A) VEs controle (liberadas pelas SKMel37 sem tratamento por 72 horas); em (B) VEs TMZ (liberadas pelas SKMel37 mantidas sob tratamento com a TMZ por 72 horas).

Esses resultados demonstram que as VEs liberadas em ambas situações são enriquecidas em microvesículas apresentando mesma média de tamanho de 202 nm, tanto na

presença como na ausência de TMZ (Tabela 2). Na presença de TMZ, nota-se um aumento na concentração de VEs (partículas por mililitros) liberadas pelas células tratadas com TMZ conforme mostrado na Tabela 2.

4.6 Ensaios de proliferação e morte celular após adição de VEs oriundas de células SKMel 37 tratadas ou não com TMZ

O próximo passo foi realizar experimentos incubando as células com 50 μ g de VEs oriundas do tratamento por 72 horas com 360 μ M de TMZ e VEs controle (liberadas pelas células que não estavam sob tratamento) para observar se as mesmas exerceriam alguma influência na proliferação dessas células quando estivessem sob tratamento ou não. Como ilustrado na Figura 15, a adição de VEs secretadas por células previamente tratadas com TMZ ao meio de cultura induziu um aumento no número de células em relação às células incubadas com VEs controle (VEs liberadas por células mantidas em cultura sem adição do quimioterápico) após 72 horas. Quando as células foram tratadas com TMZ na presença ou ausência dessas VEs, as VEs liberadas por células previamente tratadas com essa droga aumentaram significativamente o número de células em relação ao grupo controle (sem adição de VEs) e ao grupo que recebeu VEs controle (células mantidas em cultura na ausência de TMZ) após mesmo período.

Figura 15. Análise da proliferação de células SKMel37 após tratamento com a TMZ. Células SKMel37 foram incubadas com 50 μ g de VEs TMZ (oriundas das células previamente tratadas com 360 μ M de TMZ por 72h) ou VEs controle (oriundas de células mantidas sem tratamento) e então tratadas ou não com 360 μ M de TMZ. Após 72 horas, foi realizada a contagem celular com azul de tripan na câmara de Neubauer. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. O teste estatístico utilizado foi o Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. S/V :sem adição de VEs; VC: VEs oriundas de células mantidas em cultura sem adição de quimioterápico; VT: VEs oriundas de células tratadas com TMZ.

Em seguida foram realizados experimentos de morte celular. Não houve diferença significativa em nenhuma dessas circunstâncias (Figura 16).

Figura 16. Taxa de morte de células SKMel37 após tratamento com a TMZ. Células SKMel37 foram incubadas com 50 μ g de VEs TMZ (oriundas das células previamente tratadas com 360 μ M de TMZ por 72h) ou VEs controle (oriundas de células mantidas sem tratamento) e então tratadas ou não com 360 μ M de TMZ. Após 72 horas foi analisada a morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo no DNA e leitura de fluorescência por citometria de fluxo. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. O teste

estatístico utilizado foi o Two-Way Anova com pós teste de Bonferroni. S/V: sem adição de VEs; VC: VEs oriundas de células mantidas em cultura sem adição de quimioterápico; VT: VEs oriundas de células tratadas com TMZ; C: grupo controle (sem adição de TMZ) e TMZ: grupo tratado com TMZ.

De acordo com esses resultados, constatou-se que as VEs liberadas por células tratadas com TMZ conferem uma vantagem proliferativa às células de melanoma humano receptoras; contudo, não observamos diferenças nas taxas de morte induzida por TMZ na presença dessas vesículas.

5 DISCUSSÃO

As células secretam uma variedade de VEs, das quais as mais estudadas são os exossomas e as microvesículas que são liberadas em condições fisiológicas ou patológicas (SAITO et al., 2015; LOPATINA et al., 2016). Nesse trabalho, primeiramente foi observado se as células SKMel37 liberam VEs, pois o trabalho realizado pelo grupo de Antonyak et al. (2011) constatou que nem todos os tipos celulares liberam VEs. Todavia, os resultados desse trabalho mostraram que as células de melanoma humano da linhagem SKMel37 secretam VEs e as mesmas são enriquecidas em exossomas que apresentam diâmetro entre 50 e 150 nm e microvesículas que apresentam diâmetro na faixa de 100 nm a 1 μ m (ARSCOTT e CAMPHAUSEN, 2011; ANDALOUSSI et al., 2013; RECORD et al., 2014; SILVA et al., 2015, HAN et al., 2017 Figuras 7 e 14 ; Tabelas 1 e 2). Em adição, foi observado que praticamente em todas as situações estressoras houve aumento da liberação de VEs (Figura 7, Figura 14, Tabela 1 e Tabela 2). Esses resultados condizem com vários estudos que já demonstraram esse aumento da vesiculação em situações de estresse, como alguns já descritos nesse trabalho (WYSOCZYNSKI e RATAJCZAK, 2009; PAROLINI et al., 2009; LV et al., 2012; KING et al., 2012; WANG et al., 2012), sugerindo que a secreção de vesículas em resposta a hipóxia e a TMZ constitua um meio de sinalização da presença de fatores estressores no microambiente tumoral em melanoma. No que diz respeito à padronização para a incorporação de VEs pelas células SKMel37, foi demonstrado que as células incorporaram VEs que se concentraram tanto na região perinuclear como dispersas no citoplasma (Figura 5). O trabalho de LV et al (2014) demonstrou a incorporação de exossomas através de imagens que mostraram essas VEs dentro da célula tumoral e na superfície celular em células de câncer de mama. Chen et al (2014) também mostraram a incorporação de VEs pelas células de câncer de mama, as quais apresentaram VEs nas regiões perinuclear, membrana plasmática e citoplasma.

Alguns estudos demonstraram que essa comunicação entre células vizinhas através da secreção e incorporação dessas VEs podem diminuir a eficiência de terapias como demonstrado em Chen et al (2014) e LV et al (2014). Realizamos experimentos com as VEs oriundas das células submetidas à hipoxia e normóxia e observamos que ambas não influenciaram nem a proliferação celular, nem a migração e morte celular (Figura 10, Figura 8, Figura 9 e Figura 11). As VEs oriundas das células submetidas ao tratamento com temozolamida não influenciaram a morte celular nem quando as células se encontravam sob tratamento (Figura 16). Contudo, as VEs oriundas das células submetidas ao tratamento com TMZ influenciaram positivamente a proliferação celular quando as células estavam ou não sob tratamento (Figura 15), conferindo assim uma vantagem proliferativa a essas células. Vários estudos mostram que as VEs possuem um papel efetivo na progressão do câncer (VAN DOORMAAL et al., 2009; CAMUSSI et al., 2011; D'ASTI et al., 2012; LOPATINA et al., 2016). Já foi mostrado, por exemplo, que as VEs liberadas pelas células tumorais podem estar envolvidas na regulação da apoptose, proliferação, invasão, transição epitélio-mesênquima e também na supressão da atividade das células imunes (LOPATINA et al., 2016). O estudo apresentado por Antonyak et al. (2011) mostraram que microvesículas oriundas de células de câncer de mama e de tumor de cérebro foram capazes de conferir aos fibroblastos normais e às células epiteliais características transformadas de células cancerosas, tal como o aumento na capacidade de sobrevivência. Outro trabalho com esse enfoque demonstrou que células em cultura derivadas de pacientes com glioblastoma apresentou microvesículas enriquecidas com RNA e proteínas envolvidas com a promoção do crescimento celular (SKOG et al., 2008). Outro estudo, dessa vez em câncer de mama, mostrou que as células estromais liberaram VEs que contribuíram para a quimioresistência e recidiva do tumor (BOELEN et al., 2014). Como já mencionado nesse trabalho, Bach et al (2017) também constatou que uma diminuição na

sensibilidade ao tratamento quimioterápico pode estar relacionados ao efluxo da droga do interior das células através das vesículas extracelulares (BACH et al., 2017).

Dessa maneira, os últimos resultados referentes à proliferação celular com o agente estressor, o quimioterápico temozolamida leva a constatar que as vesículas extracelulares podem modular a proliferação de células de melanoma humano na presença do quimioterápico, podendo-se imaginar então que a comunicação entre as células tumorais no microambiente por vesículas celulares possa contribuir no fenômeno de recidiva nesse modelo.

6 CONCLUSÕES

1. Células SKMel 37 liberam vesículas extracelulares enriquecidas em exossomas e microvesículas em condições de cultivo e situações de estresse celular como hipóxia e exposição ao quimioterápico temozolamida.
2. Células de melanoma SKMel 37 incorporam vesículas extracelulares, as quais se encontram dispersas no citoplasma e região perinuclear das células.
3. Tanto a hipóxia como a exposição ao quimioterápico temozolamida induzem um aumento no número de vesículas extracelulares liberadas pelas células de melanoma.
4. As vesículas extracelulares oriundas das células submetidas à hipóxia ou normóxia por 24 e 48hs não influenciaram nem a proliferação, morte ou tampouco a migração de células SKMel 37.
5. As VEs oriundas de células mantidas em cultura por 72 horas, tratadas com temozolamida, induzem um aumento na proliferação de células tanto na presença como na ausência desse quimioterápico.

7 BIBLIOGRAFIA

- ABDULLAH, L., & CHOW, E. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*, 2:3, 1-9. 2013.
- AL-NEDAWI, K., MEEHAN, B., MICALLEF, J., LHOTAK, V., MAY, L., GUHA, A., RAK, J.. Intercellular transfe of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology* 619-624. 2008.
- ANDALOUSSI, S., MAGER, I., BREAKEFIELD, O., WOOD, J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347–357. 2013
- ANDRE, F., SCHARTZ, NE., MOVASSAGH, M., FLAMENT, C., PAUTIER, P., MORICE, P., POMEL, C., LHOMME, C., ESCUDIER, B., LE CHEVALIER, T., TURSZ, T., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., ANGEVIN, E., ZITVOGEL, L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 360, 295-305. 2002.
- ANTONYAK, M., LI, B., BOROUGHS, L., JOHNSON, J., DRUSO, J., BRYANT, K., HOLOWKA, D., CERIONE, R. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 108, 4852–4857. 2011.
- ARSCOTT, T., & CAMPHAUSEN, A. EGFR isoforms in exosomes as a novel methodfor biomarker discovery in pancreatic cancer. *Biomarkers Med.* 5, 821. 2011.
- BACH, D., HONG, J., PARK, H., LEE, S. The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells. *Journal: International Journal of Cancer.* 2017.
- BARAN, J., BAJ-KRZYWORZEKA, M., WEGŁARCZYK, K., SZATANEK, R., ZEMBALA, M., BARBASZ, J., CZUPRYNA, A., SZCZEPANIK, A., ZEMBALA, M.. Circulating tumor-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunoder*, 59, 841-850. 2010.
- BOELENS, M., WU, T., NABET, B., XU, B., QIU, Y., YOON, T., AZZAM, D., TWYMAN-SAINT, C., WEIMANN, B., ISHWARAN, H. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell* 159, 499–513. 2014.
- BUSSOLATI, B., BRUNO, S., GRANGE, C., FERRANDO, U., CAMUSSI, G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *The FASEB Journal*, 22, 3696-3704. 2008.
- CAMUSSI, G., DEREGIBUS, MC., BRUNO, S., GRANGE, C., FONSATO, V., TETTA, C. Exosome/ microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*, 1, 98-110. 2011.
- CHEN, W., CAI, Y., LV, M., CHEN, L., ZHONG, S., MA, T., ZHAO, J., TANG, J. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumor Biol*, 9649-9659. 2014.
- CHRISTIANSON, H., SVENSSON, K., KUPPEVELT, T., LI, J., BELTING M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate protepglycans for their internalization and functional activity. *Pnas*, 110, 17380-17385. 2013.
- CORCORAN, C., RANI, S., BRIEN, K., O'NEILL A., PRENCIPE, M., SHEIKH, R., WEBB, G., DERMOTT, R., WATSON, W., CROWN, J., DRISCOLL, L. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *Plos One*. 2012

- CORRIE, P., HATEGAN, M., FIFE, K., PARKINSON, C.. Management of melanoma. *British medical bulletin*, 111, 149-162. 2014.
- D'ASTI, E., GARNIER, D., LEE, TH., MONTERMINE, L., MEEHAN, B., RAK, J. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol*, 3, 294. 2012.
- DESROCHERS, L., ANTONYAK, M., CERIONE, R. Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology. *Developmental Cell*, 37, 301-306. 2016.
- DIAZ-CANO, S. J. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable application of molecular marker design. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 1951-2011. 2012.
- GRANGE, C., TAPPARO, M., COLLINO, F., VITILLO, L., DAMASCO, C., DEREGIBUS, MC., TETTA, C., BUSSOLATI, B., CAMUSSI, G. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 71, 5346-5356. 2011.
- GYÖRGY, B., SZABÓ, T., PÁSZTÓI, M., PÁI, Z., MISJÁK, P., ARADI, B., LÁSZLÓ, V., PÁLLINGER, E., PAP, E., KITTEL, A., NAGY, G., FALUS, A., BUZÁS, E. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 16, 2667-2688. 2011.
- HAN, L., J, XU., Q, XU., ZHANG, B., LAM, E., SUN, Y. Extracellular vesicles in the tumor microenvironment: Therapeutic resistance, clinical biomarkers, and targeting strategies. *Wiley*. 2017.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646-674. 2011.
- HASSAN, L., PINON, A., LIMAMI, Y., SEEMAN, J., FIDANZI-DUGAS, C., MARTIN, F., BADRAN, B., SIMON, A., LIAGRE, B. Resistance to ursolic acid-induced apoptosis through involvement of melanogenesis and COX-2/PGE2 pathways in human M4Beu melanoma cancer cells. *Experimental Cell Research*. 2016.
- HEIJNEN, HF., SCHIEL, AE., FIJNHEER, R., GEUZE, HJ., & SIXMA, JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes-derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94, 3791-3799. 1999.
- HILL, R., & MILAS, L. The proportion of stem cells in murine tumours. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 16, 513-518. 1989.
- HOFF, P., KATZ, A., CHAMMAS, R., FILHO, V., NOVIS, Y. Tratado de Oncologia. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
- HOLLIDAY, R. Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*, 1:2, 76-80. 2006.
- HOOD, J., SAN, R. & WICKLINE, S. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Research*, 71, 3792-3801. 2011.
- INCA- Instituto Nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva. PELE MELANOMA 2016. Disponível em : <www2.inca.gov.br>. Acesso em: 7 abr. 2017.
- KAMERKAR, S., LEBLEU, V., SUGIMOTO, H., YANG, S., RUIVO, C., MELO, S., LEE, J., KALLURI, R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017
- KAPLAN, R., RIBA, R., ZACHAROULIS, S., BRAMLEY, A., VINCENT, L., COSTA, C., MACDONALD, D., JIN, D., SHIDO, K., KERNS, S., ZHU, Z., HICKLIN, D., WU, Y., PORT, J., ALTORKI, N., PORT, E., RUGGERO, D., SHMELKOV, S., JENSEN, K., RAFII, S., LYDEN, D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438, 820-827. 2005.
- KING, HW., MICHAEL, MZ., GLEADLE, JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 421. 2012.

- LIANG, C., PARK, A., GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpressive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature*, 2, 329-333. 2007.
- LIMA, L., CHAMMAS, R., MONTEIRO, R., MOREIRA, M., BARCINSKI, M. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Letters*, 283, 168-175. 2009.
- LIU, J., MA, L., XU, J., LIU, C., ZHANG, J., LIU, J., CHEN, R., ZHOU, Y. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology*, 42, 453-459. 2012.
- LONGLEY, D., & JOHNSTON, P. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205, 275-292. 2005.
- LOPATINA, T., GAI, C., DEREGBUS, M., KHOLIA, S., CAMUSSI, G. Cross Talk between Cancer and Mesenchymal Stem Cells through Extracellular Vesicles Carrying Nucleic Acids. *Frontiers in Oncology* 6. 2016.
- LORGER, M. Tumor microenvironment in the brain. *Cancers*, 4, 218-243. 2012.
- LU, P., WEAVER, VM., WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196, 395-406. 2012.
- LV, LH., WAN, YL., LIN, Y., ZHANG, W., YANG, M., LI, GL., LIN, HM., SHANG, CZ., CHEN, YJ., MIN, J. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem*, 287, 15874-15885. 2012.
- LV, M., ZHU, X., CHEN, W., ZHONG, S., HU, Q., MA, T., ZHANG, J., CHEN, L., TANG, J., ZHAO, J. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein. *Tumor Biol* 35, 10773-10779. 2014.
- MARTINS, V., DIAS, M., HAINAUT, P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol*, 25, 66-75. 2013.
- MARTINS-NETO, A., CARDIM, S., MOTHÉ, C., ANDRADE, L. Introdução ao Microambiente Tumoral. SAITO, R., LANA, M., MEDRANO, R., CHAMMAS. Fundamentos de Oncologia Molecular. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.
- MHAIDAT, N., ZHANG, X., ALLEN, J., AVERY-KIEJDA, K., SCOTT, R., HERSEY, P. Induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. 2007.
- MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J., PLOU, C., ROMAO, M., CHAVRIER, P., RAPOSO, G., & D'SOUZA-SCHOREY, C. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, 19, 1875-1885. 2009.
- MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J., SEDGWICK, A., D'SOUZA-SCHOREY, C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, 123, 1603-1611. 2010.
- QUIMIOTERAPIA PARA CÂNCER DE PELE MELANOMA. Disponível em: www.oncoguia.org.br Acesso em : 7 abr. 2017.
- PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*, 8, 98-101. 1989.
- PARMIANI. Cancers .melanoma cancer stem cells: markers and functions. *Cancers*. 2016
- PAROLINI, I., FEDERICI, C., RAGGI, C., LUGINI, L., PALLESCHI, S., DE MILITO, A., COSCIA, C., IESSI, E., LOGOZZI, M., MOLINARI, A., COLONE, M., TATTI, M., SARGIACOMO, M., FAIS, S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*, 284, 34211-34222. 2009.

- PEINADO, H., ALEČKOVIĆ, M., LAVOTSHKIN, S., MATEI, I., COSTA-SILVA, B., MORENO-BUENO, G., HERGUETA-REDONDO, M., WILLIAMS, C., GARCÍA-SANTOS, G., GHAJAR, C., NITADORI-HOSHINO, A., HOFFMAN, C., BADAL, K., GARCIA, BA., CALLAHAN, MK., YUAN, J., MARTINS, VR., SKOG, J., KAPLAN, RN., BRADY, MS., WOLCHOK, JD., CHAPMAN, PB., KANG, Y., BROMBERG, J., LYDEN, D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*, 18, 883-891. 2012.
- POLICASTRO, L., IBANEZ, IL, NOTCOVICH, C., DURAN, HA., PODHAJCER, OL. The tumor microenvironment: characterization, redox considerations, and novel approaches for reactive Oxygen species-targeted gene therapy. *Antioxid Redox Signal*, 19(8), 854-895. 2011.
- RAPOSO, G., NIJMAN, HW., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, CV., MELIEF, CJ., GEUZE, HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183, 1161-1172. 1996.
- RECORD, M., CARAYON, K., POIROT, M., SILVENTE-POIROT, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 108–120. 2014.
- SAITO, R., TORTELLI, T., JACOMASSI, M., OTAKE, A. Emerging targets for combination therapy in melanomas. *Elsevier* 3438-3448. 2015.
- SCHADENDORF, D., FISHER, D., GARBE, C., GERSHENWALD, J., GROB, J., HALPERN, A., HERLYN, M., MARCHETTI, M., MCARTHUR, G., RIBAS, A., ROESCH, A., HAUSCHILD, A. Melanoma. *Nature reviews*. 2015.
- SCHEPERS, A., SNIPPERT, H., STANGE, D., BORN, M., ES, J., WETERING, M., CLEVERS, H. Lineage Tracing Reveals Lgr5⁺ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas. *Science*, 337, 730-735. 2012.
- SHINA, GOYAL., RABI, SINGH., SASIDHARAN, BALUKRISHNA., MANDEEP, BINDRA., SELVAMANI, BACKIANATHAN. An Early and Rare Second Malignancy in A Treated Glioblastoma Multiforme: Is It Radiation or Temozolomide? *J Clin Diagn Res*, 9. 2015.
- SILVA, B., AIELLO, N., OCEAN, A., SINGH, S., ZHANG, H., THAKUR, B., BECKER, A., HOSHINO, A., MARK, M., MOLINA, H., XIANG, J., ZHANG, T., THEILEN, T., SANTOS, G., WILLIAMS, C., ARARSO, Y., HUANG, Y., RODRIGUES, G., SHEN, T., LABORI, K., LOTHE, I., KURE, E., HERNANDEZ, J., DOUSSOT, A., EBBESEN, S., GRANDGENETT, P., HOLLINGSWORTH, M., JAIN, M., MALLYA, K., BATRA, S., JARNAGIN, W., SCHWARTZ, R., MATEI, I., PEINADO, H., STANGER, B., BROMBERG J., LYDEN, D. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*. 2015.
- SKOG, J., WÜRDINGER, T., VAN RIJN, S., MEIJER, D.H., GAINCHE, L., SENA-ESTEVEZ, M., CURRY, W., JR., CARTER, B.S., KRICHEVSKY, A., BREAKFIELD, X. Glioblastoma microvesicles transport rna and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell biol.* 10, 1470–1476. 2008.
- SVENSSON, KJ., KUCHARZEWSKA, P., CHRISTIANSON, HC., SKÖLD, S., LÖFSTEDT, T., JOHANSSON, MC., MÖRGELIN, M., BENZON, J., RUF, W., BELTING, M. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13147-13152. 2011.
- TARABOLETTI, G., D'ASCENZO, S., GIUSTI, I., MARCHETTI, D., BORSOTTI, P., MILLIMAGGI, D., GIAVAZZI, R., PAVAN, A., DOLO, V. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*, 8, 96-103. 2011.
- TAYLOR, DD., & GERCEL-TAYLOR, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110, 13-21. 2008.
- THÉRY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatant and biological fluids.) *Curr Protoc Cell Biol.* 3. 2006

- THÉRY, C., OSTROWSKI, M., SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9, 581-593. 2009.
- TRAMS, E., LAUTER, C., SALEM, N. & HEINE, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 645, 63-70. 1981.
- ULRICH, WEIDLE1., FABIAN, BIRZELE., GWEN, KOLLMORGEN., RUDIGER, RUGER. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer genomics & proteomic*, 14, 1-16. 2017.
- VAN DOORMAAL, FF., KLEINJAN, A., DI NISIO, M., BÜLLER, HR., NIEUWLAND, R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med*, 67, 266-273. 2009.
- XIAO X, YU S, LI S, WU J, MA R, CAO H, et al.Exosomes: Decreased Sensitivity of Lung Cancer A549 Cells to Cisplatin. *Plos one* 9, 2. 2014
- Xu, Y., Qin, S., An, T., Tang, Y., Huang, Y., Zheng, L. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method. *Wiley*. 2017
- WANG, X., LIU, Q., HOU, B., ZHANG, W., YAN, M., JIA, H., LI, H., YAN, D., ZHENG, F., DING, W., YI, C., WANG, H. Concomitant Targeting of Multiple Key Transcription Factors Effectively Disrupts Cancer Stem Cells Enriched in Side Population of Human Pancreatic Cancer Cells. *Plos One*, 8(9). 2013.
- WANG, Y., ROCHE, O., XU, C., MORIYAMA, EH., HEIR, P., CHUNG, J, ROOS, FC., CHEN, Y., FINAK, G., MILOSEVIC, M., WILSON, BC, THE, BT., PARK, M., IRWIN, MS., OHH, M. Hypoxia promotes ligand-independent EGF receptor signaling via hypoxia-inducible factor-mediated upregulation of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 4892-4897. 2012.
- WYSOCZYNSKI, M., & Ratajczak, MZ. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer*, 125, 1595-1603. 2009.
- ZENG, A., YAN, W., LIU, Y., WANG, Z., HU, Q., NIE, E., ZHOU, E., LI, R., WANG, X., JIANG, T., YOU, Y. Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1–MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma. *Nature*. 2017.