

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

Nathalia Leal Santos

Efeito da super-expressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação

Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

São Paulo - SP

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Nathalia Leal Santos

Efeito da super-expressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

Programa de pós-graduação em Oncologia.

Orientador: Dr. Roger Chammas

Co-orientadora: Dra. Luciana Nogueira de Sousa Andrade

São Paulo - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Nathalia Leal

Efeito da super-expressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação / Nathalia Leal Santos. -- São Paulo, 2021.

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

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Coorientadora: Luciana Nogueira de Sousa Andrade.

Descritores: 1.Melanoma 2.Terapia de alvo molecular 3.Vesículas extracelulares 4.miR-195

USP/FM/DBD-394/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Roger e Luciana, por toda dedicação, ensinamentos, oportunidade em desenvolver este projeto e todo apoio durante essa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental pela convivência, conhecimentos e bons momentos compartilhados.

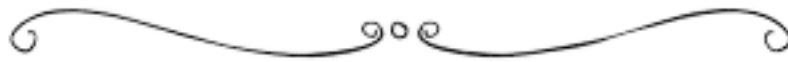
À Silvina, Tuty e Miyuki pela ajuda com os experimentos.

Aos meus pais, minha irmã e meus avós, que foram fundamentais na minha formação acadêmica e pessoal.

À Universidade de São Paulo, ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e a todos do Centro de Investigação Translacional em Oncologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (processo n° 2019/07972-0).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, muito obrigada!



“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

- Marie Curie



NORMATIZAÇÃO UTILIZADA

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT)*. Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro [et al.]. 4. ed. São Paulo: AGUIA, 2020. 75p.: il. (Cadernos de estudos; 9). ISBN 978-85-7314-065-1.

Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	I
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	II
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Melanoma	6
1.2. Terapia alvo-dirigida combinada	9
1.3. MicroRNAs.....	12
1.3.1. miR-195-5p.....	15
1.4. Vesículas Extracelulares	16
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Cultura celular.....	22
3.2. Superexpressão do miR-195	22
3.3. Isolamento e caracterização das VEs.....	22
3.4. Extração de RNA e RT-qPCR	23
3.4.1. Análise do perfil de expressão gênica	24
3.5. Avaliação da internalização das VEs.....	25
3.6. Atividade metabólica (atividade da succinato desidrogenase)	25
3.7. Proliferação celular	25
3.8. Perfil de ciclo	26
3.9. Ensaio clonogênico	26
3.10. Tratamento alvo-dirigido combinado	26

3.11. Tratamento com Azacitidina.....	27
3.12. Eletroporação de VEs	27
3.13. Crescimento tumoral <i>in vivo</i>	27
3.14. Análises <i>in silico</i>	28
3.15. Análise estatística	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. A superexpressão de miR-195 modula o perfil de vesiculação de células de melanoma.....	29
4.2. VEs são capazes de transferir o efeito antiproliferativo de miR-195	34
4.3. VEs secretadas por células que superexpressam miR-195 são capazes de sensibilizar células <i>naïve</i> a terapia alvo-dirigida combinada.....	37
4.4. Análise do efeito de VEs miR-195 no crescimento tumoral <i>in vivo</i>	44
4.5. Metilação e inibição por lncRNAs são possíveis mecanismos responsáveis pela <i>down</i> -regulação de miR-195 em melanomas.....	46
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
8. ANEXOS.....	68
Anexo I. Carta de aprovação CIBIO.....	69
Anexo II. carta de aprovação CEP	70
Anexo III. Carta de Aprovação CEUA	71
Anexo IV. Prorrogação CEUA	72
Anexo V. Lista de genes avaliados por RT-qPCR por microfluídica.....	73
Anexo VI. Certificado de autenticação das linhagens utilizadas.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

3' UTR: Região 3' não traduzida (do inglês, *3' Untranslated region*)

ANOVA: Análise de variância

AZA: Azacitidina

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

ILV: Vesículas intraluminais (do inglês, *Intraluminal vesicles*)

LncRNAs: RNAs longos não codificantes (do inglês, *Long non-coding RNAs*)

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *Mitogen-activated protein kinase*)

MAPKi: inibidores da via MAPK (BRAF e MEK)

mRNA: RNA mensageiro

MVB: Corpos multivesiculares (do inglês, *Multivesicular bodies*)

SKCM: Melanoma maligno cutâneo (do inglês, *Skin Cutaneous Malignant Melanoma*)

TCGA: Atlas do Genoma do Câncer (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*)

UV: Ultravioleta

VEs: Vesículas Extracelulares

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Alterações moleculares durante o desenvolvimento do melanoma.	8
Figura 2. Linha do tempo: Terapias aprovadas para o tratamento de melanomas em estágios avançados (1975-2018).	11
Figura 3. Biogênese e função dos miRNAs.....	13
Figura 4. Expressão de miR-195 e sobrevida de pacientes com melanoma.....	16
Figura 5. Biogênese e classificação das VEs.....	17
Figura 6. Alta expressão de genes envolvidos na biogênese de VEs está relacionada a pior prognóstico em melanoma.	19
Figura 7. Efeito da superexpressão de miR-195.....	31
Figura 8. Perfil de vesiculação 72 horas após transfecção com controle ou miR-195.....	32
Figura 9. Perfil de vesiculação 72 horas após transfecção ou tratamento somente com lipofectamina.....	33
Figura 10. VEs derivadas de células que superexpressam miR-195 induzem efeito citostático em células <i>naïve</i>	35
Figura 11. Efeito de VEs miR- 195 após tratamento com RNase A.....	36
Figura 12. Padronização do tratamento alvo-dirigido combinado.	40
Figura 13. VEs miR-195 sensibilizam células <i>naïve</i> aos inibidores de BRAF e MEK.....	41
Figura 14. Perfil de expressão gênica de células tratadas com inibidores da via MAPK e VEs.	42
Figura 15. Expressão de POU5F1 e NFE2L3 e sobrevida de pacientes com melanoma.....	43
Figura 16. Vias relacionadas aos genes diferencialmente expressos após tratamento.	43
Figura 17. Efeito de VEs contendo miR-195 no crescimento tumoral <i>in vivo</i>	45
Figura 18. O miR-195 é possivelmente down-regulado transcricional e pós-transcricional em melanoma.....	47
Tabela 1. Sequência de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.	24
Tabela 2. Expressão dos lncRNAs capazes de inibir miR-195 em melanoma comparado com tecidos não-malignos.....	48

RESUMO

Santos, N.L. *Efeito da super-expressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O melanoma é classificado como o tipo mais agressivo do câncer de pele. A terapia alvo-dirigida combinada, com inibidores de BRAF e MEK, considerada a opção terapêutica padrão para o tratamento de pacientes em estágios avançados que possuem mutação em BRAF, resulta em uma taxa de sobrevivência em 5 anos de apenas 20%. A transferência de informações via Vesículas Extracelulares (VEs) tem sido descrita como um dos mecanismos capazes de modular os processos de resistência e progressão maligna. No melanoma, a presença de moléculas antitumorais em VEs está associada a maiores taxas de resposta ao tratamento e melhores prognósticos. O miR-195, considerado um supressor tumoral, é *down*-regulado em melanomas e sua superexpressão resulta na diminuição da proliferação celular e aumento da sensibilidade à quimioterapia com agentes alquilantes e inibidores de BRAF. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da superexpressão de miR-195 na carga de VEs liberadas por células de melanoma e o papel destas partículas na regulação da sensibilidade de células *naïve* a terapia alvo-dirigida combinada. Diferentes linhagens de melanoma humano (A375, SKMel-05, SKMel-28 e UACC-62) foram transfectadas com o miR-195, resultando no aumento da concentração de VEs liberadas, as quais apresentaram menor tamanho em relação ao controle. Análises de expressão gênica por RT-qPCR mostraram que a transfecção de miR-195 induz o aumento da expressão de GTPases envolvidas na biogênese de exossomos, enquanto genes envolvidos na produção de microvesículas têm sua expressão diminuída. VEs secretadas por células transfectadas com este miRNA foram capazes de transferir seu efeito citostático, induzindo a expressão de genes antiproliferativos, como CDKN1A e CDKN3, e diminuindo a

expressão de genes pró-proliferativos, como CCND1 e YAP1, em células *naïve*. VEs contendo miR-195 também impactaram o crescimento tumoral *in vivo*, diminuindo a cinética de crescimento dos tumores. Além disso, o tratamento com VEs miR-195 foi capaz de aumentar a sensibilidade de células *naïve* a terapia alvo-dirigida combinada, resultando em maior expressão de BAD, menor expressão de BCL2L1 e conseqüentemente maior porcentagem de morte celular, além da diminuição do potencial clonogênico das células. Adicionalmente, com relação ao mecanismo de regulação de miR-195, dados do TCGA mostraram maiores níveis de metilação deste miRNA em melanomas em relação a tecidos saudáveis, entretanto, sua expressão foi restaurada após o tratamento das células com Azacitidina em apenas uma das três linhagens testadas. Análises *in silico* mostraram que diversos lncRNAs capazes de inibir miR-195 encontram-se superexpressos em melanoma, representando outro possível mecanismo de *down*-regulação. Em resumo, a superexpressão de miR-195 representa uma estratégia promissora para sensibilizar células de melanoma a terapia via transferência horizontal de informação.

Descritores: Melanoma; Terapia de alvo molecular; Vesículas extracelulares; miR-195.

ABSTRACT

Santos, N.L. *Effect of miR-195 overexpression in the miRNA cargo of extracellular vesicles secreted by human melanoma cells and in the regulation of cells sensitivity to targeted-therapy through horizontal transfer of information* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Melanoma is considered the most aggressive form of skin cancer. Combined targeted therapy, with BRAF and MEK inhibitors, considered the standard treatment for BRAF-mutated metastatic melanoma patients, results in 5 years overall survival of 20%. Extracellular Vesicles (EVs)-mediated transfer of information has been reported as a mechanism capable of regulating tumor resistance and progress. The presence of antitumoral molecules within EVs is related to increased response rates and better prognosis for melanoma patients. MiR-195, considered a tumor suppressor miRNA, is down-regulated in melanoma and its overexpression results in decreased cells proliferation and increased sensitivity to chemotherapy with alkylating agents and BRAF inhibitors. We aimed to analyze whether miR-195 overexpression could modulate EVs cargo and the role of these particles in *naïve* cells response to combined targeted treatment. A375, SKMel-5, SKMel-28 and UACC-62 cells were transfected with miR-195, resulting in increased EVs release and decreased EVs size. Gene expression analysis by RT-qPCR showed that miR-195 mimic induces the expression of GTPases involved in exosomes biogenesis, while genes involved in microvesicles shedding are down-regulated upon transfection. EVs derived from cells overexpressing miR-195 could transfer its cytostatic effect, inducing the expression of anti-proliferative genes, such as CDKN1A and CDKN3, and inhibiting pro-proliferative genes, including CCND1 and YAP1, in *naïve* cells. EVs containing miR-195 also impaired *in vivo* tumor growth, reducing tumor's growth kinetics. Treatment with miR-195 EVs could also sensitize *naïve* cells to combined targeted therapy, resulting in higher expression of BAD, inhibition of BCL2L1 and consequently increased cell death, in addition to decreased

clonogenic potential. Additionally, regarding the mechanisms of miR-195 regulation, TCGA data showed higher levels of methylation of this miRNA in melanoma tissues compared to controls, nevertheless, treatment of melanoma cells with Azacitidine only restored miR-195 expression in one out of three cell lines. *In silico* analysis showed that several lncRNAs capable to sponge miR-195 are overexpressed in melanomas, representing another possible mechanism of down-regulation. In summary, miR-195 overexpression represents a promising strategy to sensitize melanoma cells through horizontal transfer of information.

Descriptors: Melanoma; Molecular targeted therapy; Extracellular vesicles; miR-195.

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é classificado como o subtipo mais agressivo dentre os tumores cutâneos, devido ao seu elevado potencial metastático e fenótipo resistente (ANTUNES *et al.*, 2018). Cerca de 50% dos pacientes apresentam mutação no gene BRAF (BRAF^{V600E}), a qual resulta na ativação constitutiva da via MAPK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), levando a proliferação descontrolada das células (ASCIERTO *et al.*, 2016). O tratamento alvo-dirigido (terapia de alvo molecular) combinado, com inibidores da proteína BRAF mutada em conjunto com inibidores da kinase *down-stream*, MEK, é considerado a terapia padrão para pacientes em estágio metastático que possuem mutação em BRAF. Apesar desta modalidade terapêutica melhorar significativamente o prognóstico dos pacientes quando comparado ao tratamento quimioterápico convencional, aproximadamente 30% destes apresentam resistência intrínseca, enquanto cerca de 80% dos que eram inicialmente responsivos desenvolvem resistência terapêutica após 12 meses do início do tratamento, resultando em uma taxa de sobrevida global em 5 anos de 20% (SADRU *et al.*, 2014; MACKIEWICZ e MACKIEWICZ, 2018). Assim, a busca por mecanismos capazes de regular a sensibilidade das células à terapia alvo-dirigida combinada representa uma alternativa para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

No decorrer dos últimos anos, a desregulação da expressão de microRNAs (18-24 nucleotídeos, não codificantes, miRNA) e a transferência de moléculas bioativas via Vesículas Extracelulares (VEs) têm sido amplamente associadas a regulação da resposta a terapias. VEs são partículas nanométricas liberadas pelas células como intermediadoras da comunicação intercelular e atuam transferindo moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos (mRNA, miRNA, DNA) e lipídeos, entre células parentais e recipientes (SANTI *et al.*, 2015;

JIANG *et al.*, 2020; YOSHIDA *et al.*, 2019). Particularmente, a carga de miRNAs presente em VEs tem sido associada a progressão tumoral e resposta ao tratamento com inibidores da via MAPK, em melanomas. Níveis aumentados de miRNAs supressores tumorais, como miR-497 e miR-34a, estão relacionados a melhor resposta terapêutica e efeito antitumoral, respectivamente (SVEDMAN *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019). De maneira oposta, níveis aumentados de miRNAs considerados oncogênicos, como miR-211, estão associados a aquisição e transferência de resistência (LUNAVAT *et al.*, 2017).

O miR-195 pertence à família miR-15/16/195/424/497 e é classificado como um supressor tumoral em diversos tumores, incluindo melanoma (YU¹ *et al.*, 2018). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que este miRNA é *down*-regulado em melanoma e que sua super-expressão resulta em efeito antiproliferativo além de aumentar a sensibilidade das células a quimioterapia com agentes alquilantes e inibidores de BRAF, através da inibição de Proibitina 1 (PHB1) (CIRILO *et al.*, 2017). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a superexpressão de miR-195 em células de melanoma é capaz de modular a carga de VEs, de forma que estas nanopartículas passem a favorecer o tratamento, aumentando a sensibilidade das células receptoras a terapia alvo-dirigida combinada.

1.1. Melanoma

Apesar de ser o subtipo menos frequente dentre os cânceres de pele, melanomas são responsáveis por cerca de 80% das mortes ocasionadas por tumores cutâneos. São originados a partir da transformação maligna de melanócitos, células pigmentadas localizadas principalmente na camada basal da epiderme, em resposta a complexos fatores etiológicos, sendo a frequente exposição a luz UV considerada a mais relevante. A incidência do melanoma vem aumentando nos últimos anos, no mundo inteiro, principalmente em adultos jovens, de 20

a 39 anos (FATTORE *et al.*, 2017). No Brasil, estima-se que 8.450 novos casos sejam diagnosticados por ano no triênio 2020/2022 (INCA, 2020).

Quando diagnosticado em estágios iniciais (I e II), a cirurgia é considerada um tratamento eficiente, pois resulta em cura na maior parte dos casos, apresentando uma taxa de sobrevida em cinco anos de aproximadamente 90%. Entretanto, casos mais avançados, que apresentam disseminação regional (III) ou para órgãos distantes (IV) apresentam um pior prognóstico. Estima-se que cerca de 25% dos pacientes sejam diagnosticados no estágio III e 40% no estágio IV (ROTARU *et al.*, 2019), os quais possuem taxas de sobrevida em 5 anos de 60% e 20%, respectivamente (GARBE *et al.*, 2020). Diferentes abordagens têm sido estudadas para o tratamento destes casos mais avançados, porém, resistência imediata ou adquirida ainda representam barreiras para a obtenção de resultados satisfatórios (LONG *et al.*, 2017).

As fases que descrevem o processo de tumorigênese do melanoma foram estabelecidas pelo modelo de Clark em 1980 (Figura 1). O acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas patogênicas ocasionam a formação de um nevo melanocítico, seguida pelo surgimento de um nevo displásico, que dá origem ao melanoma *in situ*, a partir do qual o melanoma invasivo é originado (CLARK *et al.*, 1984; DAMSKY *et al.*, 2017). Mutações em BRAF são encontradas em cerca de 80% dos nevos benignos, porém o crescimento destas células é limitado por indução de senescência. A aquisição de mutações adicionais de perda de função em supressores de tumor, como PTEN e CDKN2A, são necessárias para a formação de nevos displásicos. Em seguida, a indução da progressão do ciclo celular, através do aumento da expressão de genes pró-proliferativos, como ciclina D1 (CD1) e da transição epitélio-mesênquima, caracterizada pela perda de E-caderina, aumento de N-caderina e MMP2, marcam as fases de crescimento radial e vertical, respectivamente, favorecendo o processo de metástase.

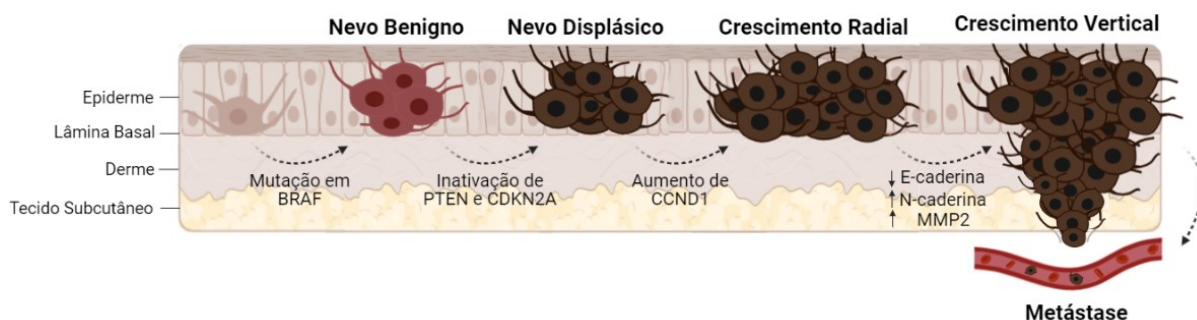


Figura 1. Alterações moleculares durante o desenvolvimento do melanoma.

Mutações em BRAF estão presentes na maioria (60-80%) dos nevos benignos formados a partir de melanócitos saudáveis. Em seguida, a inativação das vias de CDKN2A e PTEN levam ao desenvolvimento de nevos displásicos. A indução da progressão do ciclo celular, através do aumento da expressão de ciclinas, como CD1, dá origem à fase de crescimento radial. Durante as etapas de crescimento vertical e metástase ocorrem mudanças no controle da adesão celular devido à perda de E-caderina e aumento da expressão de N-caderina, e MMP-2. Adaptado de Miller *et al.*, (2006). Figura criada no Biorender.

O perfil de alterações genéticas permite sua classificação em quatro subtipos, de acordo com a ocorrência de mutações *drivers* nos genes BRAF, RAS e NF1. Quando não são encontradas mutações em nenhum destes genes, o melanoma é classificado como tipo *wild-type* (LONG *et al.*, 2018; RABBIE *et al.*, 2019). A mutação no gene BRAF é a mais comum, estando presente em cerca de 50% dos melanomas diagnosticados. É mais frequentemente caracterizada pela substituição do aminoácido valina pelo glutamato no códon 600 (BRAF^{V600E}) e resulta na ativação constitutiva da proteína BRAF, que atua na via MAPK, responsável pela regulação de processos como divisão e diferenciação celular (KAKADIA *et al.*, 2018). A cascata bioquímica MAPK tem início com a ligação de fatores de crescimento à receptores de superfície celular, que resultam na ativação da proteína RAS, a partir da qual são ativadas sequencialmente as proteínas BRAF, MEK e ERK. Uma vez ativada, ERK atua na fosforilação de diversos fatores de transcrição que ocasionam a ativação de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e motilidade celular. Também desempenha funções na regulação de outros mecanismos relacionados à progressão tumoral, como evasão de senescência e apoptose,

promoção de angiogênese, invasão e metástase (ASCIERTO *et al.*, 2016; BISSCHOPA *et al.*, 2018).

1.2. Terapia alvo-dirigida combinada

A terapia alvo-dirigida para o tratamento de melanomas metastáticos ou inoperáveis foi aprovada em meados de 2011 pela *U.S Food and Drug Administration* (FDA), através da autorização do uso do medicamento vemurafenibe, inibidor enzimático da proteína BRAF^{V600E}. A utilização deste fármaco resultou em um aumento significativo na sobrevida dos pacientes, apresentando taxa de resposta inicial de aproximadamente 50% e sobrevida global de 16 meses (SOSMAN *et al.*, 2012). Até então, os medicamentos aprovados para o tratamento de casos avançados eram o quimioterápico dacarbazina e as imunoterapias não-seletivas (Figura 2), a base de interferon- α (IFN- α) e interleucina 2 (IL-2), os quais apresentavam taxa de resposta de cerca de 10%, 15% e 13% e sobrevida de 7, 7 e 9 meses, respectivamente (SMITH *et al.*, 2008; DAVAR *et al.*, 2017; KAKADIA *et al.*, 2018; DAVIS *et al.*, 2019). Apesar do aumento significativo na taxa de resposta num primeiro momento, a longo prazo, cerca de 80% dos pacientes desenvolvem resistência a monoterapia com vemurafenibe, principalmente através da reativação da via MAPK. Diversos mecanismos já foram associados a resistência à inibição de BRAF, dentre eles estão mutações *upstream* a Ras ou *down-stream* a BRAF e ampliações ou superexpressão de outros oncogenes. Tais processos fazem com que a sobrevida livre de doença seja limitada a aproximadamente 7 meses (WELSH *et al.*, 2016).

Em 2015, foi aprovado pela FDA o uso do cobimetinibe, um inibidor específico de MEK, para o tratamento de melanomas metastáticos, em terapia conjunta. A adição de um inibidor de MEK a terapia alvo-dirigida retarda a ocorrência de resistência e aumenta a sobrevida global dos pacientes para uma média de 22 meses, com taxa de resposta de 60% (BOESPFLUG *et al.*, 2016). Em seguida, novos inibidores de BRAF (dabrafenibe, encorafenibe) e MEK (trametinibe, binimetinibe) foram aprovados como terapia conjunta para o tratamento de

melanomas, possuindo taxas de resposta e sobrevida similares ao tratamento-alvo combinado aprovado anteriormente (KNISPEL *et al.*, 2018). Desta forma, a terapia combinada com vemurafenibe e cobimetinibe, dabrafenibe e trametinibe ou encorafenibe e binimetinibe, se tornou a intervenção padrão para pacientes com mutação em BRAF, em estágios avançados, enquanto imunoterapias com inibidores dos *checkpoints* imunológicos, CTLA-4/CD80 e PD-1/PDL-1, são empregadas como tratamento de segunda linha para estes pacientes ou de primeira linha para aqueles que não possuem mutação em BRAF.

Apesar de representar um grande avanço no tratamento de melanomas, a progressão tumoral e falha terapêutica é observada cerca de 12 meses a partir do início do tratamento com inibidores de BRAF e MEK, na maioria dos pacientes, levando a uma taxa de sobrevida global em dois anos de aproximadamente 40% (ASCIERTO *et al.*, 2016; SIMEONE *et al.*, 2017). Assim, a identificação de estratégias que possam sensibilizar as células e/ou reverter mecanismos de resistência são necessários para obtenção de melhores prognósticos. Neste sentido, diferentes estudos têm avaliado o potencial da combinação do tratamento alvo-dirigido com inibidores de vias e/ou mecanismos associados ao processo de resistência (PROIETTI *et al.*, 2020). Sabe-se que apesar de ocasionar morte celular, o efeito predominante do tratamento com inibidores de BRAF e MEK é citostático (BRUMMER *et al.*, 2018; SALE *et al.*, 2019). A indução de apoptose é principalmente associada ao alto nível de estresse metabólico ocasionado pela supressão de glicólise aeróbica, induzida pela inibição da via MAPK. Desta forma, um dos mecanismos de adaptação que células de melanoma apresentam quando submetidas ao tratamento alvo-dirigido combinado é o aumento no metabolismo mitocondrial e nos níveis de fosforilação oxidativa, através da *up*-regulação de MITF, por exemplo. A inibição do metabolismo mitocondrial em conjunto com tratamento com os inibidores, resulta no aumento de morte celular e nos níveis de resposta terapêutica, retardando a ocorrência de resistência (HONG *et al.*, 2017; MARCHETTI *et al.*, 2018; BRUMMER *et al.*, 2018; GODAL *et al.*,

2019). Além disso, a superexpressão de genes anti-apoptóticos, como BCL-2, PAK1, PAK2 e PHB1 também já foi descrita como mecanismo associado a resistência a terapia alvo-dirigida e a inibição destes genes também resulta no aumento da sensibilidade do melanoma ao tratamento (BABAGANA *et al.*, 2017; CIRILO *et al.*, 2017; SALE *et al.*, 2019). Estudos adicionais precisam ser conduzidos para avaliar a eficácia destes tratamentos em pacientes.

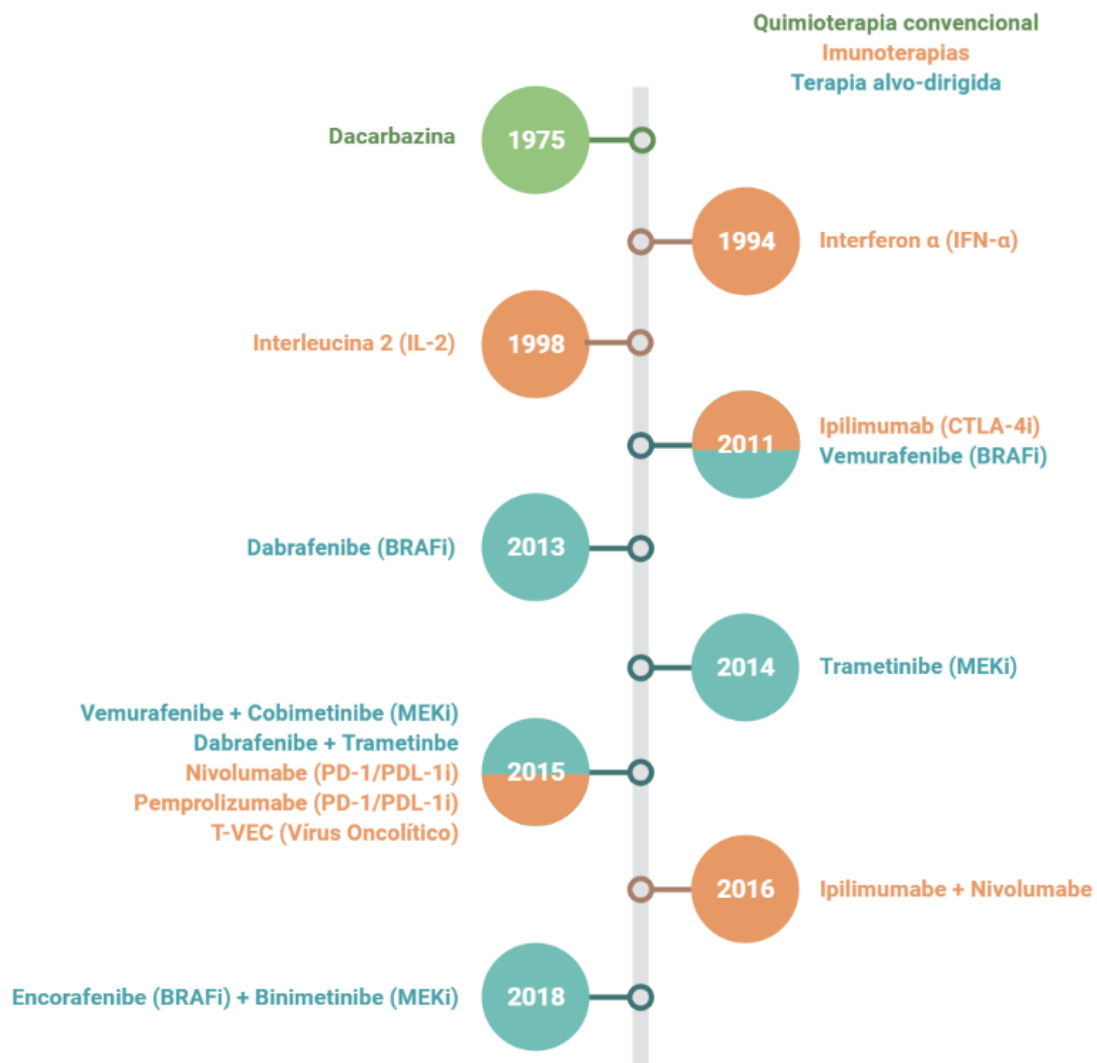


Figura 2. Linha do tempo: Terapias aprovadas para o tratamento de melanomas em estágios avançados (1975-2018).

Adaptado de Haferkamp *et al.*, (2020). Figura criada no Biorender.

1.3. MicroRNAs

Os microRNAs são pequenos RNAs (18 a 22 nucleotídeos) não codificantes, capazes de regular a expressão gênica principalmente de maneira pós-transcricional. O mecanismo de ação de miRNAs melhor elucidado diz respeito a inibição da tradução de RNAs mensageiros (RNAm) complementares, por meio da degradação, sequestro ou bloqueio da interação com os ribossomos. A sequência *seed* presente em miRNAs é responsável por reconhecer e se ligar a região 3' UTR (do inglês, *untranslated region*) de um RNAm-alvo, inibindo sua expressão. Tipicamente, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, gerando um miRNA primário (pri-miRNA), o qual é processado pela endonuclease DROSHA, formando um miRNA precursor (pre-miRNA). Os pre-miRNAs são exportados para o citoplasma e processados por DICER, gerando miRNAs maduros de fita dupla. Uma das fitas, denominada fita guia, é incorporada no complexo de silenciamento induzido por RNA (do inglês, *RNA-Induced Silencing Complex, RISC*) em associação com a proteína Argonata, onde atua regulando a expressão de RNAs mensageiros alvo (Figura 3). Além deste mecanismo, recentemente, diferentes estudos têm mostrado que miRNAs também podem atuar na regulação da transcrição gênica, através da interação com regiões regulatórias no núcleo celular, como *enhancers* (STAVAST *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021).

Estima-se que pelo menos 30% dos RNAm humanos sejam regulados por miRNAs e esta regulação exerce funções importantes no controle de processos fisiológicos e patológicos (SARKAR *et al.*, 2015). Em tumores, a desregulação da expressão de miRNAs está associada ao desenvolvimento, progressão e resposta terapêutica. Dependendo dos genes que regulam, podem ser classificados como oncomiRs ou supressores tumorais. OncomiRs, se inibem genes anti-tumorais; e, supressores de tumor, se inibem genes que favorecem a progressão maligna (YU¹ *et al.*, 2018). No melanoma, a desregulação do perfil de expressão de miRNAs já foi associada a diferentes aspectos do desenvolvimento tumoral, como indução de angiogênese

(ZHOU *et al.*, 2018), transição epitélio-mesênquima (FOMESHI *et al.*, 2015), migração e metástase (YANG *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019), inibição do sistema imune (MASTROIANNI *et al.*, 2019) e resistência a drogas (CIRILO *et al.*, 2017; VERGANI *et al.*, 2016; GRZYWA *et al.*, 2020).

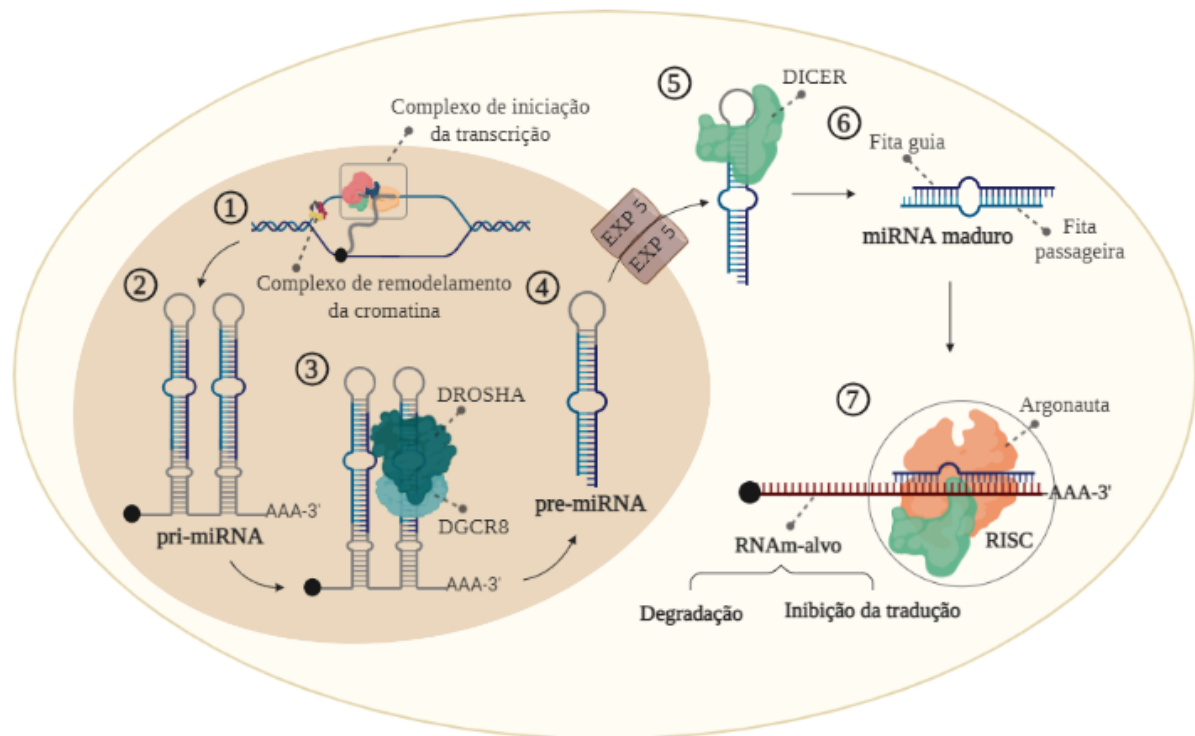


Figura 3. Biogênese e função dos miRNAs.

A biogênese de miRNAs tem início com o processo de transcrição, através da formação do complexo de iniciação, composto pela associação dos fatores gerais de transcrição com a RNA pol II (1), levando a formação de um miRNA primário (pri-miRNA) (2), o qual é processado ainda no núcleo celular pela enzima DROSHA, na presença de seu co-fator DGCR8 (3), dando origem a miRNAs precursores (pre-miRNA) (4). Estes, por sua vez, são exportados para o citoplasma pela proteína Exportina 5 (EXP 5), onde sofrem um processo de clivagem realizado pela enzima DICER (5), originando um duplex de miRNA, composto por duas fitas maduras (6). Uma das fitas (fita guia) é retida no complexo RISC e atua no processo de regulação da expressão gênica, através da degradação de RNAm-alvos, ou inibição da tradução (7). Figura criada no Biorender.

Comumente, no decorrer da progressão tumoral, a expressão de oncomiRs é aumentada. Por exemplo, Tupone *et al.*, (2020) mostraram que miR-378a-5p é *up*-regulado em melanoma metastático em relação a amostras de tecidos em estágios menos avançados e que a

superexpressão deste miRNA *in vitro* está associada ao aumento de invasão e migração, além de favorecer o processo de angiogênese *in vivo*, facilitando a progressão tumoral. Similarmente, o aumento da expressão de miR-204-5p e miR-211-5p em melanomas induz o crescimento tumoral *in vivo* e diminui a resposta ao tratamento com inibidores de BRAF (DIAZ-MARTINEZ *et al.*, 2018). Como esperado, a inibição destes miRNAs resulta na repressão do crescimento tumoral e aumento da resposta a tratamentos. De maneira oposta, miRNAs supressores normalmente tem sua expressão diminuída ao longo da progressão tumoral. Por exemplo, como recentemente reportado por nosso grupo de pesquisa, miR-195-5p é *down-regulado* no decorrer do desenvolvimento de melanomas e a inibição deste miRNA resulta na falta de regulação pós-transcricional e consequente superexpressão de PHB1, a qual está associada ao aumento da resistência a quimioterapia. A superexpressão de miR-195, além de induzir efeito citostático, resulta no aumento da sensibilidade das células a agentes alquilantes (temozolamida e cisplatina) e inibidores de BRAF (CIRILO *et al.*, 2017). Similarmente, a redução da expressão de outros miRNAs supressores, como miR-34 (YAMAZAKI *et al.*, 2012), miR-579-3p (FATTORE *et al.*, 2016), miR-16 (GUO *et al.*, 2015) e miR-497 (CHAI *et al.*, 2018) é observada durante os diferentes estágios de desenvolvimento do melanoma e a restauração da expressão destes miRNAs resulta em melhores respostas terapêuticas, retardando ou revertendo o desenvolvimento de resistência.

Atualmente diversos estudos estão sendo conduzidos com o intuito de avaliar a eficácia da utilização de terapias a base de miRNAs para o tratamento de patogêneses como o câncer (TITZE *et al.*, 2020). O primeiro estudo clínico conduzido neste sentido foi um estudo de fase 1 realizado para avaliar a segurança da utilização de nanopartículas (TargomiRs) enriquecidas em miR-16 para o tratamento de mesoteliomas (VAN ZANDWIJK *et al.*, 2017). Estas partículas foram desenvolvidas para realizar o *delivery* específico de miR-16 para células EGFR positivas e apresentaram boa tolerância em pacientes com mesoteliomas refratário, porém

novos estudos precisam ser conduzidos para avaliar o efeito destas partículas em combinação com outros agentes terapêuticos.

1.3.1. miR-195-5p

O miR-195 pertence à família miR-15/16/424/497, está localizado no cromossomo 17p13 e possui um promotor próprio. Este miRNA atua no controle de genes responsáveis pela regulação do ciclo celular, proliferação, migração, angiogênese, apoptose e invasão; E a desregulação de sua expressão está associada ao desenvolvimento de diversas patologias, incluindo o câncer (YU¹ *et al.*, 2018). Células tumorais comumente apresentam uma baixa expressão de miR-195-5p comparado a tecidos não-neoplásicos e diversos estudos já evidenciaram seu papel como supressor de tumor em diferentes neoplasias (ZHENG *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2013; YONGCHUN *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015). Um dos mecanismos de *down*-regulação de miR-195 em tumores é a hipermetilação de seu promotor gênico, como já reportado em câncer cervical (SHEN *et al.*, 2017), de mama (LI *et al.*, 2011), próstata (MA *et al.*, 2020) e gástrico (DENG *et al.*, 2013), por exemplo. Além disso, trabalhos recentes têm mostrado que a inibição por RNAs longos não codificantes (lncRNAs) também atua na supressão de miR-195 em células malignas (LIU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020).

A restauração da expressão deste miRNA, por transfecção, tratamento com inibidores de metiltransferases ou supressão de lncRNAs, já foi associada ao aumento da sensibilidade a quimioterápicos por diferentes trabalhos, incluindo docetaxel para câncer de próstata (MA *et al.*, 2018), doxorubicina para câncer de cólon (QU *et al.*, 2015), temozolamida para gliomas (WANG² *et al.*, 2019), cisplatina para câncer de ovário (DAI *et al.*, 2019), paclitaxel e eribulina para câncer de pulmão (YU² *et al.*, 2018) e agentes alquilantes e inibidores de BRAF para o tratamento de melanomas (CIRILO *et al.*, 2017). Além disso, o nível de miR-195 na circulação

sanguínea pode ser utilizado como biomarcador prognóstico em pacientes com tumores gástricos (SONG *et al.*, 2020), osteosarcoma (CAI *et al.*, 2015) e câncer de mama (SUETA *et al.*, 2017), sendo a baixa expressão relacionada a menor resposta terapêutica e maior probabilidade de recidiva. Em melanomas, dados do TCGA mostram que a baixa expressão de miR-195 apresenta uma tendência de associação com piores prognósticos (Figura 4).

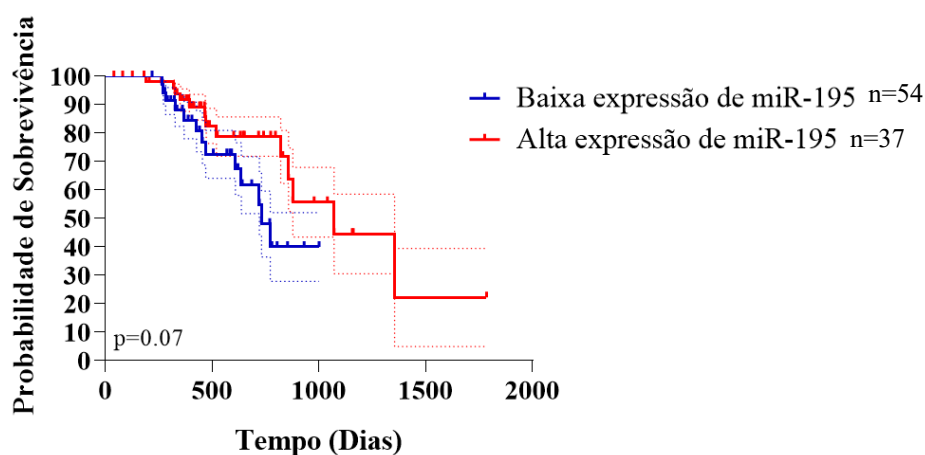


Figura 4. Expressão de miR-195 e sobrevida de pacientes com melanoma.

Dados do TCGA (SKCM/20160128) obtidos pelo software LinkedOmics. Os dados foram classificados em baixa ou alta expressão a partir da média. Linhas pontilhadas indicam o desvio padrão.

1.4. Vesículas Extracelulares

Vesículas Extracelulares (VEs) são partículas nanométricas delimitadas por uma bicamada lipídica análoga a membrana plasmática e desempenham papel fundamental no processo de comunicação intercelular, por meio do transporte e transferência de moléculas bioativas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (MAUS *et al.*, 2017). VEs podem ser classificadas principalmente em exossomos e microvesículas, de acordo com sua biogênese e tamanho (Figura 5). Exossomos possuem de 30 a 150 nm e são originados a partir de dobramentos da membrana de um endossomo inicial, que resultam em um acúmulo de vesículas intraluminais (ILV) em corpos multivesiculares (MVBs). Estes são secretados no espaço extracelular através de fusão com a membrana plasmática, seguida da exocitose das vesículas intraluminais, agora denominadas exossomos. As microvesículas, por sua vez, possuem de 100

a 1000 nm e são originadas por evaginações da membrana celular, com posterior fissão e consequente liberação no meio externo (VELLA *et al.*, 2017). Além disso, trabalhos recentes têm mostrado que células tumorais podem secretar VEs maiores, de 1 a 10 μm , as quais são denominadas oncossomos largos (MINCIACCHI *et al.*, 2015; CIARDIELLO *et al.*, 2019). Ainda, quando derivadas de células em processo de apoptose, as VEs são denominadas de corpos apoptóticos e geralmente possuem entre 50 e 5000 nm (JAISWAL & SEDGER, 2019).

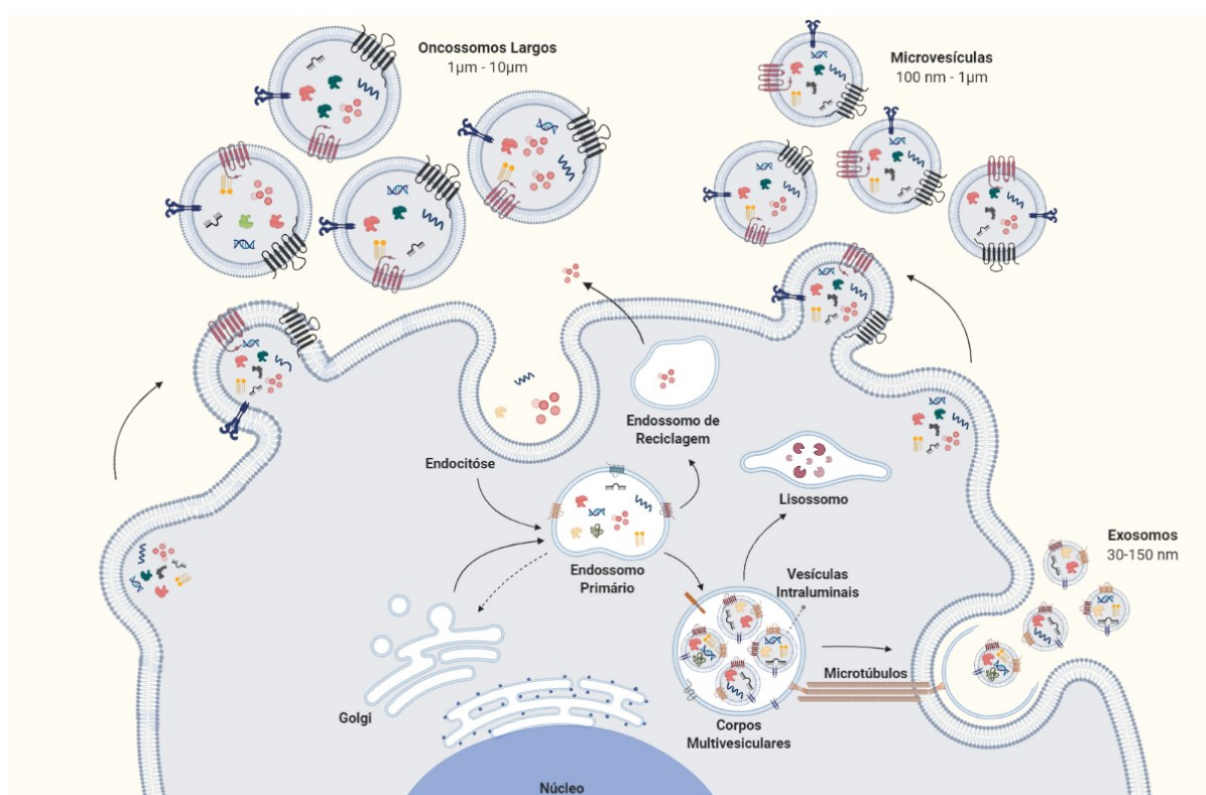


Figura 5. Biogênese e classificação das VEs.

Vesículas pequenas (30-150 nm) originadas a partir da via endossomal são denominadas exossomos. Vesículas maiores (100 – 1 μm), formadas a partir de brotamentos da membrana plasmática são denominadas microvesículas. Células tumorais também podem liberar oncossomos largos (1 – 10 μm) a partir de evaginações da membrana plasmática. Figura criada no Biorender.

Quando em contato com células receptoras, a internalização das VEs pode ocorrer via fusão direta com a membrana plasmática da célula recipiente ou via endocitose, a qual pode ser realizada por mediação proteica, pelas proteínas clatrina e caveolinas, lipídica (*lipid raft*) ou

fagocítica. Recentemente o papel das VEs no desenvolvimento e progressão de tumores despertou o interesse da comunidade científica, devido à capacidade que possuem de transportar moléculas tanto local como sistemicamente, podendo assim modular o microambiente tumoral e tecidos distantes, contribuindo com a progressão maligna (ABELS-BREAKEFIELD, 2016). Sabe-se que a carga presente em VEs reflete o estado fisiológico da célula parental e que células tumorais normalmente secretam maiores quantidades de VEs comparado a células saudáveis, com conteúdo diferente de acordo com o estágio do processo de tumorigênese em que se encontram. Dessa forma, a presença destas partículas em biofluidos, como sangue, urina e saliva, torna-as ferramentas promissoras para a identificação, estadiamento e acompanhamento de tumores (XU *et al.*, 2018).

É comumente observado que a transferência de informações via VEs pode induzir ou facilitar a aquisição e/ou transferência de fenótipos mais agressivos. No melanoma, a transferência de moléculas oncogênicas por VEs já foi associada a aquisição e favorecimento de diversos *hallmarks*, como indução de evasão do sistema imune (HUBER *et al.*, 2018; VIGNARD *et al.*, 2020), angiogênese (ZHOU *et al.*, 2018), metástase (SHU *et al.*, 2018), resistência a terapia (LUNAVAT *et al.*, 2017) e repopulação tumoral, como recentemente mostrado pelo nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 2019). Ainda, a alta expressão de genes envolvidos na biogênese de VEs, como RAB27A, RAB27B, RAB31 e RHOA estão associados a piores prognósticos em melanomas (Figura 6), evidenciando o papel destas partículas no favorecimento da progressão tumoral.

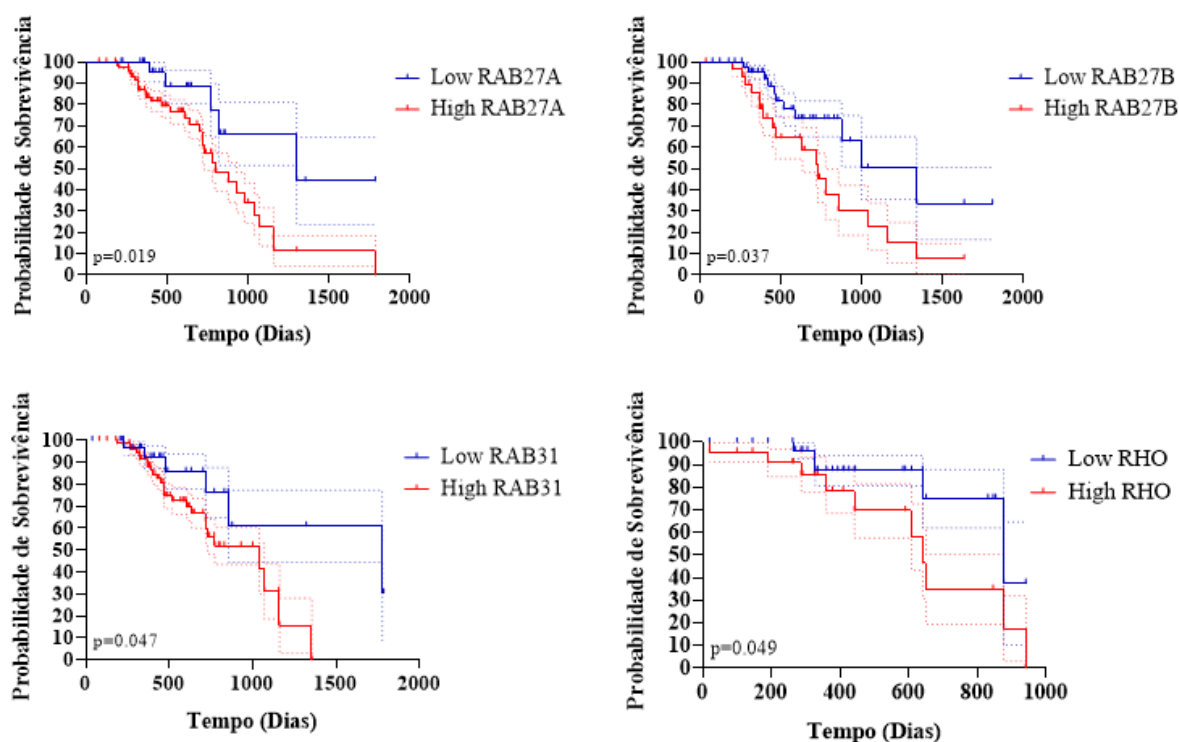


Figura 6. Alta expressão de genes envolvidos na biogênese de VEs está relacionada a pior prognóstico em melanoma.

Dados do TCGA (SKCM/20160128) obtidos pelo software LinkedOmics. *Low* RAB27A n=24, *High* RAB27A n=74; *Low* RAB27B n= 43, *High* RAB27B n=73; *Low* RAB31 n=33, *High* RAB31 n=121; *Low* RHO n=32, *High* RHO n=55. Os dados foram classificados em *low* ou *high* a partir da média dos valores de expressão dos respectivos genes. Linhas pontilhadas indicam o desvio padrão.

A transferência de miRNAs via VEs desempenha papéis importantes na regulação destes processos. Como esperado, a presença de oncomiRs nestas partículas e consequente transferência para células receptoras, é associada ao favorecimento da progressão tumoral. Por outro lado, VEs enriquecidas com miRNAs supressores são capazes de inibir o crescimento de tumores e aumentar a resposta de células malignas ao tratamento. Em melanomas, VEs derivadas de pacientes com tumor primário possuem maiores quantidades de miRNAs supressores, como miR-34a, e são capazes de induzir efeito supressivo no crescimento tumoral, enquanto VEs provenientes de pacientes metastáticos apresentaram efeito oposto (LEE *et al.*, 2019). Além disso, maiores níveis de miRNAs antitumorais, como o miR-497 em VEs de pacientes sob tratamento alvo-dirigido combinado, estão associados a melhores prognósticos

em casos de melanoma em estágio avançado (SVEDMAN *et al.*, 2018). Similarmente, maiores quantidades dos supressores tumorais miR-145 e miR-16 estão associadas a melhor resposta a terapia em tumores de próstata (GONG *et al.*, 2015) e gástricos (VENTURUTTI *et al.*, 2016), respectivamente.

A capacidade que VEs possuem em carregar moléculas para células e/ou tecidos específicos torna-as veículos promissores para o *delivery* de agentes antitumorais (PARAYATH *et al.*, 2020). Neste sentido, atualmente, diferentes trabalhos estão sendo conduzidos com o intuito de modular a carga de VEs, para que estas partículas passem a favorecer o tratamento de tumores, através da transferência de moléculas antineoplásicas, melhorando assim o prognóstico de pacientes oncológicos. Por exemplo, Naseri *et al.*, (2018) modularam a carga de exossomos derivados de células-tronco mesenquimais, incorporando moléculas capazes de inibir os oncomiRs miR-150 e miR-142-3p. Quando administradas *in vivo*, estas partículas foram capazes de penetrar a massa tumoral e realizar o *delivery* de anti-miR-150 e anti-miR-142-3p, inibindo o crescimento de tumores de mama (NASERI *et al.*, 2018). Adicionalmente, Nie *et al.*, (2020) mostraram que VEs enriquecidas com o supressor tumoral miR-126 são capazes de inibir o crescimento, migração e potencial metastático de células de câncer de pulmão. De maneira similar, Li *et al.*, (2017) reportaram que a superexpressão de miR-195 em fibroblastos resultou na secreção de VEs enriquecidas com este miRNA, as quais puderam inibir o crescimento e invasão de colangiocarcinomas *in vivo*. Apesar de diferentes trabalhos mostrarem que a presença de miRNAs supressores em VEs está associada a melhores respostas terapêuticas em melanomas, até o presente momento, a modulação da carga de miRNAs destas partículas ainda não foi reportado.

2. OBJETIVOS

Estudar o efeito de vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano transfectadas com o miRNA-195 na sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido de células tumorais *naïve*.

2.1. Objetivos específicos

- i. Avaliar o efeito da super-expressão do miR-195 em células de melanoma humano BRAF^{V600E} na secreção de VEs, determinando-se a concentração e tamanho dessas partículas, além da presença desse miRNA nas mesmas;
- ii. Avaliar o efeito de VEs oriundas de células que superexpressam miR-195 em células tumorais *naïve* (receptoras) quanto à proliferação, viabilidade, morte e sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido, além de alterações em genes alvo dos miRNAs presentes nas VEs;
- iii. Avaliar o efeito das VEs contendo miR-195 no crescimento tumoral *in vivo*;
- iv. Avaliar o perfil de metilação da região promotora e gênica do mir-195 em células de melanoma e o efeito de agentes demetilantes na re-expressão desse miRNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura celular

Os experimentos foram realizados com a linhagem de melanoma primário A375 e as linhagens de melanoma metastático SKMel-05, SKMel-28 e UACC-62, portadoras da mutação BRAF^{V600E}. As células foram submetidas a teste de contaminação por micoplasma periodicamente. Para manutenção em cultura, SKMEL-5 e SKMel-28 foram mantidas em meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 mM de piruvato de sódio e A375 e UACC-62 em meio DMEM acrescido de 10% de SFB, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Para experimentos envolvendo adição ou extração de VEs, as células foram incubadas com SFB depletado de vesículas (centrifugado por 2hs, 4°C, a 100.000g).

3.2. Superexpressão do miR-195

A superexpressão do miR-195 (Syn-hsa-miR-195-5p, 5'-UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC -3') (QIAGEN) foi realizada via transfecção reversa através do reagente Lipofectamina RNAiMax 2000 (Termo Fisher Scientific). O processo consiste na adição do mix, contendo mir-195 ou controle (10 nM) e lipofectamina, seguida da adição da suspensão celular aos respectivos poços contendo o mix. *STARS Negative Control siRNA* (sequência de propriedade da empresa - QIAGEN) foi utilizado como controle.

3.3. Isolamento e caracterização das VEs

O isolamento das vesículas extracelulares foi realizado 72 horas após a transfecção, com base em protocolo estabelecido por Théry *et al* (2006). Os sobrenadantes das células transfectadas foram submetidos a duas centrifugações iniciais para a remoção de células mortas e restos celulares, 300 g por 10 minutos, seguida de 2000 g por 10 minutos, ambas a

temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi então ultracentrifugado a 10.000 g por 30 min a 4° C para remoção de *debris*, seguido de 100.000 g por 2 horas a 4°C. O pellet enriquecido em VEs foi ressuspensionado em PBS 1X de acordo com o número de células totais ao fim do experimento (100 µL para cada 10⁶ células) e armazenado a - 80° C até o momento de uso. A quantificação e a análise do perfil das VEs isoladas foram realizadas em equipamento NanoSight NS3000 (Malvern) (5 medidas de 60 segundos cada). Previamente aos ensaios funcionais, as VEs foram tratadas com RNase A (400 ng/µL) por 30 minutos a 37° C para evitar contaminação com RNAs externos, como proposto por VERWEIJ *et al.*, (2013).

3.4. Extração de RNA e RT-qPCR

A extração de RNA total de células foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific). RNAs pequenos (<200 nucleotídeos) foram extraídos de VEs através do kit miRCURY Small RNA Isolation Kit (Exiqon) ou miRNAeasy Cells and Tissues (QIAGEN). O RNA obtido foi submetido à leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ para obtenção da concentração e razões qualitativas de contaminação proteica e fenólica. Para análise da expressão do miR-195 o kit TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para síntese de cDNA e posterior amplificação. RNU48 foi utilizado como controle endógeno. Para a análise da expressão dos lncRNAs, RAB27A, RAB27B, RA31 e CDC42, o cDNA foi sintetizado através do Kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems) e amplificado com Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). GAPDH, β-ACTINA e HPRT foram utilizados como controle endógeno. Os dados foram analisados por meio do método quantitativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme proposto por Livak e Schmittgen (2001). Os níveis de expressão de miR-195 em VEs foram normalizados através da utilização de quantidades iguais de RNA total e comparação com VEs controle ($\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ VEs miR-195 tratadas com Proteinase + RNase A}) - (Ct \text{ VEs$

miR-195 tratadas com Triton + Proteinase + RNase A) - [(Ct VEs controle tratadas com Proteinase + RNase A) – (Ct VEs controle tratadas com Triton + Proteinase + RNase A)]. Todas as reações foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific).

Gene	Forward	Reverse
β-ACTINA	5'-AGAAAATCTGGCACCACA-3'	5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'
BANCR	5' - CGGTGTAACGGAGGCAGTTAG - 3'	5' - CACACAGTGAGCCACTCCAC - 3'
CDC42	5' - GCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA - 3'	5' - TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA - 3'
FOXD2-AS1	5' - AAAGAAAAGCCCTCCAGCGA - 3'	5' - CCTCAGGACAAACTCCGCTT - 3'
GAPDH	5'-TGCACACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGTGGACTGTGGTCATGAG-3'
HPRT	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAGT-3'	5'-TCTCGAGCAAGAGGTTTCAGT-3'
LINC00473	5' - GAGTAGACTTTTCCCCACAGA - 3'	5' - CACACAGCTTCAAGTCCACG - 3'
LINC00511	5' - CACACTCGTCTTCTGTCCCC - 3'	5' - CTCCTTGGGCAAACAACCG - 3'
PVT1	5'-ATAGATCCTGCCCTGTTTGC-3'	5'-CATTTCCCTGCTGCCGTTTTTC-3'
RAB27A	5' - AGAGGAGGAAGCCATAGCAC - 3'	5' - CATGACCATTTGATCGCACCAC - 3'
RAB27B	5' - GGAAGTGGCTGACAAATATGG - 3'	5' - CAGTATCAGGGATTTGTGTCTT - 3'
RAB31	5' - ATCTTTGGGCTGGGTTTG - 3'	5' - ATGGGCTCATTAGTGGGTAG - 3'

Tabela 1. Sequência de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

3.4.1. Análise do perfil de expressão gênica

A expressão gênica de 96 transcritos, previamente selecionados de acordo o fenótipo observado nas células recipientes após o tratamento com VEs, foi realizada por RT-qPCR em sistema microfluídica utilizando os equipamentos Juno-Biomark HD (Fluidigm). O RNA total de células foi extraído por TRIzol® (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) e quantificado no aparelho NanoDrop™. Em seguida, 35ng de RNA total foram convertidas em cDNA, o qual foi submetido a uma etapa de pré-amplificação seguida de tratamento com exonuclease para remoção de primers não incorporados. O produto final foi diluído 10x e submetido à amplificação no Biomark HD. β-ACTINA, B2M, GUSB, HPRT, RPLP0 e TFRCG foram utilizados como controles endógenos. O software Fluidigm RT-qPCR foi utilizado para visualização das curvas e obtenção dos Cts. O software NormFinder foi utilizado para determinação dos endógenos mais estáveis dentre os grupos experimentais. Os dados foram

analisados por meio do método quantitativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O software R foi utilizado para a clusterização das amostras em *heatmap* através do pacote *pheatmap*.

3.5. Avaliação da internalização das VEs

As VEs foram marcadas com o corante lipofílico PKH26 (Sigma Aldrich), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Após o período de incubação, a solução de VEs contendo o corante foi filtrada em colunas (MW3000 – Invitrogen- Thermo Fischer Scientific) para a remoção do corante excedente. PBS foi utilizado como controle negativo. Em seguida, diferentes concentrações de VEs marcadas foram adicionadas às células previamente plaqueadas. Aproximadamente 18 horas após a adição de VEs, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência.

3.6. Atividade metabólica (atividade da succinato desidrogenase)

A avaliação da atividade metabólica celular foi realizada pelo método colorimétrico do sal amarelo de tetrazolium [MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5- difenil brometo de tetrazolina). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^3); para avaliação do efeito das VEs, diferentes concentrações destas foram adicionadas e repostas diariamente. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Ao término do período de incubação, 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço da placa, e esta foi incubada novamente (2 horas, 37°C e 5% de CO₂). Em seguida, as células foram lisadas com dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância lida em leitor de microplaca a 570 nm.

3.7. Proliferação celular

A proliferação foi analisada em aparelho Countess-Automated Cell Counter, ou através da contagem em câmara de Neubauer, por meio da adição de uma alíquota de 10 µL da suspensão celular corada com o corante azul de tripan 0,1% em PBS.

3.8. Perfil de ciclo

O perfil de ciclo celular foi analisado através da coloração com Iodeto de Propídeo. Primeiramente as células foram fixadas com etanol 70% e armazenadas a -20°C por pelo menos 2 horas. Em seguida, as mesmas foram lavadas com PBS 1x e coradas com PI por 30 minutos no escuro. A leitura de fluorescência foi feita em citômetro de fluxo (Attune, Thermo Fisher Scientific) e a análise da distribuição do ciclo celular e morte celular (Sub-G1, G1, S, G2/M) foi analisada no software FlowJo v10.

3.9. Ensaio clonogênico

Células viáveis foram plaqueadas em uma proporção de 20 células/cm² e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por cerca de 15 dias. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas através da adição da solução de fixação (formaldeído/PBS 3,7%). Em seguida, foram lavadas com PBS novamente, coradas com 0,1% de cristal violeta, e incubadas por 10 minutos. Após este período, o excesso de corante foi removido por lavagem com PBS e o número de colônias (>30 células) foi contado após secagem a temperatura ambiente.

3.10. Tratamento alvo-dirigido combinado

As células (1x10⁴) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 horas os inibidores de BRAF (PLX) e MEK (PD) foram adicionados (1 + 1 µM). Após 72 horas, proliferação, viabilidade, clonogenicidade e taxa de morte celular foram avaliadas, conforme descrito anteriormente.

3.11. Tratamento com Azacitidina

Primeiramente as células foram plaqueadas (1×10^4) em placas de 24 poços. Após 24 horas diferentes concentrações de Azacitidina foram adicionadas (1 ou 2,5 μM). O tratamento foi realizado por 48 horas, com reposição diária da droga. Após este período avaliou-se número de células, perfil de ciclo e expressão do miR-195.

3.12. Eletroporação de VEs

Para a realização dos experimentos *in vivo* VEs foram eletroporadas com miR-195 ou controle. As VEs (10^9 partículas) foram ressuspendidas em 150 μL do tampão de eletroporação (ácido cítrico 0,02M, fosfato dissódico 0,03M e EDTA 0,1 mM, $\text{pH}=4,4$) e eletroporadas com miR-195 ou controle (10nM) através do aparelho BTX (Gemini), utilizando-se 10 pulsos de 10 ms e 750V. Em seguida, a suspensão foi incubada por 15 min a temperatura ambiente, permitindo a reintegração da membrana. O *pellet* de VEs, obtido 2 horas após ultracentrifugação a 100.000 g (4°C), foi ressuspendido em 100 μL de PBS 1X e tratado com RNase A (400 ng/ μL) por 30 minutos a 37°C para eliminação de RNAs não incorporados. Em seguida as VEs foram quantificadas novamente em aparelho NanoSight, como descrito anteriormente.

3.13. Crescimento tumoral *in vivo*

Os animais (machos Balb/C nu/nu, de cerca de 9 semana de vida) foram inoculados s.c. com células de melanoma humano (A375, 10^6 células por animal) mais VEs (10^8). As células foram previamente tratadas com VEs (10^8 partículas/mL) por 72 horas (adição diária). Nove dias após a inoculação, quando os camundongos apresentaram tumores palpáveis não mensuráveis (PNMs), VEs foram administradas via intra-tumoral (10^8). A injeção de VEs foi realizada a cada 3 dias, por 5 vezes. Os grupos foram compostos por: animais inoculados com

células tumorais mais VEs controle (n=5) e animais inoculados com células tumorais mais VEs miR-195 (n=5). Ao fim do experimento, os animais foram eutanasiados para remoção do tumor e análise de expressão gênica. As VEs utilizadas neste experimento foram eletroporadas com miR-195 ou controle, como descrito anteriormente.

3.14. Análises *in silico*

Análises de correlação da expressão gênica e sobrevida foram realizadas através do portal LinkedOmics v.1, utilizando dados do TCGA (SKCM/20160128). O perfil de metilação do miR-195 em tecidos de melanoma e não-tumorais foi obtido a partir de dados do TCGA, através do software SMART v.1 (*Shiny Methylation Analysis Resource Tool*). A análise da expressão de lncRNAs capazes de inibir miR-195 foi realizada a partir dos bancos de dados TCGA e GSE4587, através dos softwares GEPIA v.1 (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*) e GENT v.2 (*Gene Expression patterns across Normal and Tumor tissues*), respectivamente.

3.15. Análise estatística

Diferenças entre três ou mais grupos foram analisadas por *One* ou *Two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni, e entre dois grupos por teste *t* de Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism v8.01. $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. A superexpressão de miR-195 modula o perfil de vesiculação de células de melanoma

A fim de analisar o efeito da superexpressão de miR-195 na transferência horizontal de informação via VEs, células A375, SKMel-5, SKMel-28 e UACC-62 foram transfectadas com miR-195 ou controle negativo (10nM) por até 72 horas. Em concordância com resultados previamente reportados por nosso grupo (CIRILO *et al.*, 2017) a superexpressão do miR-195, resultou em efeito antiproliferativo em células de melanoma, ocasionando na diminuição do número de células viáveis nos tempos de 48 e/ou 72 horas ($p < 0.01$; Fig. 7a-d). Ainda, análise do perfil de ciclo mostrou que células transfectadas com o miR-195 apresentam maior porcentagem de morte celular, evidenciada pelo aumento na população hipodiplóide (sub-G1), e diminuição da porcentagem de células na fase G2/M ($p < 0.05$; Fig. 7e) para as linhagens SKMel-5, SKMel-28 e UACC-62, sendo o efeito citotóxico mais pronunciado nesta última. A superexpressão do miR-195 foi confirmada por RT-qPCR, 48 e/ou 72 horas após a transfecção (Fig. 7f).

Para análise do efeito da expressão de miR-195 no perfil de vesiculação das células, VEs foram isoladas por ultracentrifugação diferencial 72 horas após a transfecção e caracterizadas em aparelho NanoSight (NS 300, Malvern) quanto ao tamanho e a concentração. Células A375, SKMel-5 e SKMel-28 transfectadas com o miR-195 secretaram maior quantidade de partículas comparadas aos controles ($p < 0.001$; Fig. 8a-c). VEs derivadas da linhagem UACC-62 não atingiram os critérios mínimos para quantificação no aparelho NanoSight (conforme proposto pelo fabricante), possivelmente devido a características intrínsecas da linhagem (menor produção de VEs em comparação as demais). O escalonamento da quantidade de células transfectadas, necessário para a aquisição de

quantidades mínimas que permitissem a quantificação no NanoSight, seria desafiador. Por isso, o projeto prosseguiu com as demais linhagens. As VEs apresentaram tamanho médio de 200 nm, sendo este significativamente menor para VEs secretadas por células A375 e SKMel-28 superexpressando miR-195 (156 nm comparado a 188 nm para A375 e 197 nm comparado a 219 nm para SKMel-28).

Em concordância, análises de expressão gênica por RT-qPCR confirmaram o aumento da expressão de GTPases envolvidas na biogênese de exossomos, incluindo RAB27B, RAB31 e FLOT2 (Fig. 8d) após transfecção com miR-195. Além disso, a expressão de CDC42, um *target* predito de miR-195, e da GTPase RHOA, ambos envolvidos na biogênese de microvesículas, foi diminuída nas linhagens SKMel-28 e A375, respectivamente (Fig. 8d), o que pode estar associado a diminuição da liberação de vesículas maiores em células superexpressando miR-195 (WANG *et al.*, 2021). Dados do TCGA mostram que em melanomas a expressão de miR-195 tem uma correlação positiva com a expressão de RAB31 (Fig. 9a, $p=0.0175$). A transfecção do controle negativo não apresentou nenhum efeito no perfil de vesiculação em comparação aos controles (células não transfectadas e células tratadas somente com lipofectamina) (Fig. 9b-d).

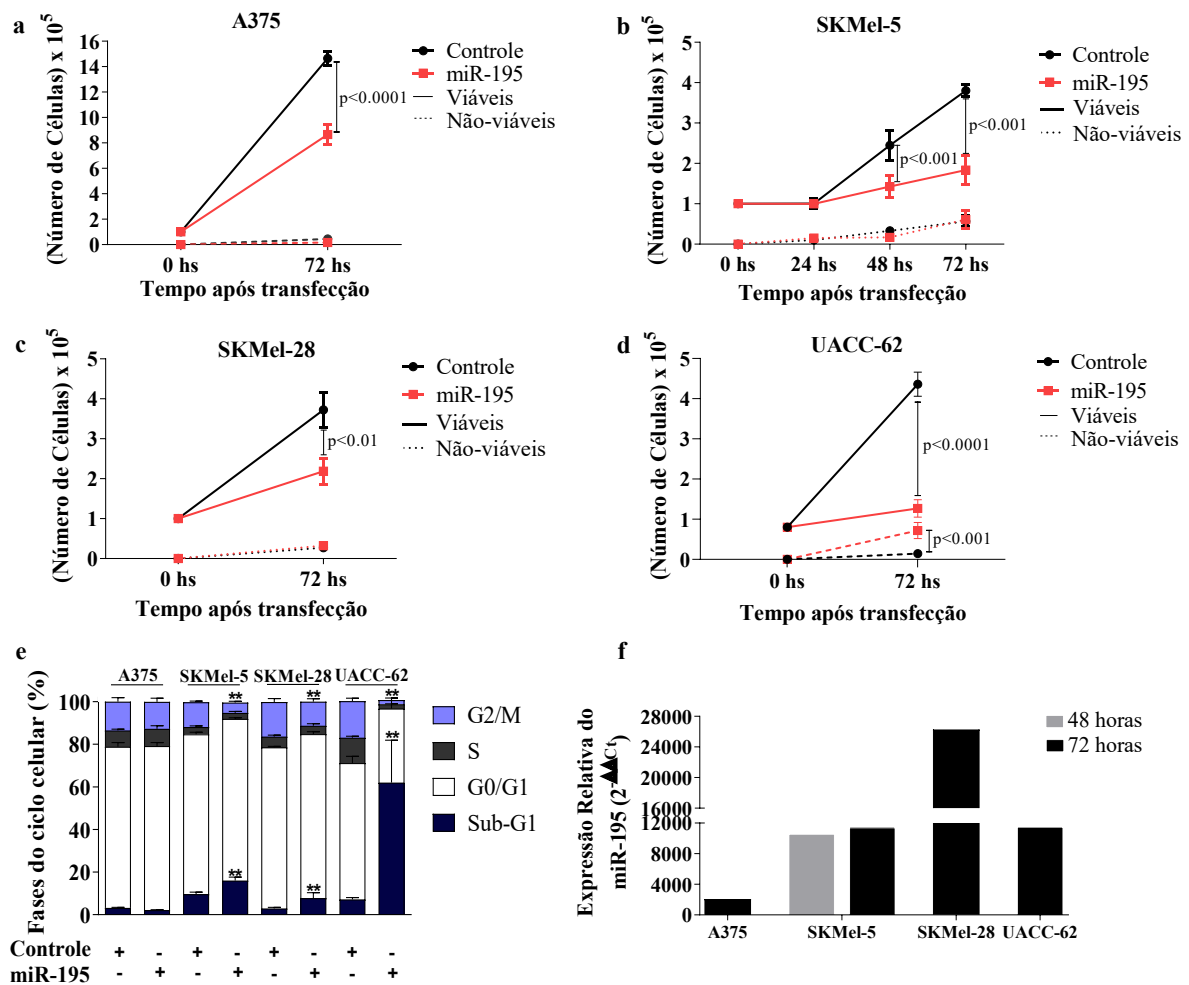


Figura 7. Efeito da superexpressão de miR-195.

Diferentes linhagens de melanoma humano metastático foram transfectadas com controle negativo (miR-controle) ou miR-195 (10 nM). **a-d**: Número de células obtido através da contagem com azul de tripan. **e**: Perfil de ciclo de células coradas com iodeto de propídeo. **f**: Expressão do miR-195 48 e 72 horas após transfecção. RNU48 foi utilizado como controle endógeno e células transfectadas com o controle foram utilizadas como amostras referência. Análises estatísticas foram realizadas pelo método *One-way* ANOVA e pós-teste *t* de Student. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n = 3$. Resultados representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

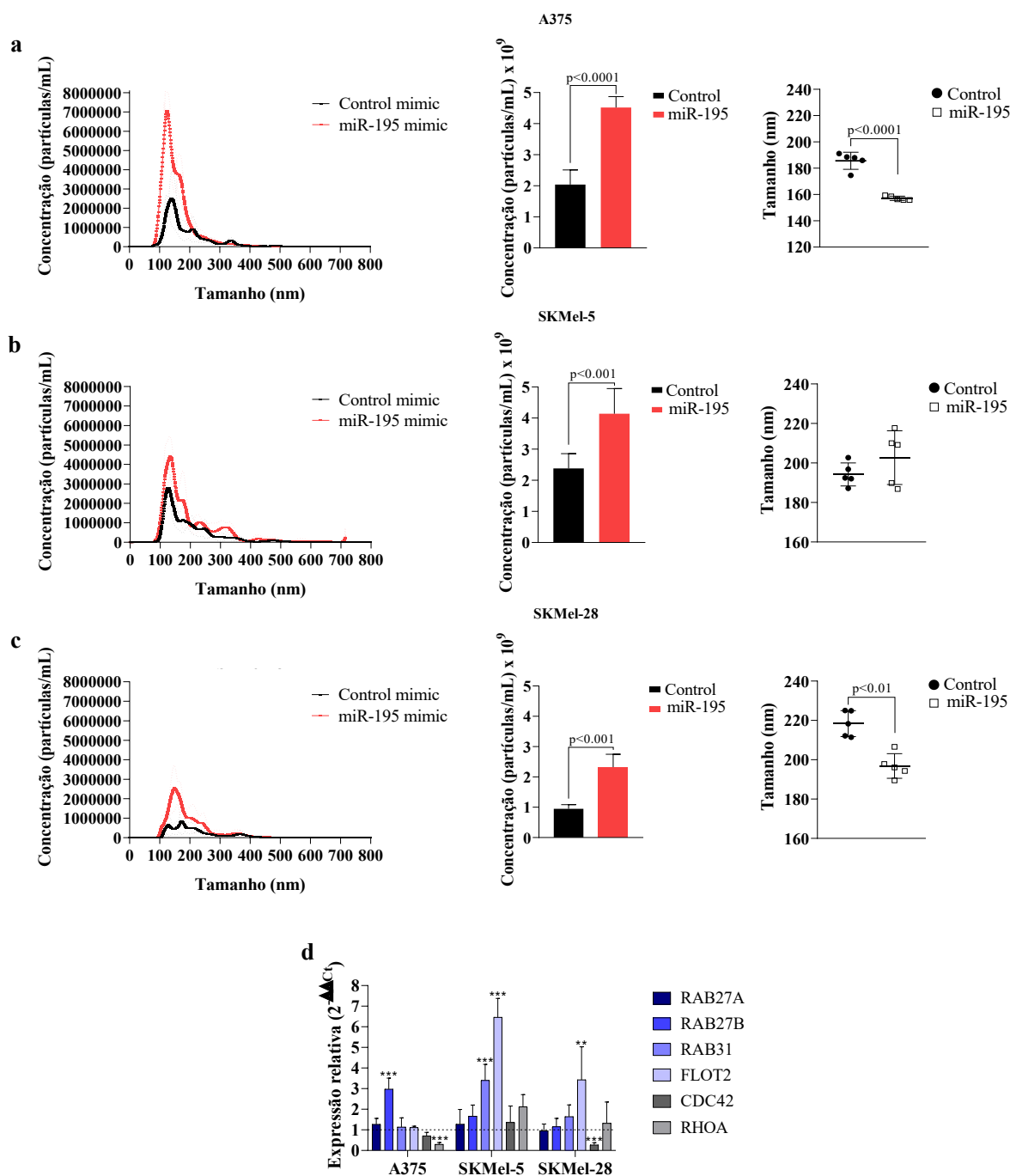


Figura 8. Perfil de vesiculação 72 horas após transfecção com controle ou miR-195.

Resultados obtidos através do aparelho NanoSight NS300 (Malvern). **a-c:** Perfil de VEs secretadas, mostrando a concentração e tamanho médio das VEs. Linhas pontilhadas representam o desvio padrão. **d:** Expressão relativa de genes envolvidos na biogênese de VEs após transfecção com miR-195. GAPDH e β -ACTINA foram utilizados como controle endógeno e células transfectadas com o controle foram utilizadas como amostras referência. Análises estatísticas foram realizadas pelo método *One-way* ANOVA e pós-teste *t* de Student ou *Two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. $n=5$. Resultados representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

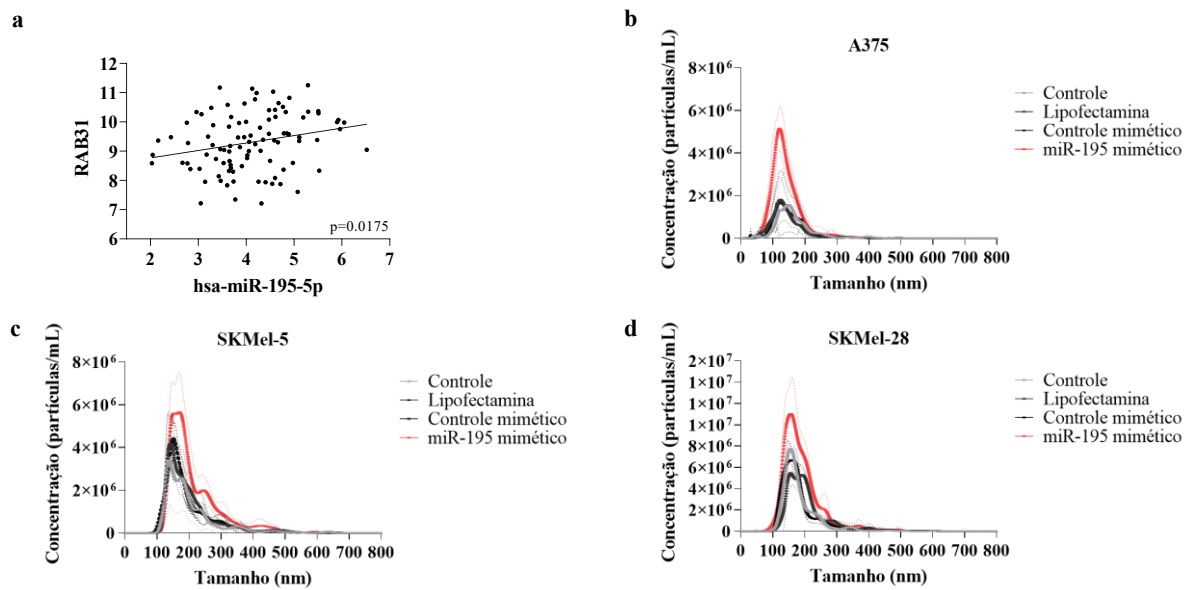


Figura 9. Perfil de vesiculação 72 horas após transfecção ou tratamento somente com lipofectamina. **a:** Correlação entre a expressão de GTPases envolvidas da biogênese de exossomos e miR-195 em melanomas. Dados do TCGA (SKCM/20160128) obtidos pelo software LinkedOmics. **b-d:** Perfil de VEs secretadas. Resultados obtidos através do aparelho NanoSight NS300 (Malvem). Linhas pontilhadas representam o desvio padrão.

4.2. VEs são capazes de transferir o efeito antiproliferativo de miR-195

Previamente aos ensaios funcionais, a incorporação de VEs por células tumorais *naïve* (i.e, que não expressam miR-195) foi analisada através da marcação destas partículas com o corante lipofílico PKH26. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência, após incubação *overnight*, mostraram um perfil de incorporação citoplasmático e nuclear (Fig. 10a). Em seguida, a fim de verificar o efeito de VEs secretadas por células que superexpressam miR-195 (VEs miR-195) em células receptoras, células *naïve* foram incubadas com diferentes concentrações de VEs, por até 72 horas, com adição diária destas nanopartículas. Nossos resultados mostraram que VEs miR-195 são capazes de diminuir a viabilidade de células receptoras (Fig. 10b, $p < 0.001$), medida indiretamente por ensaio de MTT, quando adicionadas diariamente nas concentrações de 10^8 partículas/mL para A375, $5 \cdot 10^6$ e 10^7 para SKMel-5 e $5 \cdot 10^7$ e 10^8 para SKMel-28. VEs miR-195 também foram capazes de exercer efeito antiproliferativo, resultando na diminuição do número de células viáveis (Fig. 10c, $p < 0.001$), e na porcentagem de células na fase G2/M (Fig. 10d; $p < 0.05$).

A análise do perfil de expressão gênica de células receptoras mostrou que o tratamento com VEs miR-195 resultou na diminuição da expressão de genes preditos como *targets* de miR-195 que estão envolvidos na indução de proliferação celular (CCND1 e YAP1). Além disso, VEs miR-195 induziram o aumento da expressão de inibidores de ciclinas dependentes de quinases (CDKN1A e CDKN3) que atuam inibindo a progressão do ciclo celular (Fig. 10e). Células tratadas com VEs miR-195 apresentaram aumento da expressão deste miRNA (Fig. 10f) evidenciando a transferência de miR-195 via VEs, o qual está presente em maior quantidade em VEs miR-195 comparado a VEs controle (Fig. 10g). O efeito citostático das VEs miR-195 não foi alterado após tratamento com RNase A, mostrando que este é inteiramente decorrente da transferência de cargo entre VEs e células receptoras (Fig. 11a-c). Além disso, o

meio condicionado de células transfectadas não apresentou efeito na viabilidade de células *naïve* após a depleção de VEs (Fig. 12d), mostrando que o efeito é mediado por estas partículas.

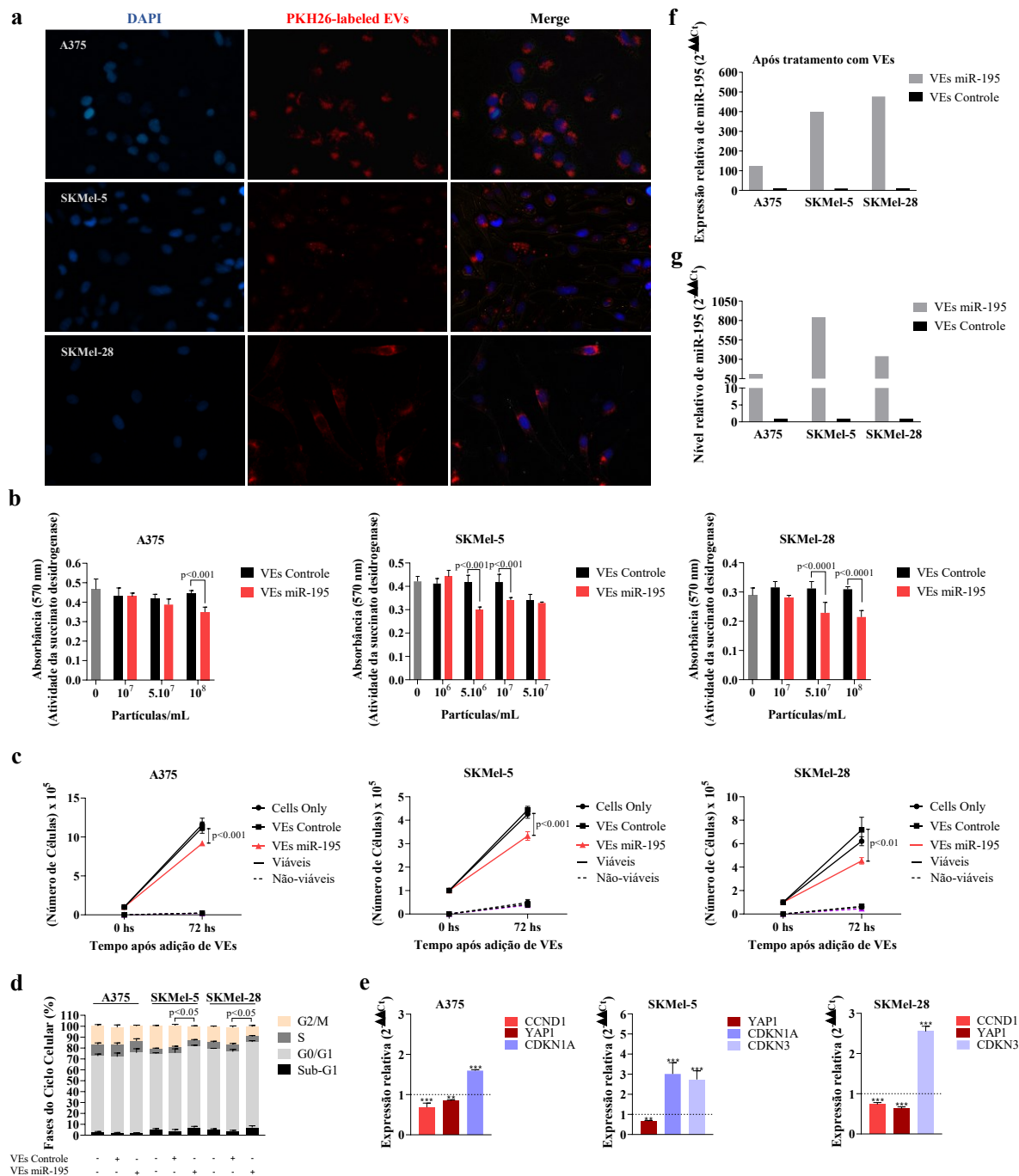


Figura 10. VEs derivadas de células que superexpressam miR-195 induzem efeito citostático em células *naïve*.

a: Perfil de Incorporação de VEs marcadas com PKH26 após incubação *overnight*. As VEs foram incubadas por 5 min com PKH26. Em seguida o excesso do corante foi removido através de colunas Exosome Spin Columns. Após incubação *overnight*, as VEs não incorporadas foram retiradas por lavagem

com PBS 1X e as imagens obtidas em microscópio de fluorescência (aumento 20X). **b**: Atividade mitocondrial medida pelo ensaio de MTT em 72hs após incubação com VEs. **c**: Número de células obtido através da contagem com azul de tripan. **d**: Perfil de ciclo de células coradas com iodeto de propídeo. **e**: genes diferencialmente expressos em células tratadas com VEs miR-195 em relação a células tratadas com VEs controle após 72hs de incubação. Resultados obtidos por RT-qPCR microfluídica. GUSB, TRFCG, RPLP0 e HPRT1 foram utilizados como controle endógeno. **f**: Expressão do miR-195 em células *naïve* após tratamento com VEs por 72hs. RNU48 foi utilizado como controle endógeno. **g**: Expressão do miR-195 em VEs obtida por RT-qPCR. Os níveis de expressão de miR-195 foram normalizados através da utilização de quantidades iguais de RNA total e comparação com VEs controle ($\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ VEs miR-195 tratadas com Proteínase + RNase A}) - (Ct \text{ VEs miR-195 tratadas com Triton + Proteínase + RNase A})] - [(Ct \text{ VEs controle tratadas com Proteínase + RNase A}) - (Ct \text{ VEs controle tratadas com Triton + Proteínase + RNase A})]$). Análises estatísticas foram realizadas por *one-way* ANOVA e pós-teste *t* de student ou *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferoni. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

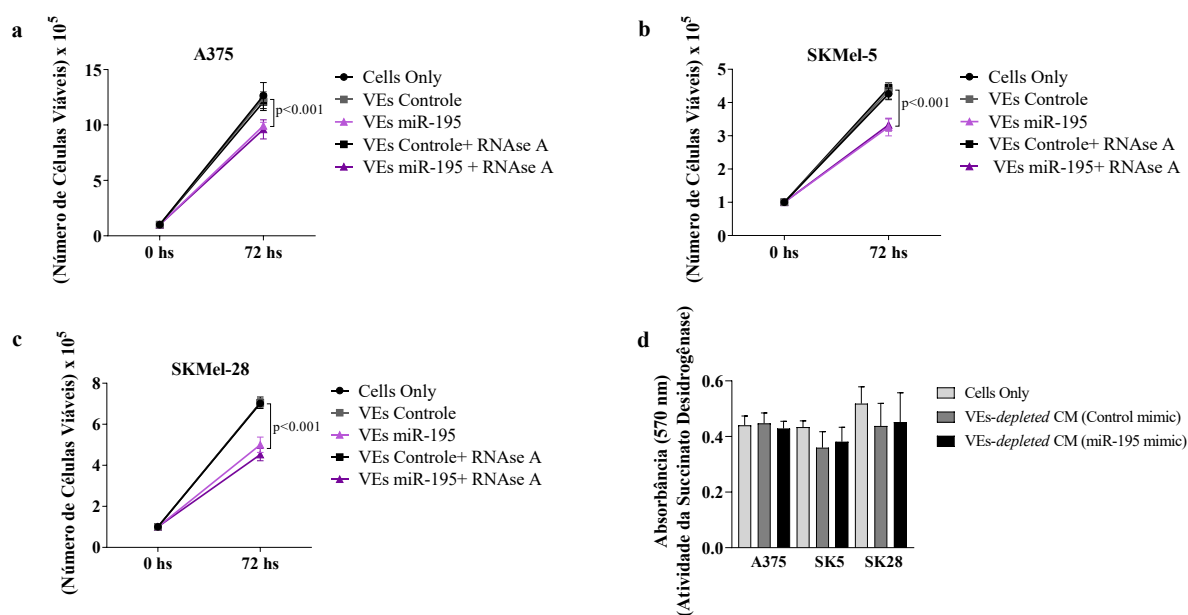


Figura 11. Efeito de VEs miR- 195 após tratamento com RNase A.

a-c: Número de células obtido através da contagem com azul de tripan. **d**: Atividade mitocondrial medida indiretamente por ensaio de MTT de células tratadas com o meio condicionado depletado de VEs oriundo de células transfectadas com o miR-195 ou controle. Análises estatísticas foram realizadas pelo método *two-way* ANOVA pós-teste de Bonferoni. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.3. VEs secretadas por células que superexpressam miR-195 são capazes de sensibilizar células *naïve* a terapia alvo-dirigida combinada

A restauração da expressão do miR-195 em tumores já foi associada ao aumento da sensibilidade a quimioterápicos por diversos trabalhos, incluindo agentes alquilantes e inibidores de BRAF para o tratamento de melanomas (CIRILO *et al.*, 2017), docetaxel para câncer de próstata (MA *et al.*, 2018), doxorubicina para câncer de cólon (QU *et al.*, 2015), temozolamida para gliomas (WANG² *et al.*, 2019) e cisplatina para câncer de ovário (DAI *et al.*, 2019). Entretanto, nenhum destes estudos avaliou o efeito da expressão de miR-195 na comunicação célula-célula via VEs. Como a presença de miRNAs supressores tumorais em VEs tem sido associada com melhores respostas ao tratamento alvo dirigido em melanomas (LEE *et al.*, 2019; SVEDMAN *et al.*, 2018), nós hipotetizamos que as VEs derivadas de células que superexpressam miR-195 pudessem aumentar a sensibilidade de células *naïve* a terapia.

O tratamento alvo-dirigido combinado, com o inibidor de BRAF (vemurafenibe, PLX) mais o inibidor de MEK (cobimetinibe, PD), foi padronizado previamente a análise do efeito das VEs na sensibilidade de células receptoras a estas drogas. Diferentes concentrações foram testadas levando em consideração dados já reportados na literatura (NIESSNER *et al.*, 2017; ROWDO *et al.*, 2017; STRUB *et al.*, 2018). A adição de PLX + PD (1:1 μM) por 72 horas, resultou no aumento da porcentagem de células mortas (população sub-G1) e na diminuição do potencial clonogênico das células, quando comparado com a monoterapia com ambos os inibidores. Não houve diferença estatística entre as concentrações 1:1 μM e as demais combinações (Fig. 12).

O tratamento somente com os inibidores da via MAPK induziu efeito antiproliferativo (Fig. 13a, $p < 0.01$) e citotóxico (Fig. 13b, $p < 0,05$) e reduziu o potencial clonogênico das células, resultando em menor número de colônias, para as linhagens SKMel-5 e SKMel-28 (Fig. 13c, $p < 0.05$) e menor diâmetro dos clones, nas três linhagens (Fig. 13d, $p < 0.05$). O tratamento

somente com VEs miR-195 também foi capaz de reduzir a clonogenicidade das linhagens SKMel-5 e SKMel-28 (Fig. 13c, $p < 0.01$). O tratamento combinado com as drogas mais VEs miR-195 foi capaz de aumentar significativamente a sensibilidade das células à terapia combinada, resultando em menor número de células viáveis (Fig. 13a, $p < 0.05$), maior porcentagem de morte celular (Fig. 13b, $p < 0.05$) e menor potencial clonogênico (Fig. 13c, $p < 0.05$).

A fim de analisar o perfil de expressão gênica após o tratamento alvo-dirigido combinado em conjunto com VEs miR-195, realizamos uma RT-qPCR por microfluídica. A clusterização das amostras em *heatmap* mostra que o tratamento somente com VEs miR-195 exerce efeito pouco significativo no perfil da expressão dos genes analisados, uma vez que células tratadas com VEs miR-195 ou VEs controle fazem parte do mesmo *cluster* (Fig. 14a). Entretanto, o tratamento com VEs miR-195 em conjunto com os inibidores da via MAPK altera significativamente o perfil de expressão dos genes analisados em relação a células tratadas somente com as drogas ou células tratadas com os inibidores em conjunto com as VEs controle (Fig. 14a-b).

Em relação aos genes diferencialmente expressos, os resultados mostraram que o tratamento somente com inibidores da via MAPK induz o aumento da expressão de genes associados ao fenótipo *stemness*, como SOX2 e NANOG nas linhagens A375 e SKMel-28 e CD44 na linhagem SKMel-5 (Fig. 14c). Além disso, os MAPKi induziram o aumento da expressão da metaloproteinase MMP1 nas três linhagens e do gene anti-apoptótico BCL2L1 nas linhagens SKMel-5 e SKMel-28 (Fig. 14d). Já a adição de VEs miR-195 em conjunto com os inibidores de BRAF e MEK resultou em menor expressão de BCL2L1, o qual é um *target* predito de miR-195, e aumento da expressão do gene pró-apoptótico BAD, nas três linhagens de melanoma (Fig. 14d). Apesar da terapia alvo-dirigida combinada resultar na indução de morte celular, o efeito predominante é citostático, como resultado da inibição da fosforilação

de ERK. Neste sentido, a inibição de genes anti-apoptóticos, normalmente superexpressos em resposta a este tratamento resulta no aumento da sensibilidade das células. A expressão dos fatores de transcrição NFE2L3 e POU5F1 também foi maior em células tratadas com VEs miR-195 mais drogas (Fig. 14d) e dados do TCGA mostram que a maior expressão destes genes está relacionada a melhores prognósticos para pacientes com melanoma (Fig. 15).

Ademais, análises das vias correlacionadas aos genes diferencialmente expressos após tratamento mostraram que a terapia alvo-dirigida combinada induz a expressão de genes associados a regulação negativa de processos apoptóticos, regulação negativa do ciclo celular e resposta a drogas, além da *down*-regulação de genes associados a regulação positiva de processos apoptóticos e regulação da via MAPK (Fig. 16a). Já o tratamento com VEs miR-195 mais os inibidores de BRAF e MEK, resultou no aumento da expressão de genes relacionados a regulação positiva de processos de morte celular e inibição de genes associados a vias relacionadas a progressão e diferenciação celular (Fig. 16b).

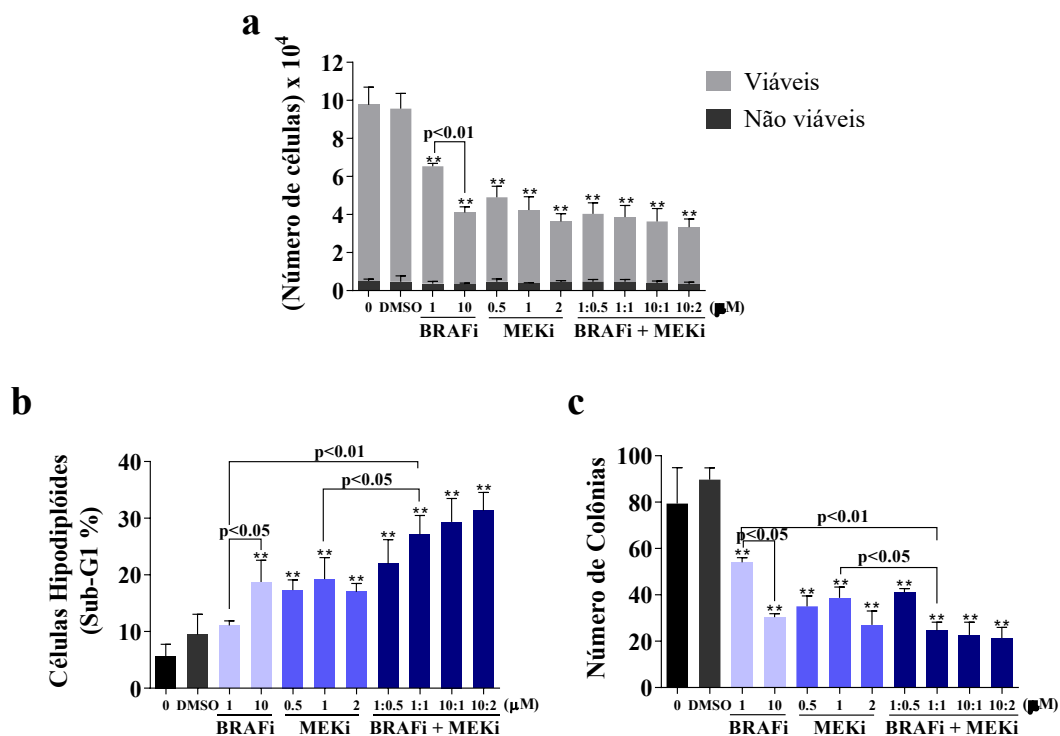


Figura 12. Padronização do tratamento alvo-dirigido combinado.

Células SKMel-05 foram tratadas por 72 horas com diferentes concentrações de inibidores das proteínas BRAF e MEK (PLX e PD, respectivamente). As drogas foram adicionadas 24 horas após plaqueamento. **a:** número de células viáveis e não viáveis obtidas por contagem com azul de tripan. **b:** porcentagem de células hipodiplóides, indicadas pela população Sub-G1 (mortas). **c:** número de clones obtidos 11 dias após plaqueamento. Células foram plaqueadas 72 horas após tratamento (20 células/cm²). Análises estatísticas foram realizadas utilizando *One-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni. ** indica diferença significativa ($p \leq 0.05$) comparado com o controle (DMSO). Os dados representam médias \pm desvio padrão. Resultados representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

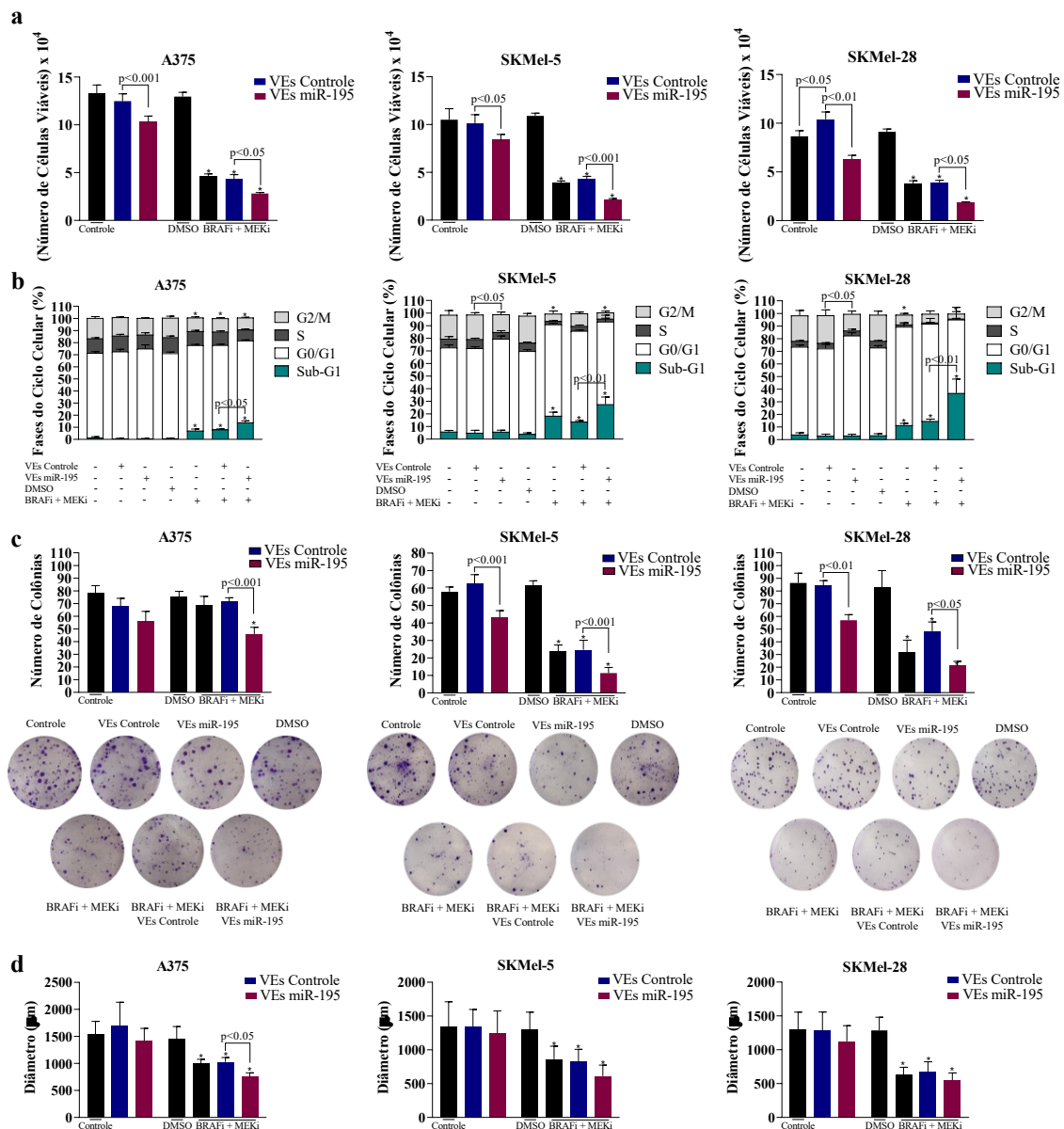


Figura 13. VEs miR-195 sensibilizam células naïve aos inibidores de BRAF e MEK.

Os resultados foram obtidos 72 horas após o tratamento com VEs (adicionadas diariamente) e/ou BRAFi + MEKi (1+1µM). **a,d**: Número de células obtido através da contagem com azul de tripan. **b,e**: Perfil de ciclo de células coradas com iodeto de propídeo **c**: Número de clones obtidos por coloração com cristal violeta 15 dias após o plaqueamento. **f**: Número de clones obtidos por coloração com cristal violeta 15 dias após o plaqueamento. **a,b,d,e**: Resultados obtidos 72 horas após o tratamento. Análises estatísticas foram realizadas pelo método two-way ANOVA e pós-teste de Bonferoni. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. a-c: Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

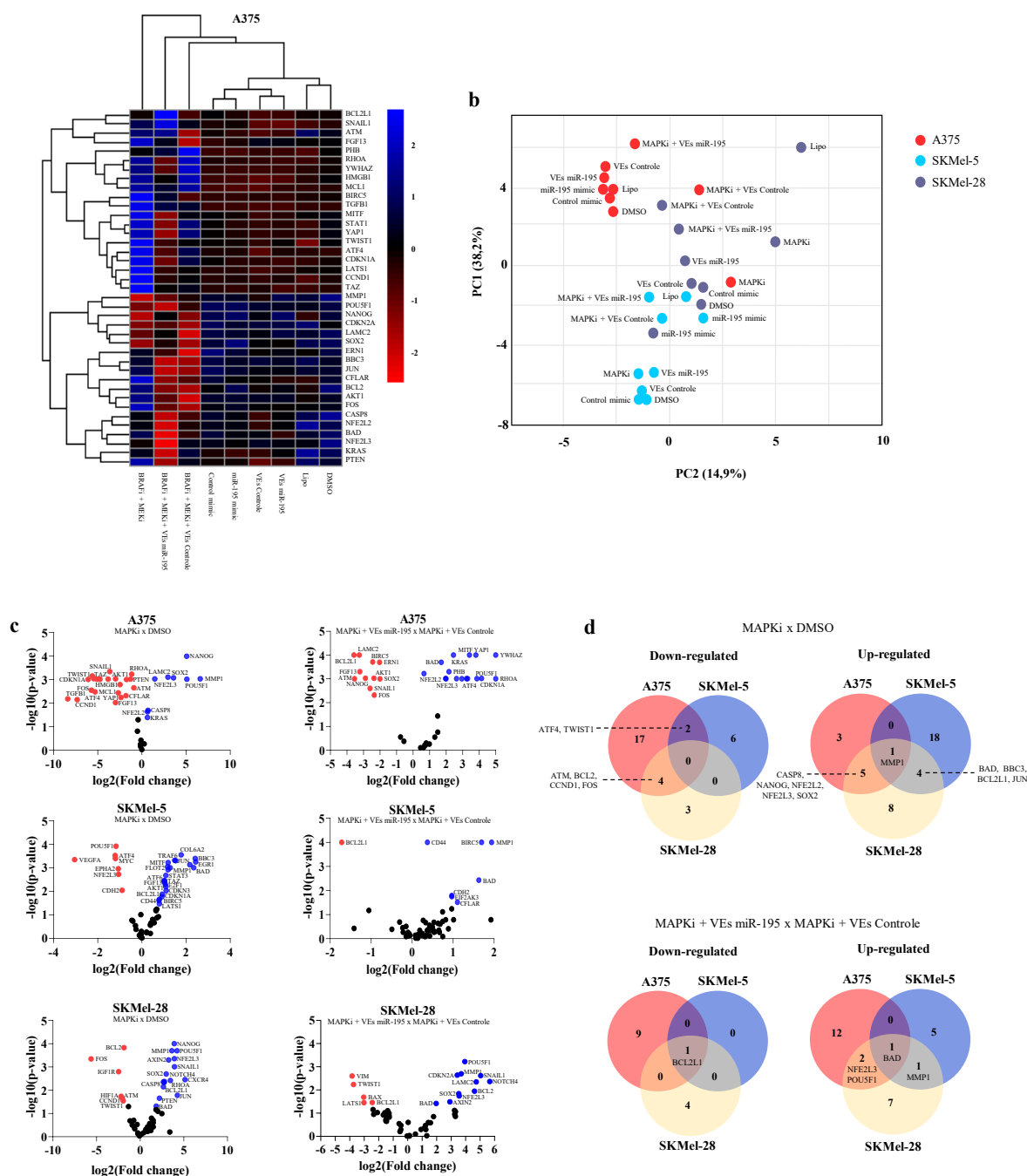


Figura 14. Perfil de expressão gênica de células tratadas com inibidores da via MAPK e VEs.

a: *Heatmap* mostrando o agrupamento hierárquico de genes após tratamento com VEs ou VEs em conjunto com inibidores da via MAPK na linhagem A375. Resultado obtido no software R Studio a partir de dados de RT-qPCR microfluídica (Fluidigm). Os dados representam o dCt. **b:** *Volcano plot* mostrando genes diferencialmente expressos em células tratadas com inibidores da via MAPK em relação ao controle (*left*) e células tratadas com inibidores da via MAPK + VEs miR-195 em relação ao controle (*right*). **c:** *Venn diagram* representando a intersecção de genes *down* e *up*-regulados nas diferentes linhagens. **d:** vias relacionadas aos genes diferencialmente expressos (Gene Ontology). Resultado obtido no software String.

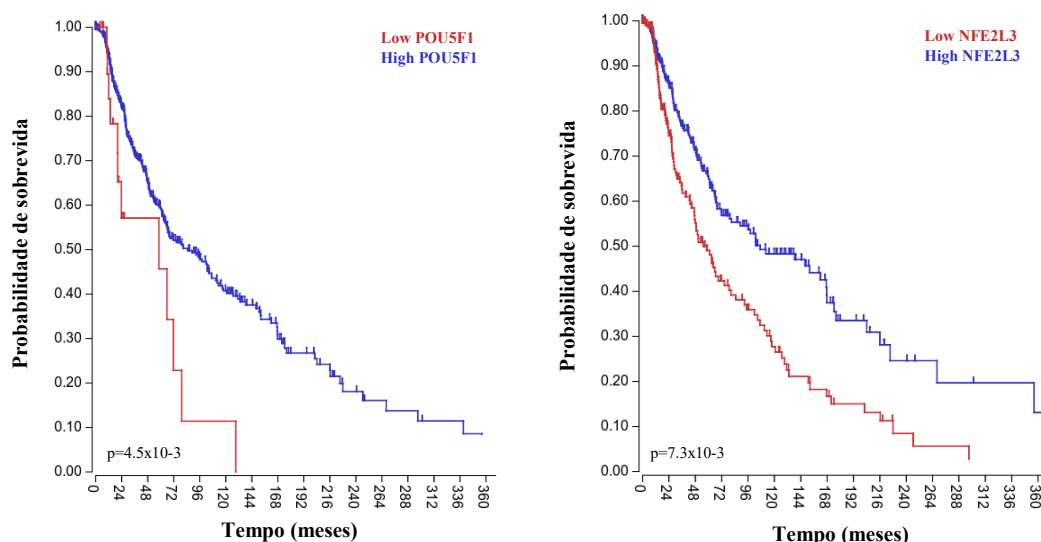


Figura 15. Expressão de POU5F1 e NFE2L3 e sobrevida de pacientes com melanoma. Dados do TCGA. Os dados foram classificados em *low* ou *high* a partir da média dos valores de expressão dos respectivos genes. POU5F1 *Low* n=22 POU5F1 *High* n=446; NFE2L3 *Low* n=211, NFE2L3 *High* n=257.

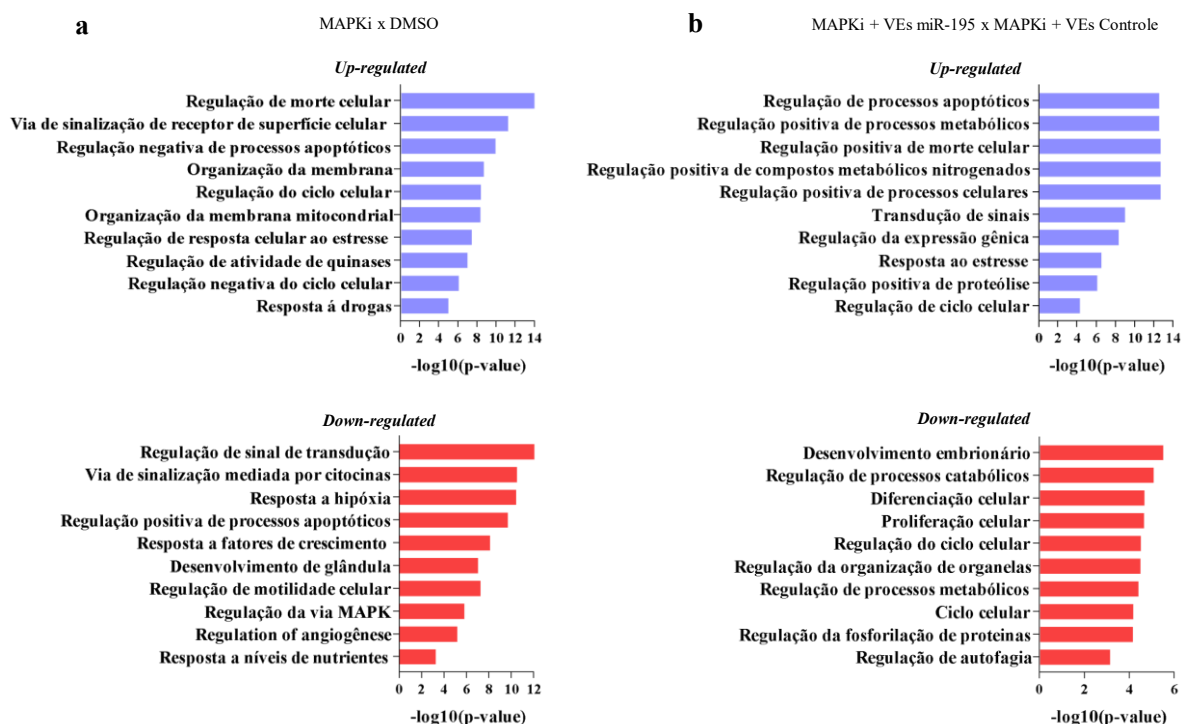


Figura 16. Vias relacionadas aos genes diferencialmente expressos após tratamento.

Gene Ontology de genes *up* ou *down*-regulados após tratamento com **a.** MAPKi ou **b.** MAPKi mais VEs miR-195. Resultado obtido no software *String*.

4.4. Análise do efeito de VEs miR-195 no crescimento tumoral *in vivo*

Para a análise do efeito de VEs miR-195 no crescimento tumoral *in vivo*, células A375 foram previamente tratadas com VEs miR-195 ou controle (10^8 partículas/mL) por 72 horas (adição diária) e injetadas s.c no ventre de camundongos Balb/C nu/nu machos (10^6 células por animal). Nove dias após a inoculação, quando os camundongos apresentaram tumores palpáveis não mensuráveis (PNMs), VEs foram administradas via intratumoral (10^8) a cada 3 dias. Como a realização deste experimento requiriu grandes quantidades de VEs e a transfecção das células para a obtenção destas quantidades seria desafiador, utilizamos VEs derivadas de células não tratadas após eletroporação com miR-195 ou controle (10nM). O processo de eletroporação não resultou em diferenças significativas na morfologia das VEs (Fig. 17a) e levou ao aumento de miR-195 intravesicular, como confirmado por RT-qPCR após o tratamento das VEs com Proteinase K mais RNase A para a remoção de miRNAs não incorporados (Fig. 17b).

O tratamento com VEs miR-195 afetou a cinética de crescimento dos tumores, resultando em um aumento significativo na porcentagem de animais livres de tumores mensuráveis (Fig. 17d, $p < 0.001$). Quatorze dias após a inoculação das células a porcentagem de animais que possuíam tumores mensuráveis foi de 100% para o grupo controle e 20% para o grupo tratado com VEs miR-195 ($n=5$). A administração intratumoral de VEs miR-195 resultou na regressão completa de um tumor PNM em um dos animais. Ao fim do experimento, o volume (Fig. 17e, $p < 0.01$) e o peso (Fig. 17f, $p < 0.05$) tumoral foram significativamente menores para tumores tratados com VEs miR-195 em relação ao controle.

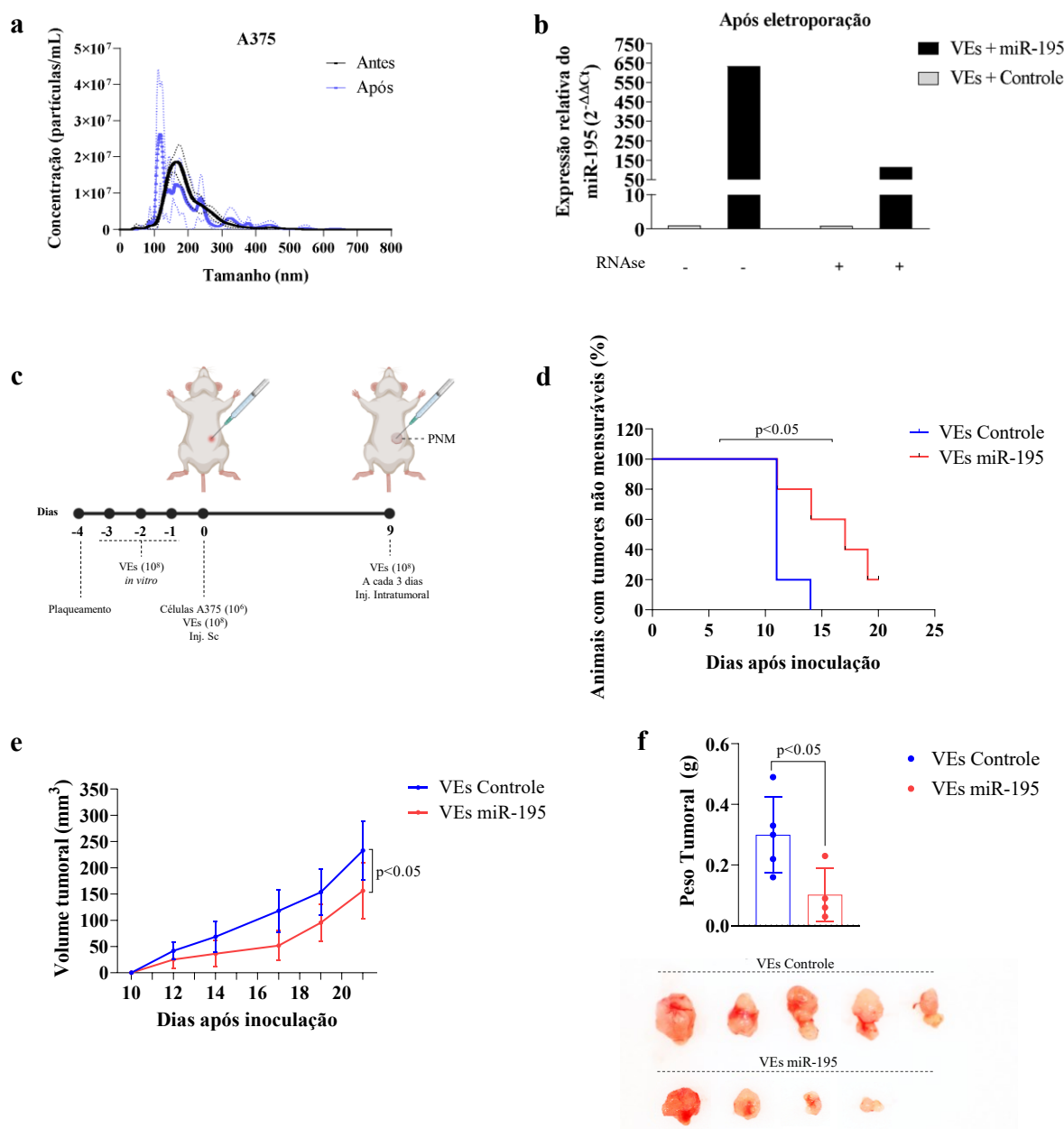


Figura 17. Efeito de VEs contendo miR-195 no crescimento tumoral *in vivo*.

a: Caracterização de VEs antes e após eletroporação com miR-195. Linhas pontilhadas representam o desvio padrão. **b:** Expressão do miR-195 em VEs após eletroporação. Resultado obtido por RT-qPCR. **c:** Esquematização do experimento *in vivo*. Figura criada no Biorender. **d:** *Kaplan Meier* representando a porcentagem de animais livres de tumores mensuráveis. **e:** cinética de crescimento tumoral. **f:** peso dos tumores. N=5 animais por grupo. Análises estatísticas foram realizadas pelo método *one-way* ANOVA e pós teste *t* de Student ou *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferoni. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

4.5. Metilação e inibição por lncRNAs são possíveis mecanismos responsáveis pela down-regulação de miR-195 em melanomas

Com base nos resultados reportados nas seções anteriores, nós hipotetizamos que a restauração da expressão do miR-195 possa ser uma nova estratégia para aumentar a eficácia do tratamento de melanomas. Assim, analisamos os possíveis mecanismos responsáveis pela down-regulação deste miRNA neste tipo de tumor. Dados do TCGA mostraram que o nível de metilação do miR-195 é maior em tecidos tumorais de melanoma comparado com tecidos saudáveis (Fig.18a, $p=2.2 \cdot 10^{-16}$). Com base neste dado, tratamos células de melanoma com o agente demetilante Azacitidina, a fim de induzir a re-expressão do miR-195. Este tratamento apresentou efeito citotóxico, levando a diminuição do número de células viáveis (Fig. 18b, $p<0.01$) e o aumento da porcentagem de células hipodiplóides (Fig. 18c, $p<0.01$). Porém, resultou no aumento da expressão de miR-195 apenas na linhagem SKMel-28 (Fig. 18d).

Diferentes trabalhos reportaram recentemente a regulação do miR-195 por RNAs longos não codificantes (lncRNAs) em diferentes tipos de câncer, incluindo tumores de bexiga (LI *et al.*, 2017), adenocarcinoma de pulmão (ZUO *et al.*, 2019), linfoma de células B (WANG³ *et al.*, 2019) e tumores de próstata (WANG⁴ *et al.*, 2019). Resultados *in silico* mostraram que dentre 30 lncRNAs capazes de regular miR-195 (Tabela 2), 17 estão superexpressos em melanoma, com base em resultados obtidos em dois bancos de dados diferentes, sendo 4 destes encontrados superexpressos em ambos (Fig. 18e). A avaliação da expressão destes 4 lncRNAs por RT-qPCR mostrou que LINC00473 e LINC00511 estão superexpressos nas três linhagens de melanoma testadas, em relação a linhagem de melanócito não-transformado (NGM). Além disso, o lncRNA PVT1, reportado como capaz induzir a metilação de miR-195 em células de câncer cervical através do aumento da histona H3K27me3 na região promotora deste gene, também foi encontrado superexpresso nas linhagens de melanoma (Fig. 18f), evidenciando que a expressão de miR-195 é possivelmente inibida por mecanismos pré e pós-transcricionais em melanomas.

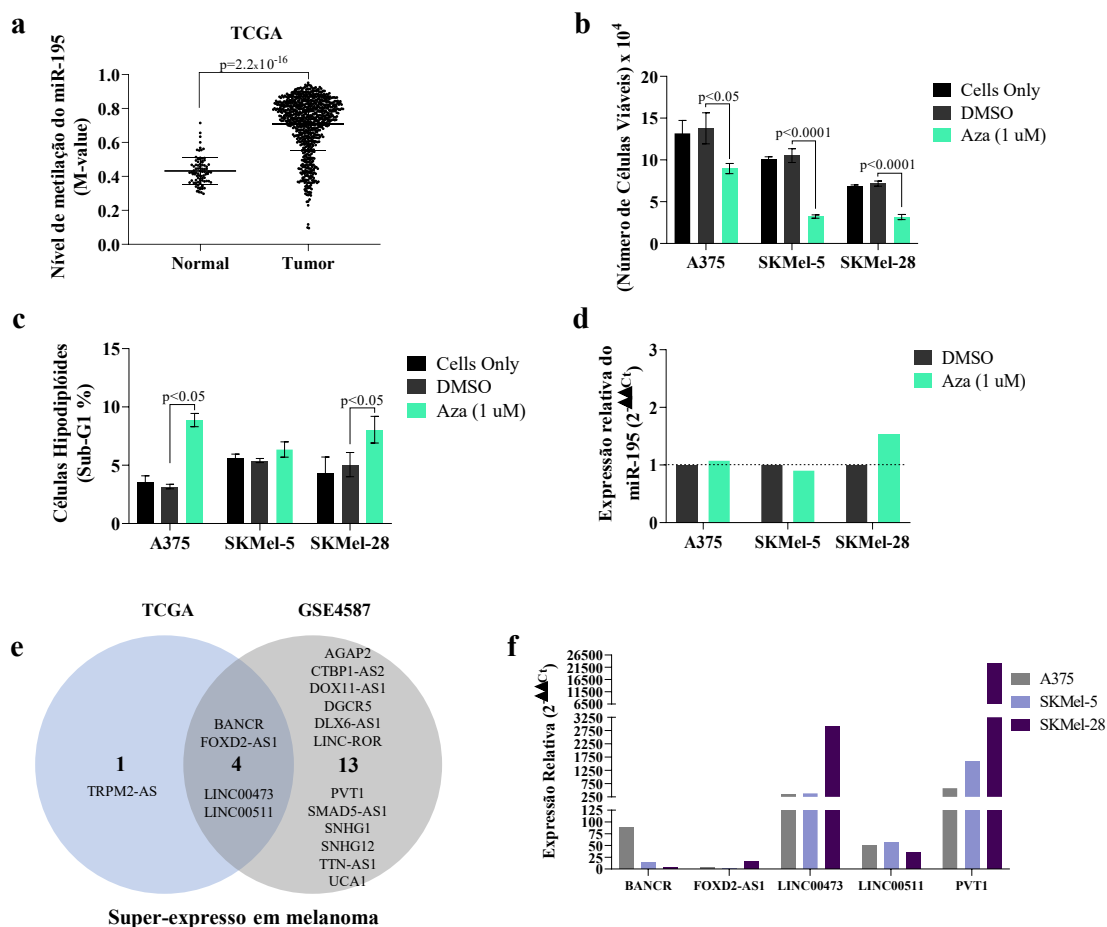


Figura 18. O miR-195 é possivelmente *down*-regulado transcricional e pós-transcricionalmente em melanoma.

a: Perfil de metilação do miR-195 em melanomas (dados do TCGA). **b:** Número de células obtido através da contagem com azul de tripan. **c:** Perfil de ciclo celular de células marcadas com iodeto de propídeo **d:** expressão relativa do miR-195 obtida por RT-qPCR. RNU48 foi utilizado como controle endógeno. **b-c:** Dados obtidos 48 horas após tratamento com Azacitidina. **e:** *Venn diagram* de lncRNAs capazes de inibir miR-195 que são encontrados superexpressos em melanoma em dois bancos de dados diferentes. **f:** Expressão relativa dos lncRNAs em linhagens de melanoma. A linhagem de melanócito não transformado (NGM) foi utilizada como referência. GAPDH e β -ACTINA foram utilizados como controle endógeno. Análises estatísticas foram realizadas pelo método *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3; triplicata técnica).

Tabela 2. Expressão dos lncRNAs capazes de inibir miR-195 em melanoma comparado com tecidos não-malignos.

LncRNA	Sítio de ligação	Referência	Expressão em Melanomas	
			TCGA	GSE4587
AC003092.1	5'-ctCACTcATcTgCTaTGCTGCTg-3' 3'-cgGTTA-TA-AaGAcACGACGat-5'	Xu et al., (2018)	Dado não disponível	Dado não disponível
AGAP2	5'-uuaccuugacCU-UGCUGCUC-3' 3'-cgguuuuuuuGAcACGACGAu-5'	Shen et al., (2020)	Indiferente	Superexpresso
BANCR	5'-cgtgccgctggTGTGCTGCTg-3' 5'-cgguuuuuuuagACACGACGAu-5'	Wu et al., (2019)	Superexpresso	Superexpresso
CASC9	5'-agauggAcacaUuUGCUGCUu-3' 3'-cgguuuUaaagAcACGACGAu-5'	Wang ¹ et al., (2020)	Indiferente	Dado não disponível
CDKN2B-AS1	5'-ggCAAhA-aaCauUGCUGCUa-3' 3'-cgGUUuAAAgACacgacgaU-5'	Tian et al., (2020)	Indiferente	Superexpresso
CTBP1-AS2	5'-uuggauggacgaaUGCUGCUu-3' 3'-cgguuuuuuuagacACGACGAu-5'	Liu et al., (2020)	Superexpresso	Hipoexpresso
DDX11-AS1	5'-ccauggguuuuuGUGCUGCUA-3' 3'-cgguuuuuuuuuGACGACGAU-5'	Wan et al., (2021)	Indiferente	Superexpresso
DGCR5	5'-gccugugugaauGUGCUGCUc-3' 3'-cgguuuuuuuuuGACGACGAu-5'	Tang et al., (2018)	Indiferente	Superexpresso
DLX6-AS1	5'-ucaaacaaaaagaUGCUGCUa-3' 3'-cgguuuuuuuuuuuGACGACGAu-5'	Wang ² et al., (2020)	Indiferente	Superexpresso
FOXD2-AS1	5'-gggccccgaaUuGGGGCAGc-3' 3'-ggucgucgugGaCCCCGUCa-5'	Liu et al., (2020)	Superexpresso	Superexpresso
FGD5-AS1	5'-uuuuuuuuuuuuUGCUGCUu-3' 3'-cgguuuuuuuuuuuGACGACGAu-5'	Cai et al., (2020)	Indiferente	Superexpresso
LINC00210	5'-agtccctttgtcTGCTGCTc-3' 3'-cggttataaaagacACGACGAt-5'	Du et al., (2019)	Dado não disponível	Indiferente
LINC00324	5'-uccgcccgUUaU--UGCUGCUc-3' 3'-cgguuuuuuuuuuuGAcACGACGAu-5'	Xu et al., (2020)	Indiferente	Hipoexpresso
LINC00355	5'-GCCucagccUCUGgUGuaGCUG-3' 3'-CGGuuuuuuuuuuuAGAC-ACgaCGAU-5'	Lu et al., (2020)	Indiferente	Dado não disponível
LINC00473	5'------cUGCUGCUg-3' 3'-cgguuuuuuuuuuuuuGAcACGACGAu-5'	Wang ³ et al., (2020)	Superexpresso	Superexpresso
LINC00485	5'-tcCAcTtTTcaCatTGCTGTTt-3' 3'-cgGUuAuaAA--GacACGACGAu-5'	Zuo et al., (2019)	Dado não disponível	Indiferente
LINC00511	5'-gaaAgUgUUUcUcUGCUGCUa-3' 3'-cggUuAuAAA--GAcACGACGAu-5'	Li et al., (2020)	Superexpresso	Superexpresso
LUADT1	5'-gca---ccaggUGUGUUGUcuacc---ucu-3' 3'-cgg---uuuuuuuuuuuuuuGAcACGACGAu-5'	Zhang et al., (2020)	Dado não disponível	Dado não disponível
MALAT1	5'-guacuguuucugaucccGCUGCUA-3' 3'-cgguuuuuuuuuuuuuuuGAcACGACGAu-5'	Wang ³ et al., (2019)	Hipoexpresso	Hipoexpresso
MEG3	5'-caCAcAUgUggCcuUGCUGCUg-3' 3'-cgGU---UAuAaaGacACGACGAu-5'	Chen et al., (2020)	Hipoexpresso	Hipoexpresso
NKILA	5'-tCCAcacccatTGT-CTGCTg-3' 3'-cGGTataaagACAcGACGAt-5'	He et al., (2021)	Indiferente	Dado não disponível

PVT1	5'-tttgcttcTcCTGtTGCTGCTa-3' 3'-cggttataAaGAC-ACGACGAt-5'	Wu et al., (2017)	Indiferente	Superexpreso
SMAD5-AS1	5'-aCCtattcaaTCTtTGCTGCTA-3' 3'-cGGTataa-AGAcACGACGAT-5'	Li et al., (2019)	Hipoexpreso	Superexpreso
SNHG1	5'-acCAgTgaTgaatTGcTGCTc-3' 3'-cgGTtAtaAagacACgACGAt-5'	Meng et al., (2020)	Indiferente	Indiferente
SNHG12	5'-ccCgcTA-gTCgcTGCTGCTg-3' 3'-cgGuuAUaaAGacACGACGAt-5'	Zhou et al., (2018)	Hipoexpreso	Superexpreso
TRPM2-AS	5'-caugggucuccugaUGCUGCUg-3' 3'-cgguuauaaagac-ACGACGAu-5'	Huang et al., (2019)	Superexpreso	Indiferente
TTN-AS1	5'-uguggacUUaCgGaUGCUGCUg-3' 3'-cgguuauAAaGAc--ACGACGAu-5'	Lin et al., (2020)	Indiferente	Superexpreso
UCA1	5'-gGCUGAaga--CUGaUGCUGCc-3' 3'--CGGUUauaaaGAC-ACGACGau-5'	Li et al., (2017)	Indiferente	Indiferente
VANGL1	5'-ccacgcuggcaacUGCUGCUg-3' 3'-cgguuauaaagacACGACGAu-5'	Wang ¹ et al., (2019)	Indiferente	Superexpreso
XIST	5'-atctacacttttttTGCTGCTg-3' 3'-cggttataaagacACGACGAt-5'	Yang et al., (2018)	Indiferente	Hipoexpreso

5. DISCUSSÃO

O melanoma metastático geralmente apresenta prognóstico desfavorável com baixas taxas de sobrevida global e livre de progressão. O tratamento alvo-dirigido combinado, com inibidores da via MAPK, é considerado a abordagem terapêutica padrão para pacientes portadores da mutação BRAF. Apesar das melhorias significativas quando comparado as taxas de resposta obtidas com a quimioterapia convencional, a maioria destes pacientes apresenta progressão dentro de alguns meses após o início do tratamento. Vários estudos têm se concentrado em compreender os mecanismos responsáveis por esse fenótipo altamente resistente. A desregulação da expressão de miRNAs é um dos mecanismos envolvidos nos processos de regulação da sensibilidade aos tratamentos (CIRILO *et al.*, 2017; YU² *et al.*, 2018; CAPORALI *et al.*, 2019), influenciando o prognóstico dos pacientes (WANG *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2020). Recentemente, o papel das Vesículas Extracelulares na modulação da resposta terapêutica tem sido amplamente investigado. Por meio da transferência de moléculas bioativas, elas podem atuar tanto inibindo quanto favorecendo a progressão tumoral.

Particularmente, a presença de miRNAs específicos em VEs isoladas do plasma de pacientes (pVEs) com melanoma pode ser associada ao prognóstico e à resposta ao tratamento alvo-dirigido. Por exemplo, níveis aumentados de miRNAs considerados oncogênicos, como miR-211 em pVEs foram associados à resistência aos inibidores de BRAF (LUNAVAT *et al.*, 2017), enquanto a presença de miRNAs supressores em pVEs, como miR-34a (LEE *et al.*, 2019) e miR-497 (SVEDMAN *et al.*, 2018), está associada a inibição do crescimento tumoral e maior sobrevida livre de progressão durante o tratamento com inibidores da via MAPK. O miR-195 é classificado como um supressor tumoral em vários cânceres, incluindo carcinoma de pulmão (CHAE *et al.*, 2019), câncer de cólon (LI *et al.*, 2018), próstata (MA *et al.*, 2020), mama (YANG *et al.*, 2018; PUROHIT *et al.*, 2019) e melanoma (CIRILO *et al.*, 2017).

Nossos resultados mostraram que a superexpressão de miR-195 resulta no aumento da liberação de VEs, através da indução da expressão de GTPases envolvidas na secreção destas partículas. A linhagem A375 apresentou aumento na expressão de RAB27B, a qual, juntamente com RAB27A, está envolvida na fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática, resultando na liberação de ILVs. A linhagem SKMel-28 apresentou aumento na expressão de FLOT2, enquanto a linhagem SKMel-5 apresentou maiores níveis de RAB31 e FLOT2 após transfecção com miR-195. Ambas GTPases estão envolvidas na formação de ILVs, como recentemente reportado por Wei *et al.*, 2021. Além de induzir a formação de vesículas intraluminais, RAB31 também atua inibindo a degradação de MVBs através da inativação de RAB7, favorecendo assim a produção de exossomos (WEI, *et al.*, 2021). Além disso, a diminuição da expressão de CDC42 e RHOA, observada nas linhagens SKMel-28 e A375, respectivamente, pode estar associada a inibição da liberação de microvesículas, uma vez que estas proteínas estão envolvidas na produção destas partículas (WANG *et al.*, 2021). Este aumento na liberação de vesículas enriquecidas em exossomos pode estar relacionado ao estresse causado pela superexpressão de miR-195. Diferentes trabalhos têm mostrado que o tratamento com agentes antineoplásicos ou fatores estressores induzem vesiculação em células tumorais (LI-HONG *et al.*, 2012; VULPIS *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2019)

A superexpressão de miR-195 em células parentais resultou no enriquecimento deste miRNA em VEs. Resultados similares foram obtidos por Li *et al.*, (2017), os quais mostraram que a superexpressão de miR-195 em fibroblastos resultou na liberação de VEs enriquecidas com este miRNA, as quais puderam inibir o crescimento tumoral e a capacidade de invasão em modelo de colangiocarcinoma. Várias proteínas de ligação a RNA, como Argonauta 2 (AGO2) e proteínas da família de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs), foram reportadas como capazes de regular o *sorting* de miRNAs em VEs, especialmente exossomos (GROOT e LEE, 2020). No entanto, alguns trabalhos sugerem que a superexpressão de

miRNAs em células parentais resulta em um enriquecimento inespecífico do miRNA em questão em VEs, por meio de mecanismos ainda não totalmente elucidados (COLLINO *et al.*, 2017; JAFARI *et al.*, 2020). Neste contexto, estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais o miR-195 é enriquecido em VEs após transfecção.

Nossos resultados também mostraram que VEs miR-195 são capazes de induzir efeito antiproliferativo em células receptoras, através da inibição de CCND1 e YAP1 e indução da expressão das ciclinas inibidores de quinases CDKN1A e CDKN3. Tanto CCND1 quanto YAP1 são alvos preditos de miR-195. A inibição destes genes por este miRNA já foi associada a diminuição de proliferação e potencial invasivo em câncer de ovário (HAO *et al.*, 2020), inibição de metástase em osteossarcomas (HAN *et al.*, 2015) e diminuição do potencial migratório e inibição da transição epitélio-mesênquima em tumores cervicais (LIU *et al.*, 2020). O aumento da expressão de CDKN1A pode estar associado a regulação da via MDM2/P53 por miR-195, uma vez que MDM2 é possivelmente *down*-regulado por miR-195, por ser um *target* predito. A inibição de MDM2 pode levar a estabilização de P53 e consequente indução de CDKN1A (BROUDE *et al.*, 2007).

O efeito antiproliferativo de VEs miR-195 também pôde ser observado no crescimento tumoral *in vivo*. O tratamento com VEs miR-195 pré e pós (intratumoral) inoculação das células resultou em menor volume e peso tumoral comparado ao grupo controle, além de induzir a regressão de um tumor PNM em um dos animais. Resultados similares já foram reportados por outros trabalhos em diferentes modelos. Em câncer de mama, a transfecção de miR-195 inibiu o crescimento tumoral *in vivo* através da *down*-regulação de VEGF (WANG *et al.*, 2016). Similarmente, em carcinoma de tireoide, a superexpressão de miR-195 resultou em menor volume e peso tumoral, o que foi associado a inibição de CCND1 e FGF2 (YIN *et al.*, 2017). Além disso, em modelo xenográfico de câncer de ovário, a superexpressão de miR-195 retardou o crescimento tumoral e aumentou a sobrevida dos animais, através da inibição de MICU1

(RAO *et al.*, 2020). Até o momento, nossos resultados representam os primeiros achados demonstrando o efeito de miR-195 intravesicular no crescimento tumoral *in vivo*.

VEs miR-195 também foram capazes de sensibilizar células *naïve* ao tratamento com inibidores de BRAF e MEK através da inibição de BCL2L1 e indução de BAD. Em concordância com estes resultados, diferentes trabalhos mostraram que a inibição de alvos preditos do miR-195 está associada ao aumento da sensibilidade de células de melanoma à terapia direcionada. Por exemplo, Najem *et al.*, (2017) mostraram que a inibição da proteína anti-apoptótica BCL-2, geralmente *up*-regulada após o tratamento, pôde sensibilizar células de melanoma aos inibidores de MAPK. Além disso, diversos trabalhos reportaram que a inibição do metabolismo mitocondrial e dos níveis de fosforilação oxidativa aumenta a resposta terapêutica e atrasa a ocorrência de resistência (HONG *et al.*, 2017; MARCHETTI *et al.*, 2018; BRUMMER *et al.*, 2018; GODAL *et al.*, 2019). Conforme demonstrado recentemente por nosso grupo, PHB1 é capaz de favorecer estes processos (TORTELLI *et al.*, 2017) e é um *target* de miR-195 (CIRILO *et al.*, 2017). Assim, a indução de apoptose e a inibição do metabolismo mitocondrial representam possíveis mecanismos pelos quais VEs miR-195 são capazes de sensibilizar as células *naïve* à terapia.

Diante destes resultados, buscamos analisar quais mecanismos poderiam ser responsáveis pela *down*-regulação de miR-195 no melanoma, com o intuito de restaurar sua expressão. Vários estudos mostraram que a metilação do promotor é responsável pela inibição de miR-195 em diferentes tipos de câncer, incluindo tumores gástricos (DENG *et al.*, 2013), de mama (LI *et al.*, 2011) e cervicais (SHEN *et al.*, 2017). Com base nestes resultados, comparamos os níveis de metilação de miR-195 em melanomas com tecidos não malignos e os resultados mostraram um maior nível de metilação deste miRNA em tecidos tumorais em relação aos controles. Apesar do tratamento com o inibidor de metiltransferases Azacitidina ter sido reportado por outros trabalhos como capaz de restaurar a expressão de miR-195 em células tumorais (DENG

et al., 2013; MA *et al.*, 2020), pudemos observar um aumento nos níveis de expressão do miR-195 após o tratamento com AZA somente em uma das três linhagens de melanoma testadas (SKMel-28).

Recentemente, a inibição de miRNAs por lncRNAs tem sido amplamente investigada e diversos lncRNAs já foram reportados como capazes de inibir miR-195. LncRNAs podem regular a expressão de miRNAs tanto pré quanto pós-transcricionalmente. Dentre os miRNAs encontrados superexpressos em melanoma a partir de resultados *in silico*, confirmamos a superexpressão de LINC00473, LINC00511 e PVT1 por RT-qPCR nas linhagens A375, SKMel-5 e SKMel-28. A superexpressão destes lncRNAs já foi reportada em outros tipos tumorais. LINC00473, por exemplo, é superexpresso em tumores de próstata e pancreáticos, induzindo proliferação celular através da inibição de miR-195 e ativação da via JAK/STAT (XING *et al.*, 2020), além de favorecer o processo de evasão do sistema imune, através da *up*-regulação de PD-L1 induzida pela inibição de miR-195 (ZHOU *et al.*, 2019). Já a superexpressão de LINC00511 está associada a indução de proliferação e maior potencial invasivo de células leucêmicas (LI *et al.*, 2020), e indução de fenótipos *stemness* em células de câncer de mama (LU *et al.*, 2018).

O lncRNA PVT1, além de inibir o miR-195 pós-transcricionalmente via pareamento complementar, também é capaz de induzir a metilação do promotor deste miRNA através do recrutamento do complexo PCR2 para esta região, o qual induz metilação repressora do tipo H3K27m3, como reportado por Shen *et al.*, (2017). Curiosamente, a expressão deste lncRNA foi significativamente maior (*fold change* >20.000) na linhagem SKMel-28, em comparação com as demais, a qual apresentou um pequeno aumento na expressão de miR-195 após o tratamento com AZA. Assim, a metilação do promotor e inibição via *sponging* representam possíveis mecanismos pelos quais miR-195 é *down*-regulado no decorrer da progressão do

melanoma e ambos os processos podem estar relacionados a desregulação da expressão de lncRNAs.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A superexpressão de miR-195 modula o perfil de vesiculação de células de melanoma, induzindo a secreção de vesículas enriquecidas em exossomos. VEs derivadas de células que superexpressam miR-195 induzem efeito citostático em células *naïve* através da inibição de CCND1 e YAP1 e aumento de CDKN1A e CDKN3. VEs contendo miR-195 também impactaram o crescimento tumoral *in vivo*, resultando em uma maior fração de animais livres de tumores mensuráveis; e, menor volume e peso tumoral em comparação ao grupo controle. O tratamento combinado com VEs miR-195 e inibidores de BRAF e MEK resultou em maior expressão de BAD e inibição de BCL2L1, aumentando a porcentagem de morte celular e diminuindo o potencial clonogênico das células.

Desta forma, a restauração da expressão de miR-195 representa uma estratégia promissora para sensibilizar células de melanoma via transferência horizontal de informação. Os dados foram confirmados em três linhagens de melanoma BRAF^{V600E}. A análise do efeito das VEs no crescimento tumoral *in vivo* após o tratamento com os inibidores de BRAF e MEK, assim como a avaliação do perfil de miRNAs presente nestas partículas estão sendo conduzidas no momento.

Adicionalmente, com relação ao mecanismo de regulação de miR-195 em melanomas, confirmamos a superexpressão dos lncRNAs LINC00473, LINC00511 e PVT1 nas 3 linhagens testadas, os quais tem como alvo esse miR. Além disso, observamos o aumento na expressão de miR-195 após tratamento com azacitidina na linhagem SKMel-28, a qual apresenta maior expressão do lncRNA PVT1, reportado como capaz de induzir metilação do promotor deste miRNA. Estes resultados indicam que a expressão de miR-195 em melanomas é possivelmente inibida por mecanismos pré e pós-transcricionais. Experimentos futuros são necessários para validar a estes achados.

7. REFERÊNCIAS

- ABELS, E.R; BREAKFIELD, X.O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016.
- ANDRADE, L.N.S; OTAKE, A.H; CARDIM, S.G.B; DA SILVA, F.I; SAKAMOTO, M.M; FURUYA, T.K; UNO, M; PASINI, F.S and CHAMMAS, R. Extracellular Vesicles Shedding Promotes Melanoma Growth in Response to Chemotherapy. *Scientific Reports*. 2019.
- ANTUNES, F; PEREIRA, G.J; JASIULIONES, M.G; BINCOLETTO, C; SMAILI, S.S. Nutritional shortage augments cisplatin-effects on murine melanoma cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2018.
- ASCIERTO, A; MCARTHUR, A; DRÉNO, B; ATKINSON, V; LISZKAY, G; DI-GIACOMO, M; LARKIN, J. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 2016.
- BABAGANA, M; JOHNSON, S; SLABODKIN, H; BSHARA, W; MORRISON, C; KANDEL, E.S. P21-activated kinase 1 regulates resistance to BRAF inhibition in human cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*. 2017.
- BISSCHOPA, P; ELSTB, A; BOSMANB, L; PLATEELB, I; JALVINGA, M; BERGB, A. Rapid BRAF mutation tests in patients with advanced melanoma: comparison of immunohistochemistry, Droplet Digital PCR, and the Idylla Mutation Platform. *Melanoma Research*, 2018.
- BOESPFLUG, A; THOMAS, L. Cobimetinib and vemurafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2016.
- BROUDE, E.V; DEMIDENKO, Z.N; VIVO, C; SWIFT, M.E; DAVIS, B.M; BLAGOSKLONNY, M.V; RONINSON, I.B. p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability. *Cell Cycle*. 2007
- BRUMMER, C; FAERBER, S; BRUSS, C; BLANK, C; LACROIX, R; HAFERKAMP, S; HERR, W; KREUTZ, M; RENNER, K. Metabolic targeting synergizes with MAPK inhibition and delays drug resistance in melanoma. *Cancer Letters*, 2018.
- CAI, H; ZHAO, H; TANG, J; WU, H. Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *The Journal of Surgical Research*. 2015.
- CAI, X; ZHANG, P; WANG, S; HONG, L; YU, S.; LI, B; ZENG, H; YANG, X; SHAO, L. lncRNA FGD5 antisense RNA 1 upregulates RORA to suppress hypoxic injury of human cardiomyocyte cells by inhibiting oxidative stress and apoptosis via miR 195. *Molecular Medicine Reports*. 2020.
- CAPORALI, S; AMARO, A; LEVATI, L; ALVINO, E; LACAL, P; MASTROENI, S; RUFFINI, F; BONMASSAR, L; ANTONINI, G; FELLI, N; CARÈ, A; PFEFFER, U; D'ATRI, S. miR-126-3p down-regulation contributes to dabrafenib acquired resistance in melanoma by up-regulating ADAM9 and VEGF-A. *Journal of Experimental & Clinical Cancer*. 2019.
- CHAE, D; PARK, J; CHO, M; BAN, E; JANG, M; YOO, Y; KIM, E; BAIK, J; SONG, E. MiR-195 and miR-497 suppress tumorigenesis in lung cancer by inhibiting SMURF2-induced TGF- β receptor I ubiquitination. *Molecular Oncology*. 2019.
- CHAI, L; KANG, X.J; SUN, Z.Z; ZENG, M.F; YU, S.R; DING, Y; LIANG, J.Q; LI, T.T; ZHAO, J. MiR-497-5p, miR-195-5p and miR-455-3p function as tumor suppressors by targeting hTERT in melanoma A375 cells. *Cancer Management and Research*. 2018.

CHEN, L; WANG, J; LI, J.W; ZHAO, X.W; TIAN, L. F. LncRNA MEG3 inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells through regulating Notch signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020.

CIARDIELLO, C; MIGLIORINO, R; LEONE, A; BUDILLON, A. Large Extracellular vesicles: Size matters in tumor progression. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2019.

CIRILO, P.D.R; ANDRADE, L.N.S; CORRÊA, B.R.S; QIAO, M; FURUYA, T.K; CHAMMAS, R; PENALVA, L.O.F. MicroRNA-195 acts as a anti-proliferative miRNA in human melanoma cells by targeting Prohibitin. *BMC Cancer*, 2017.

CLARK, W.H; JR ELDER, D.E; GUERRY, D; EPSTEIN, M.N; GREENE, M.H; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*. 1984.

COLLINO, F; POMATTO, M; BRUNO, S. ET al. Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017.

DAI, J; WEI, R; ZHANG, P; KONG, B. Overexpression of microRNA-195-5p reduces cisplatin resistance and angiogenesis in ovarian cancer by inhibiting the PSAT1-dependent GSK3 β / β -catenin signaling pathway. *Journal of Translational Medicine*. 2019.

DAMSKY, W.E; BOSENBERG M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 2017.

DAVAR, D; DING, F; SAUL, M; SANDER, C; TARHINI, A.A; KIRKWOOD, J.M; TAWBI, H.A. High-dose interleukin-2 (HD IL-2) for advanced melanoma: a single center experience from the University of Pittsburgh Cancer Institute. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2017.

DAVIS, L; E, SHALIN, S; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*. 2019.

DENG, H; GUO, Y; SONG, H; XIAO, B; SUN, W; LIU, Z; YU, X; XIA, T; CUI, L; GUO, J. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer. *Gene*. 2013.

DÍAZ-MARTÍNEZ, M; BENITO-JARDÓN, L; ALONSO, L; KOETZ-PLOCH, L; HERNANDO, E; TEIXIDÓ, J. miR-204-5p and miR-211-5p Contribute to BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Research*. 2018.

DU, P; LIU, F; LIU, Y; SHAO, M; LI, X; QIN, G. Linc00210 enhances the malignancy of thyroid cancer cells by modulating miR-195-5p/IGF1R/Akt axis. *Journal of Cellular Physiology*. 2019.

FATTORE, L; CAMPANI, V; RUGGIERO, C.F; SALVATI, V; LIGUORO, D; SCOTTI, L; BOTTI, G; ASCIERTO, P.A; MANCINI, R; DE ROSA, G; CILIBERTO, G. In Vitro Biophysical and Biological Characterization of Lipid Nanoparticles Co-Encapsulating Oncosuppressors miR-199b-5p and miR-204-5p as Potentiators of Target Therapy in Metastatic Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.

FATTORE, L; SACCONI, A; MANCINI, R; CILIBERTO, G. MicroRNA-driven deregulation of cytokine expression helps development of drug resistance in metastatic melanoma. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2017.

FOMESHI, M.R; EBRAHIMI, M; MOWLA, S.J; KHOSRAVANI, P; FIROUZI, J; KHAYATZADEH, H. Evaluation of the expressions pattern of miR-10b, 21, 200c, 373 and 520c to find the correlation between epithelial-to-mesenchymal transition and melanoma stem cell potential in isolated cancer stem cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2015.

FU, M; LI, S; YU, T.T; QIAN, L.J; CAO, R.S; ZHU, H; XIAO, B; JIAO, C.H; TANG, N.N; MA, J.J; HUA, J; ZHANG, W.F; ZHANG, H.J; SHI, R.H. Differential expression of miR-195 in esophageal squamous cell carcinoma and miR-195 expression inhibits tumor cell proliferation and invasion by targeting of Cdc42. *FEBS Letters*, 2013.

GARBE, C; KEIM, U; SUCIU, S; AMARAL, T; EIGENTLER, T.K; GESIERICH, A; HAUSCHILD, A; HEINZERLING, L; KIECKER, F; SCHADENDORF, D; STADLER, R; SUNDERKÄMPTER, C; TÄTING, T; UTIKAL, J; WOLLINA, U; ZOUBOULIS, C.C; KEILHOLZ, U; TESTORI, A; MARTUS, P; LEITER, U; EGGERMONT, A.M.M. Prognosis of Patients with Stage III Melanoma According to American Joint Committee on Cancer Version 8: A Reassessment on the Basis of 3 Independent Stage III Melanoma Cohorts. *Journal of Clinical Oncology*. 2020.

GODAL, Y.N.V.; GAMMON, S.T; PRASAD, R; KNIGHTON, B; PISANESCHI, F; ROSZIK, J; FENG, N; JOHNSON, S; PRAMANIK, S; SUDDERTH, J; SUI, D; HUDGENS, C.W; FISCHER, G.M.; DENG, W; R.A; PENG, W; WANG, J; DI FRANCESCO, M.E; MARSZALEK, J.R.; MCQUADE, J.L.; TETZLAFF, MICHAEL T.; PIWNICA-WORMS, D; DEBERARDINIS, R.J.; DAVIES, M.A. A novel mitochondrial inhibitor blocks MAPK pathway and overcomes MAPK inhibitor-resistance in melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2019.

GROOT, M and LEE, H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells*. 2020.

GRZYWA, T.M; KLIČKA, K; PASKAL, W; DUDKIEWICZ, J; WEJMAN, J; PYZLAK, M; WŁODARSKI, P.K. miR-410-3p is induced by vemurafenib via ER stress and contributes to resistance to BRAF inhibitor in melanoma. *PLoS One*. 2020.

GUO, Y.J; PAN, W.W; LIU, S.B; SHEN, Z.F; XU, Y; HU, L.L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020.

HAFERKAMP, S; ALTER, M; DEBUS, D; SCHILLING, B; PINTER, A; TERHEYDEN, P; UTIKAL, J.S; SACHSE, M.M; HAALCK, T; WOLF, I.H. Patients with BRAF-Mutant Advanced/Metastatic Melanoma: Original Research on the Treatment Reality in Germany and Austria in the Era of Choice. *Advances in Therapy*. 2020

HAN, K; CHEN, X; BIAN, N; MA, B; YANG, T; CAI, C; FAN, Q; ZHOU, Y; ZHAO, TB. MicroRNA profiling identifies miR-195 suppresses osteosarcoma cell metastasis by targeting CCND1. *Oncotarget*, 2015.

Hao, X; Jia, Q; Yuan, J; Shi, X; Guo, H; Gao, J; Guo, Y. MicroRNA 195 suppresses cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian carcinoma via inhibition of the CDC42/CCND1 pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2020

HE, B; CHEN, W; ZENG, J; TONG, W; ZHENG, P. Long noncoding RNA NKILA transferred by astrocyte-derived extracellular vesicles protects against neuronal injury by upregulating NLRX1 through binding to mir-195 in traumatic brain injury. *Aging*. 2021.

- HONG, S.K; STARENKI, D; WU, P.K; PARK, J.I. Suppression of B-Raf^{V600E} melanoma cell survival by targeting mitochondria using triphenyl-phosphonium-conjugated nitroxide or ubiquinone. *Cancer Biology & Therapy*. 2017.
- HUANG, B; CHANG, C; WANG, B; LI, H. ELK1-induced upregulation of lncRNA TRPM2-AS promotes tumor progression in gastric cancer by regulating miR-195/ HMGA1 axis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019
- HUBER, V; VALLACCHI, V; FLEMING, V; HU, X; COVA, A; DUGO, M; SHAHAJ, E; SULSENTI, R; VERGANI, E; FILIPAZZI, P; DE LAURENTIIS, A; LALLI, L; DI GUARDO, L; PATUZZO, R; VERGANI, B; CASIRAGHI, E; COSSA, M; GUALENI, A; BOLLATI, V; ARIENTI, F; DE BRAUD, F; MARIANI, L; VILLA, A; ALTEVOGT, P; UMANSKY, V; RODOLFO, M; RIVOLTINI, L. Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2018.
- JAFARI, D; SHAJARI, S; JAFARI, R; MARDI, N; GOMARI, H; GANJI, F; FOROUZANDEH, M.M; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Designer Exosomes: A New Platform for Biotechnology Therapeutics. *BioDrugs*. 2020
- JAISWAL, R; & SEDGER, L.M. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Frontiers in oncology*. 2019.
- JIANG, M; CHEN, Y; DAI, J et al. Dying tumor cell-derived exosomal miR-194-5p potentiates survival and repopulation of tumor repopulating cells upon radiotherapy in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2020.
- KAKADIA, S; YARLAGADDA, N; AWAD, R; KUNDRANDA, M; NIU, J; NARAEV, B; MINA, L; DRAGOVICH, T; GIMBEL, M; MAHMOUD, F. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *OncoTargets and Therapy*, 2018.
- KNISPTEL, S; ZIMMER, L; KANAKI, T; UGUREL, S; SCHADENDORF, D; LIVINGSTONE, E. The safety and efficacy of dabrafenib and trametinib for the treatment of melanoma. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2018.
- LEE, J.H; DINDORF, J; EBERHARDT, M; LAI, X; OSTALECKI, C; KOLIHA, N; GROSS, S; BLUME, K; BRUNS, H; WILD, S; SCHULER, G; VERA, J; BAUR, A.S. Innate extracellular vesicles from melanoma patients suppress β -catenin in tumor cells by miRNA-34a. *Life Science Alliance*. 2019
- LI, D; ZHAO, Y; LIU, C; CHEN, X; QI, Y; JIANG, Y; ZOU, C; ZHANG, X; LIU, S; WANG, X; ZHAO, D; SUN, Q; ZENG, Z; DRESS, A; LIN, M; KUNG, H; RUI, H; LIU, L; MAO, F; JIANG, B; LAI, L. Analysis of MiR-195 and MiR-497 expression, regulation and role in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011.
- LI, H.J; SUN, X.M; LI, Z.K; YIN, Q.W; PANG, H; PAN, J.J; LI, X; CHEN, W. LncRNA UCA1 Promotes Mitochondrial Function of Bladder Cancer via the MiR-195/ARL2 Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017.
- LI, S; GUO, W; GENG, H; WANG, C; YANG, S; XU, X. LINC00511 exacerbated T-cell acute lymphoblastic leukemia via miR-195-5p/LRRK1 axis. *Bioscience Reports*. 2020.

- LI, Z; ZHOU, X; WEI, M; GAO, X; ZHAO, L; SHI, R; SUN, W; DUAN, Y; YANG, G; YUAN, L. In Vitro and in Vivo RNA Inhibition by CD9-HuR Functionalized Exosomes Encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9. *Nano Letters*. 2019.
- LI-HONG, L.V; WAN, Y.L; LIN, Y; ZHANG, W; YANG, M; LI, G.L; LIN, H.M; SHANG, C.Z; CHEN, Y.J; 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2012.
- LIN, K; CHEN, H; SU, C; ZHU, H; LAI, C; SHI, Y. Long Non-Coding RNA TTN-AS1 Serves as a Competing Endogenous RNA of miR-195 to Facilitate Clear Cell Renal Cell Carcinoma Progression. *Cancer Management and Research*. 2020.
- LIU, C; GUAN, H; WANG, Y; CHEN, M; XU, B; ZHANG, L; LU, K; TAO, T; ZHANG, X; HUANG, Y. miR-195 Inhibits EMT by Targeting FGF2 in Prostate Cancer Cells. *PLoS One*, 2015.
- LIU, H; ZHANG, J; LUO, X; ZENG, M; XU, L; ZHANG, Q; LIU, H; GUO, J; XU, L. Overexpression of the Long Noncoding RNA FOXD2-AS1 Promotes Cisplatin Resistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Through the miR-195/Akt/mTOR Axis. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2020.
- LIU, L; LIU, B; YU, J; ZHANG, D; SHI, J; & LIANG, P. SP1-induced upregulation of lncRNA CTBP1-AS2 accelerates the hepatocellular carcinoma tumorigenesis through targeting CEP55 via sponging miR-195-5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020.
- LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001.
- LONG, G; HAUSCHILD, A; SANTINAMI, M; ATKINSON, V; MANDALÀ, M; CHIARION-SILENI, V; LARKIN, J. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2017.
- LONG, J; LUO, J; YIN, X. MiR-338-5p promotes the growth and metastasis of malignant melanoma cells via targeting CD82. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018.
- LU, G; LI, Y; MA, Y; LU, J; CHEN, Y; JIANG, Q; QIN, Q; ZHAO, L; HUANG, Q; LUO, Z; HUANG, S; WEI, Z. Long noncoding RNA LINC00511 contributes to breast cancer tumorigenesis and stemness by inducing the miR-185-3p/E2F1/Nanog axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018.
- LU, S; SUN, Z; TANG, L; CHEN, L. LINC00355 Promotes Tumor Progression in HNSCC by Hindering MicroRNA-195-Mediated Suppression of HOXA10 Expression. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2020
- LUNAVAT, T.R; CHENG, L; EINARSDOTTIR, B.O; OLOFSSON, B.R; VEPPIL, M.S; SHARPLES, R.A; LÄSSER, C; GHO, Y.S; HILL, A.F; NILSSON, J.A; LÖTVALL, J. BRAFV600 inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017
- MA, X; ZOU, L; CHEN, Z; LI, X; WEI, L; WU, X. Demethylation of miR-195 suppresses prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. *FEBS Open Bio*. 2020.
- MA, X; ZOU, L; LI, X; CHEN, Z; LIN, Q; & WU, X. MicroRNA-195 regulates docetaxel resistance by targeting clusterin in prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018.

MACKIEWICZ, J & MACKIEWICZ, A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Współczesna Onkologia*, 2018.

MARCHETTI, P; TRINH, A; KHAMARI, R; KLUZA, J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2018.

MASTROIANNI, J; STICKEL, N; ANDRLOVA, H; HANKE, K; MELCHINGER, W; DUQUESNE, S; SCHMIDT, D; FALK, M; ANDRIEUX, G; PFEIFER, D; DIERBACH, H; SCHMITT-GRAEFF, A; MEISS, F; BOERRIES, M; ZEISER, R. miR-146a Controls Immune Response in the Melanoma Microenvironment. *Cancer Research*. 2019.

MAUS, R; JAKUB, J; NEVALA, W; CHRISTENSEN, T; NOBLE-ORCUTT, K; SACHS, Z; HIEKEN, T; MARKOVIC, S. Human Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Regulate Dendritic Cell Maturation. *Frontiers in Immunology*, 2017.

MENG, X.F; LIU, A.D; LI, S.L. SNHG1 promotes proliferation, invasion and EMT of prostate cancer cells through miR-195-5p. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020

MINCIACCHI, V. R; YOU, S; SPINELLI, C; MORLEY, S; ZANDIAN, M; ASPURIA, P. J; CAVALLINI, L; CIARDIELLO, C; REIS SOBREIRO, M; MORELLO, M; KHARMATE, G; JANG, S.C; KIM, D.K; HOSSEINI-BEHESHTI, E; TOMLINSON GUNS, E; GLEAVE, M; GHO, Y.S; MATHIVANAN, S; YANG, W; FREEMAN, M. R; DI VIZIO, D. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*, 2015.

MOTTI, M.L; MINOPOLI, M; DI CARLUCCIO, G; ASCIERTO, P.A; CARRIERO, M.V. MicroRNAs as Key Players in Melanoma Cell Resistance to MAPK and Immune Checkpoint Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.

NAJEM, A; KRAYEM, M; SALÈS, F; HUSSEIN, N; BADRAN, B; ROBERT, C; AWADA, A; JOURNE, F; GHANEM, G. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. *European Journal of Cancer*. 2017.

NASERI, Z; OSKUEE, R.K; JAAFARI, M.R; FOROUZANDEH, M.M. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*. 2018.

NIE, H; XIE, X; ZHANG, D; ZHOU, Y; LI, B; LI, F; LI, F; CHENG, Y; MEI, H; MENG, H; JIA, L. Use of lung-specific exosomes for miRNA-126 delivery in non-small cell lung cancer. *Nanoscale*. 2020.

NISSNER, H; SINNBERG, T; KOSNOFEL, C; SMALLEY, K; BECK, D; PRAETORIUS, C; MAI, M; BEISSERT, S; KULMS, D; SCHALLER, M; GARBE, C; FLAHERTY, K.T; WESTPHAL, D; WANKE, I; MEIER, F. BRAF Inhibitors Amplify the Proapoptotic Activity of MEK Inhibitors by Inducing ER Stress in NRAS-Mutant Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2017.

PARAYATH, N.N; PADMAKUMAR, S; AMIJI, M.M. Extracellular vesicle-mediated nucleic acid transfer and reprogramming in the tumor microenvironment. *Cancer Letters*. 2020

POLLOCK, P.M; HARPER, U.L; HANSEN, K.S; YUDT, L.M; STARK, M; ROBBINS, C.M; MOSES, T.Y; HOSTETTER, G; WAGNER, U; KAKAREKA, J; SALEM, G; POHIDA, T; HEENAN, P; DURAY, P; KALLIONIEMI, O; HAYWARD, N.K; TRENT, J.M; MELTZER, P.S. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*. 2003.

- PROIETTI, I; SKROZA, N; BERNARDINI, N; TOLINO, E; BALDUZZI, V; MARCHESIELLO, A; MICHELINI, S; VOLPE, S; MAMBRIN, A; MANGINO, G; ROMEO, G; MADDALENA, P; REES, C; & POTENZA, C. Mechanisms of Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: A Systematic Review. *Cancers*. 2020.
- PUROHIT, P; EDWARDS, R; TOKATLIDIS, K; SAINI, N. MiR-195 regulates mitochondrial function by targeting mitofusin-2 in breast cancer cells. *RNA Biology*. 2019.
- QU, J; ZHAO, L; ZHANG, P; WANG, J; XU, N; MI, W; ZHANG, C; QU, J. MicroRNA-195 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug doxorubicin by targeting the first binding site of BCL2L2 mRNA. *Journal of Cellular Physiology*. 2015.
- RABBIE, R; FERGUSON, P; MOLINA-AGUILAR, C; ADAMS, D.J; ROBLES-ESPINOZA, C.D. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *The Journal of Pathology*. 2019
- RAO, G; DWIVEDI, S.K.D; ZHANG, Y; DEY, A; SHAMEER, K; KARTHIK, R; SRIKANTAN, S; HOSSEN, M.N; WREN, J.D; MADESH, M; DUDLEY, J.T; BHATTACHARYA, R; MUKHERJEE, P. MicroRNA-195 controls MICU1 expression and tumor growth in ovarian cancer. *EMBO Reports*. 2020.
- REID, G; KAO, S.C; PAVLAKIS, N; BRAHMBHATT, H; MACDIARMID, J; CLARKE, S; VAN ZANDWIJK, N. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. *Epigenomics*, 2016.
- ROTARU, M; JITIAN, C.R; IANCU, G.M. A 10-year retrospective study of melanoma stage at diagnosis in the academic emergency hospital of Sibiu County. *Oncology Letters*. 2019.
- ROWDO, F; BARÓN, A; VON E, M.J. In vitro long-term treatment with MAPK inhibitors induces melanoma cells with resistance plasticity to inhibitors while retaining sensitivity to CD8 T cells. *Oncology Reports*. 2017.
- SADRU, A; VOINEA, S; PANAITESCU, E; BLIDARU, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *The Journal of Medicine and Life*. 2014.
- SALE, M; MINIHANE, E; MONKS, N; GILLEY, R; RICHARDS, F; SCHIFFERLI, K; ANDERSEN, C; DAVIES, E; VICENTE, M; OZONO, E; MARKOVETS, A; DRY, J; DREW, L; FLEMINGTON, V; PROIA, T; JODRELL, D; SMITH, P; COOK, S. Targeting melanoma's MCL1 bias unleashes the apoptotic potential of BRAF and ERK1/2 pathway inhibitors. *Nature Communications*. 2019.
- SANTI, A; CASELLI, A; RANALDI, F; PAOLI, P; MUGNAIONI, C; MICHELUCCI, E; CIRRI, P. Cancer associated fibroblasts transfer lipids and proteins to cancer cells through cargo vesicles supporting tumor growth. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015.
- SARKAR, D; LEUNG, E.Y; BAGULEY, B.C; FINLAY, G.J; ASKARIAN-AMIRI, M.E. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics*, 2015.
- SHEN, C.J; CHENG, Y.M; WANG, C.L. LncRNA PVT1 epigenetically silences miR-195 and modulates EMT and chemoresistance in cervical cancer cells. *Journal of Drug Targeting*. 2017.
- SHU, S; YANG, Y; ALLEN, C.L; MAGUIRE, O; MINDERMAN, H; SEN, A; CIESIELSKI, M.J; COLLINS, K.A; BUSH, P.J; SINGH, P; WANG, X; MORGAN, M; QU, J; BANKERT, R.B; WHITESIDE, T.L; WU, Y; ERNSTOFF, M.S. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favors a pre-metastatic microenvironment. *Scientific Reports*. 2018.

- SIMEONE, E; GRIMALDI, A; FESTINO, L; VANELLA, V; PALLA, M; ASCIERTO, P. Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care. *BioDrugs*, 2017.
- SMITH, F.O; DOWNEY, S.G; KLAPPER, J.A; YANG, J.C; SHERRY, R.M; ROYAL, R.E; KAMMULA, U.S; HUGHES, M.S; RESTIFO, N.P; LEVY, C.L; WHITE, D.E; STEINBERG, S.M; ROSENBERG, S.A. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clinical Cancer Research*. 2008.
- SONG, W; CUI, Z; LIU, H; XUE, L; JU, H. The expression and prognostic value of miR-195-5p in patients with advanced gastric cancer after chemotherapy. *Journal of the Balkan Union of Oncology*. 2020.
- SOSMAN, J.A; KIM, K.B; SCHUCHTER, L; GONZALEZ, R; PAVLICK, A.C; WEBER, J.S; MCARTHUR, G.A; HUTSON, T.E; MOSCHOS, S.J; FLAHERTY, K.T; HERSEY, P; KEFFORD, R; LAWRENCE, D; PUZANOV, I; LEWIS, K.D; AMARAVADI, R.K; CHMIELOWSKI, B; LAWRENCE, H.J; SHYR, Y; YE, F; LI, J; NOLOP, K.B; LEE, R.J; JOE, A.K; RIBAS, A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *New England Journal of Medicine*. 2012
- STAVAST, C.J; ERKELAND, S.J. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*. 2019.
- STRUB, T; GHIRALDINI, F; CARCAMO, S; LI M, W.A; SINGH, R; GOLDBERG, M.S; HASSON, D; WANG, Z; GALLAGHER, S.J; HERSEY, P; MA'AYAN, A; LONG, G.V; SCOLYER, R.A; BROWN, B; ZHENG, B; BERNSTEIN, E. SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling. *Nature Communications*. 2018.
- SUETA, A; YAMAMOTO, Y; TOMIGUCHI, M; TAKESHITA, T; YAMAMOTO-IBUSUKI, M; IWASE, H. Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget*. 2017.
- SUN, Y.W; LI, X.H; WANG, H; WU, J. MiR-431 is a prognostic marker and suppresses cell growth, migration and invasion by targeting NOTCH2 in melanoma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019.
- SVEDMAN, F.C; LOHCHAROENKAL, W; BOTTAI, M; BRAGE, S.E; SONKOLY, E; HANSSON, J; PIVARCSI, A; ERIKSSON, H. Extracellular microvesicle microRNAs as predictive biomarkers for targeted therapy in metastatic cutaneous malignant melanoma. *PLoS One*. 2018.
- TANG, T; SHAN, G; ZENG, F. Knockdown of DGCR5 enhances the radiosensitivity of human laryngeal carcinoma cells via inducing miR-195. *Journal of Cellular Physiology*. 2018.
- THÉRY, C; AMIGORENA, S; RAPOSO, G; CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 2006.
- TIAN, Y; CUI, L; LIN, C; WANG, Y; LIU, Z; & MIAO, X. LncRNA CDKN2B-AS1 relieved inflammation of ulcerative colitis via sponging miR-16 and miR-195. *International Immunopharmacology*. 2020.
- TITZE-DE-ALMEIDA, S.S; SOTO-SÁNCHEZ, C; FERNANDEZ, E; KOPRICH, J.B; BROTCHE, J.M; TITZE-DE-ALMEIDA, R. The Promise and Challenges of Developing miRNA-Based Therapeutics for Parkinson's Disease. *Cells*. 2020
- TORTELLI, T.C.J; DE GODOY L.M.F; DE SOUZA G.A; BONATTO, D; OTAKE, A.H, DE FREITAS SAITO, R; ROSA, J.C; GREENE, L.J; CHAMMAS, R. Accumulation of prohibitin is a common

cellular response to different stressing stimuli and protects melanoma cells from ER stress and chemotherapy-induced cell death. *Oncotarget*. 2017.

TUPONE, M.G; D'AGUANNO, S; DI MARTILE, M; VALENTINI, E; DESIDERI, M; TRISCIUOGLIO, D; DONZELLI, S; SACCONI, A; BUGLIONI, S; ERCOLANI, C; BIAGIONI, A; FIBBI, G; FATTORE, L; MANCINI, R; CILIBERTO, G; BLANDINO, G; DEL BUFALO, D. microRNA-378a-5p is a novel positive regulator of melanoma progression. *Oncogenesis*. 2020

VAN ZANDWIJK, N; PAVLAKIS, N; KAO, S.C; LINTON, A; BOYER, M.J; CLARKE, S; HUYNH, Y; CHRZANOWSKA, A; FULHAM, M.J; BAILEY, D.L; COOPER, W.A; KRITHARIDES, L; RIDLEY, L; PATTISON, S.T; MACDIARMID, J; BRAHMBHATT, H; REID, G. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet Oncology*. 2017.

VELLA, L.J; SCICLUNA, B.J; CHENG, L; BAWDEN, E.G; MASTERS, C.L; ANG, C.S; WILLAMSON, N; MCLEAN, C; BARNHAM, K.J; HILL, A.F. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017

VENTURUTTI, L; CORDO-RUSSO, R.I; RIVAS, M.A; MERCOGLIANO, M.F; IZZO, F; OAKLEY, R.H; PEREYRA, M.G; DE MARTINO, M; PROIETTI, C.J; YANKILEVICH, P; ROA, J.C; GUZMÁN, P; CORTESE, E; ALLEMAND, D.H; HUANG, T.H; CHARREAU, E.H; CIDŁOWSKI, J.A; SCHILLACI, R; ELIZALDE, P.V. MiR-16 mediates trastuzumab and lapatinib response in ErbB-2-positive breast and gastric cancer via its novel targets CCNJ and FUBP1. *Oncogene*. 2016

VERGANI, E; DI GUARDO, L; DUGO, M; RIGOLETTO, S; TRAGNI, G; RUGGERI, R; PERRONE, F; TAMBORINI, E; GLOGHINI, A; ARIENTI, F; VERGANI, B; DEHO, P; DE CECCO, L; VALLACCHI, V; FRATI, P; SHAHAJ, E; VILLA, A; SANTINAMI, M; DE BRAUD, F; RIVOLTINI, L; RODOLFO, M. Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget*. 2016.

VERWEIJ, FJ; VAN EIJDHOVEN, MA; MIDDELDORP, J; PEGTEL, DM. Analysis of viral microRNA exchange via exosomes in vitro and in vivo. *Methods in Molecular Biology*. 2013.

VIGNARD, V; LABBÉ, M; MAREC, N; ANDRÉ-GRÉGOIRE, G; JOUAND, N; FONTENEAU, J.F; LABARRIÈRE, N; FRADIN, D. MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunology Research*. 2020.

VULPIS, E; SORIANI, A; CERBONI, C; SANTONI, A; ZINGONI, A. Cancer Exosomes as Conveyors of Stress-Induced Molecules: New Players in the Modulation of NK Cell Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.

WANG, J; ZHUANG, X; GREENE, K; SI, H; ANTONYAK, M; DRUSO, J; WILSON, K; CERIONE, R; FENG, Q; WANG, H. Cdc42 functions as a regulatory node for tumour-derived microvesicle biogenesis. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021.

WANG, K; ZHANG, Z. Expression of miR-203 is decreased and associated with the prognosis of melanoma patients. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015.

WANG, Y; ZHANG, X; ZOU, C; KUNG, H.F; LIN, M.C; DRESS, A; WARDLE, F; JIANG, B.H; LAI, L. miR-195 inhibits tumor growth and angiogenesis through modulating IRS1 in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016.

- WANG¹, H; GUO, X; LIU, X; SONG, X. Down-regulation of lncRNA CASC9 aggravates sepsis-induced acute lung injury by regulating miR-195-5p/PDK4 axis. *Inflammation Research*. 2020.
- WANG¹, L; MA, H; KONG, W; LIU, B; ZHANG, X. Up-regulated circular RNA VANG1 contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-195 and activation of Bcl-2. *Bioscience Reports*. 2019.
- WANG², H; NIU, X; JIANG, H; MAO, F; ZHONG, B; JIANG, X; FU, G. Long non-coding RNA DLX6-AS1 facilitates bladder cancer progression through modulating miR-195-5p/VEGFA signaling pathway. *Aging*. 2020.
- WANG², H; REN, S; D; XU, Y.E; MIAO, W; HUANG, X; QU, Z; LI, J; LIU, X; KONG, P. MicroRNA-195 reverses the resistance to temozolomide through targeting cyclin E1 in glioma cells. *Anti-Cancer Drugs*. 2019.
- WANG³, Q.M; LIAN, G.Y; SONG, Y; HUANG, Y.F; GONG, Y. LncRNA MALAT1 promotes tumorigenesis and immune escape of diffuse large B cell lymphoma by sponging miR-195. *Life Sciences*. 2019.
- WANG³, X; LI, X; FU, Z; ZHOU, Y; HUANG, X; JIANG, X. Long non coding RNA LINC00473/miR 195 5p promotes glioma progression via YAP1 TEAD1 Hippo signaling. *The International Journal of Oncology*. 2020.
- WANG⁴, X; HE, C; YANG, Z; LI, S; QIAO, L; FANG, L. Dysregulation of long non-coding RNA SNHG12 alters the viability, apoptosis, and autophagy of prostate cancer cells by regulating miR-195/CCNE1 axis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2019.
- WEI, D; ZHAN, W; GAO, Y; HUANG, L; GONG, R; WANG, W; ZHANG, R; WU, Y; GAO, S; KANG, Ti. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Research*. 2021
- WELSH, S.J; RIZOS, H; SCOLYER, R.A; LONG, G.V. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *European Journal of Cancer*. 2016
- WU, D; LI, Y; ZHANG, H; HU, X. Knockdown of Lncrna PVT1 Enhances Radiosensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer by Sponging Mir-195. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017
- WU, X; XIA, T; CAO, M; ZHANG, P; SHI, G; CHEN, L; ZHANG, J; YIN, J; WU, P; CAI, B; LU, Z; MIAO, Y; JIANG, K. LncRNA BANC1 Promotes Pancreatic Cancer Tumorigenesis via Modulating MiR-195-5p/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2019
- XING, Z; LI, S; LIU, Z; ZHANG, C; MENG, M; BAI, Z. The long non-coding RNA LINC00473 contributes to cell proliferation via JAK-STAT3 signaling pathway by regulating miR-195-5p/SEPT2 axis in prostate cancer. *Bioscience Reports*. 2020
- XU, J; LI, Z; SU, Q; ZHAO, J; MA, J. Suppression of long noncoding RNA LINC00324 restricts cell proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma through downregulation of TRIM29 via upregulating microRNA-195-5p. *Aging*. 2020.
- XU, R; RAI, A; CHEN, M; SUWAKULSIRI, W; GREENING, D.W; SIMPSON, R.J. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018.
- YAMAZAKI, H; CHIJIWA, T; INOUE, Y; ABE, Y; SUEMIZU, H; KAWAI, K; WAKUI, M; FURUKAWA, D; MUKAI, M; KUWAO, S; SAEGUSA, M; NAKAMURA, M. Overexpression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2012

- YANG, C; WU, K; WANG, S; WEI, G. Long non-coding RNA XIST promotes osteosarcoma progression by targeting YAP via miR-195-5p. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018.
- YANG, L; CAI, Y; ZHANG, D; SUN, J; XU, C; ZHAO, W; JIANG, W; PAN, C. miR-195/miR-497 Regulate CD274 Expression of Immune Regulatory Ligands in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*. 2018.
- YANG, X; ZHAO, H; YANG, J; MA, Y; LIU, Z; LI, C; WANG, T; YAN, Z; DU, N. MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg Effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019.
- YIN, Y; HONG, S; YU, S; HUANG, Y; CHEN, S; LIU, Y; ZHANG, Q; LI, Y; XIAO, H. MiR-195 Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma Cell Lines by Targeting CCND1 and FGF2. *International Journal of Endocrinology*. 2017.
- YONGCHUN, Z; LINWEI, T; XICAI, W; LIANHUA, Y; GUANGQIANG, Z; MING, Y; GUANJIAN, L; YUJIE, L; YUNCHAO, H. MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB. *Cancer Letters*, 2014.
- YOSHIDA, K; TSUDA, M; MATSUMOTO, R; SEMBA, S; WANG, L; SUGINO, H; TANINO, M; KONDO, T; TANABE, K.; & TANAKA, S. Exosomes containing ErbB2/CRK induce vascular growth in premetastatic niches and promote metastasis of bladder cancer. *Cancer Science*. 2019.
- YU¹, W; LIANG, X; LI, X; ZHANG Y, SUN, Z; LIU, Y; WANG, J. MicroRNA-195: a review of its role in cancers. *OncoTargets and Therapy*. 2018.
- YU², X; ZHANG, Y; MA, X; PERTSEMLIDIS, A. miR-195 potentiates the efficacy of microtubule-targeting agents in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*. 2018.
- ZHANG, Y; XU, M; ZHANG, X; CHU, F; ZHOU, T. MAPK/c-Jun signaling pathway contributes to the upregulation of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL induced by Epstein-Barr virus-encoded BARF1 in gastric carcinoma cells. *Oncology Letters*, 2018.
- ZHANG, Z; LV, M; WANG, X; ZHAO, Z; JIANG, D; WANG, L. LncRNA LUADT1 sponges miR-195 to prevent cardiac endothelial cell apoptosis in sepsis. *Molecular Medicine*. 2020.
- ZHENG, L; CHEN, J; ZHOU, Z; HE, Z. miR-195 enhances the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing CARM1. *OncoTargets and Therapy*. 2017.
- ZHOU, X; YAN, T; HUANG, C; XU, Z; WANG, L; JIANG, E; WANG, H; CHEN, Y; LIU, K; SHAO, Z; SHANG, Z. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018.
- ZUO, W; ZHANG, W; XU, F; ZHOU, J; BAI, W. Long non-coding RNA LINC00485 acts as a microRNA-195 sponge to regulate the chemotherapy sensitivity of lung adenocarcinoma cells to cisplatin by regulating CHEK1. *Cancer Cell International*. 2019.

8. ANEtXOS

Anexo I. Carta de aprovação CIBIO



Departamento de Radiologia
Av. Dr. Arnaldo, 455 – 4º andar – sala 4123
CEP 01246-903
São Paulo - SP - Brasil
Fone/Fax: (11) 3061.7161



APROVAÇÃO

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo APROVOU no dia 05/05/2019 o projeto de pesquisa: **“Efeito da super-expressão do mir-195 na carga de vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação”**.

Pesquisador Responsável: Roger Chammas

Pesquisador Executante: Nathalia Leal Santos

São Paulo, 05 de maio de 2019.

Prof. Dr. Bryan Eric Strauss
Presidente da Comissão de Biossegurança
Departamento de Radiologia
FMUSP

Anexo II. carta de aprovação CEP**APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/12/2019, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 477/19 intitulado: **Efeito da superexpressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação.** Apresentado pelo Departamento ICESP.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Roger Chammas

Pesquisador (a) Executante: Nathalia Leal Santos

CEP-FMUSP, 11 de Dezembro de 2019.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo III. Carta de Aprovação CEUA



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito de vesículas extracelulares oriundas de células de melanoma humano que superexpressam miR-195 no crescimento tumoral in vivo**” registrada com o nº **1637/2021**, sob a responsabilidade de **Roger Chammas e Nathalia Leal Santos**, apresentada pelo ICESP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 31/03/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-03-2021 Término: 01-05-2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c NUDE
Nº de animais	21
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 31 de março de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

Anexo IV. Prorrogação CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 31/08/2021 **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **1637/2021** intitulado “**Avaliação do efeito de vesículas extracelulares oriundas de células de melanoma humano que superexpressam miR-195 no crescimento tumoral in vivo**” apresentado pelo ICESP.

- Prorrogação de prazo para **01 de setembro de 2022**;
- Acréscimo de **10 camundongos Balb/c Nude**, machos com 7 semanas.

Pesquisador Responsável: **Roger Chammas**

CEUA-FMUSP, 31 de agosto de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

Anexo V. Lista de genes avaliados por RT-qPCR por microfluídica

1. ABCB1
2. ABCC1
3. ACTB
4. ACVR1B
5. AKT1
6. ALDH1A1
7. ATF4
8. ATF6
9. ATM
10. AXIN2
11. B2M
12. BAD
13. BAX
14. BBC3
15. BCL2
16. BCL2L1
17. BIRC5
18. CASP8
19. CCND1
20. CD274
21. CD44
22. CDH1
23. CDH2
24. CDH5
25. CDKN1A
26. CDKN2A
27. CDKN3
28. CFLAR
29. COL6A2
30. CXCR4
31. E2F1
32. EGFR
33. EGR1
34. EIF2AK3
35. EPHA2
36. ERN1
37. FGF13
38. FGF2
39. FGF2R
40. FLOT2
41. FOS
42. GAPDH
43. GUSB
44. HIF1A
45. HMGB1
46. HPRT1
47. IGF1R
48. JUN
49. KRAS
50. LAMC2
51. LATS1
52. LATS2
53. MCL1
54. MDM2
55. MITF
56. MMP1
57. MMP12
58. MMP9
59. MYC
60. NANOG
61. NFE2L2
62. NFE2L3
63. NODAL
64. NOTCH1
65. NOTCH4
66. PDCD1
67. PHB
68. POU5F1
69. PTEN
70. RB1
71. RHOA
72. RIPK2
73. RIPK3
74. RPLP0
75. SNAI1
76. SOX2
77. SOX7
78. STAT1
79. STAT3
80. STK3
81. STK4
82. TAZ
83. TBK1
84. TFRC
85. TGFB1
86. TRAF6
87. TWIST1
88. TWIST2
89. VEGFA
90. VIM
91. WNT3A
92. WNT5A
93. YAP1
94. YWHAZ
95. ZEB1
96. ZEB2

Anexo VI. Certificado de autenticação das linhagens utilizadas



DTAPEP
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS

Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Tharcisio Citrângulo Tortelli Jr
Instituição / Institution	ICESP
Departamento / Department	CTO
Telefone / Phone	3893-3007
E-mail	tharcisio.junior@hc.fm.usp.br
Nome da Linhagem / Cell line name	A375
Amostra recebida em / Samples received in	18-01-2018
Data do laudo / Report date:	25-06-2018

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile			
	Perfil da Amostra / Query Profile A375				Perfil da referência / Database Profile CRL-1872			
TH01	8				8			
TPOX	16	17			16	17		
vWA	16	17			16	17		
CSF1PO	11	12			11	12		
D16S539	9				9			
D7S820	9				9			
D13S317	11	14			11	14		
D5S818	12				12			
D21S11	29	30						
Amelogenin	x				x			
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:								13
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:								13
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:								100

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

METODOLOGIA / METHODOLOGY

10 STR's, correspondendo aos loci TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin e D21S11 (GenePrint 10 / Promega), foram amplificados e submetidos à eletroforese capilar

para separação dos fragmentos (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Os dados foram analisados através do software XXX GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados na validação de cada amostra. / 10 STR's (TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin and D21S1- GenePrint 10 / Promega) are co-amplified and submitted to capillary electrophoresis (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). An internal lane standard (ILS) and allelic ladder are provided for sizing and genotyping of amplified fragments, and the 2800M Control DNA is supplied as a positive control (GenePrint 10 / Promega). Data is analyzed using software GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC).

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados (DSMZ, ATCC, JCRB e RIKEN) / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database (DSMZ, ATCC, JCRB or RIKEN)
- A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell lines):
A375.S2 Melanoma Human (ATCC #:CRL-1872)
(DSMZ, ATCC, JCRB and RIKEN)
- O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) / The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):
(DSMZ, ATCC, JCRB and RIKEN)

OBSERVAÇÕES / Additional Comments

100% Match ATCC #: CRL-1872 ,CRL-1619, CRL-3222,CRL-3223,CRL-3224

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br

07/06/2019

ALC_Laudo_OS: 50



DTAPEP
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS

Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Silvina Bustos
Instituição / Institution	ICESP
Departamento / Department	RADIOLOGIA E ONCOLOGIA
Telefone / Phone	30617486
E-mail	silvinabvg@gmail.com
Nome da Linhagem / Cell line name	SK-MEL-5
Amostra recebida em / Samples received in	00-00-0000
Data do laudo / Report date:	06-06-2019

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile			
	Perfil da Amostra / Query Profile SK-MEL-5				Perfil da referência / Database Profile SK-MEL-5 Melanoma Human (ATCC:HTB-70)			
TH01	6	9			6	9		
TPOX	11				11			
vWA	14				14	18		
CSF1PO	10	13			10	13		
D16S539	10	12			10	12		
D7S820	9	12			9	12		
D13S317	10	12			10	12		
D5S818	11	13			11	13		
D21S11								
Amelogenin	x				x			
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:								15
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:								16
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:								94

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

METODOLOGIA / METHODOLOGY

10 STR's, correspondendo aos loci TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin e D21S11 (GenePrint 10 / Promega), foram amplificados e submetidos à eletroforese capilar para separação dos fragmentos (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Os dados foram analisados através do software XXX GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados na validação de cada amostra. / 10 STR's (TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin and D21S11 - GenePrint 10 / Promega) are co-amplified and submitted to capillary electrophoresis (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). An internal lane standard (ILS) and allelic ladder are provided for sizing and genotyping of amplified fragments, and the 2800M Control DNA is supplied as a positive control (GenePrint 10 / Promega). Data is analyzed using software GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC).

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database
- A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell lines:

07/06/2019

O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) /

ALC_Laudo_OS: 50

The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):

SK-MEL-5 Melanoma Human (ATCC: HTB-70)

OBSERVAÇÕES / Additional Comments

https://www.atcc.org/STR_Database.aspx

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br

07/06/2019

ALC_Laudo_OS: 53



DTAPEP
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS

Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Silvina Bustos
Instituição / Institution	ICESP
Departamento / Department	RADIOLOGIA E ONCOLOGIA
Telefone / Phone	30617486
E-mail	silvinabvg@gmail.com
Nome da Linhagem / Cell line name	SK-MEL-28
Amostra recebida em / Samples received in 00-00-0000	Data do laudo / Report date: 06-06-2019

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)			Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile		
	Perfil da Amostra / Query Profile SK-MEL-28			Perfil da referência / Database Profile SK-MEL-28 Melanoma Human (ATCC:HTB-72)		
TH01	7			7		
TPOX	8	12		8	12	
vWA	16	19		16	19	
CSF1PO	10	12		10	12	
D16S539	9	12		9	12	
D7S820	10			9.3	10	
D13S317	11	12		11	12	
D5S818	13			11	13	
D21S11						
Amelogenin	x	y		x	y	
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:						15
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:						17
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:						88

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related, i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

METODOLOGIA / METHODOLOGY

10 STR's, correspondendo aos loci TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin e D21S11 (GenePrint 10 / Promega), foram amplificados e submetidos à eletroforese capilar para separação dos fragmentos (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Os dados foram analisados através do software XXX GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados na validação de cada amostra. / 10 STR's (TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin and D21S11 - GenePrint 10 / Promega) are co-amplified and submitted to capillary electrophoresis (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). An internal lane standard (ILS) and allelic ladder are provided for sizing and genotyping of amplified fragments, and the 2800M Control DNA is supplied as a positive control (GenePrint 10 / Promega). Data is analyzed using software GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC).

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database
- A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell lines:

O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) /

07/06/2019

ALC_Laudo_OS: 53

The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):

SK-MEL-28 Melanoma Human (ATCC:HTB-72)

OBSERVAÇÕES / Additional Comments

https://www.atcc.org/STR_Database.aspx

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br

http://www.premium.fm.usp.br/balcao_rdprem/impr_janela.php?tp=clc_laudo&cod=53

3/3



DTAPEP
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS

Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Silvina Bustos
Instituição / Institution	ICESP
Departamento / Department	RADIOLOGIA E ONCOLOGIA
Telefone / Phone	30617486
E-mail	silvinabvg@gmail.com
Nome da Linhagem / Cell line name	UACC 62
Amostra recebida em / Samples received in	00-00-0000
Data do laudo / Report date:	06-06-2019

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile			
	Perfil da Amostra / Query Profile UACC 62				Perfil da referência / Database Profile UACC-62 (RRID:CVCL_1780)			
TH01	6	9			6	9		
TPOX	8	11			8	11		
vWA	16	17			16	17		
CSF1PO	10	11			10	11		
D16S539	9	12			9	12		
D7S820	8	11			8	11		
D13S317	12	13			12			
D5S818	10	12			10	12		
D21S11								
Amelogenin	x				x			
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:								16
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:								17
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:								94

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

METODOLOGIA / METHODOLOGY

10 STR's, correspondendo aos loci TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin e D21S11 (GenePrint 10 / Promega), foram amplificados e submetidos à eletroforese capilar para separação dos fragmentos (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). Os dados foram analisados através do software XXX GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados na validação de cada amostra. / 10 STR's (TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin and D21S11 - GenePrint 10 / Promega) are co-amplified and submitted to capillary electrophoresis (3730 DNA Analyzer - Applied Biosystems). An internal lane standard (ILS) and allelic ladder are provided for sizing and genotyping of amplified fragments, and the 2800M Control DNA is supplied as a positive control (GenePrint 10 / Promega). Data is analyzed using software GeneMaker HDI v.1.1.0 (Softgenetics LCC).

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database
- A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell lines):

O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) /

07/06/2019

ALC_Laudo_OS: 54

The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):
UACC-62 (RRID:CVCL_1780)

OBSERVAÇÕES / Additional Comments
https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1780

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel
Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br

http://www.premium.fm.usp.br/balcao_rdprem/fmpr_janela.php?tp=clc_laudo&cod=54

3/3

APÊNDICE

Apêndice I. Súmula Curricular

Nome: Nathalia Leal Santos

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2008-2014	Ensino Fundamental e Médio	Julia Lopes de Almeida
2015-2018	Graduação – Bacharel em Biotecnologia	Universidade Federal de São Carlos
2019 – Em andamento	Mestrado – PPG Oncologia	Universidade de São Paulo

2) Histórico Profissional

2.1. Posições

- 2016-2019 – Bolsista de Iniciação Científica (UFSCar)
- 2018-2019 – Estágio de Conclusão de Curso (ICESP)

2.2. Atuação acadêmica

- 2019-2021 – Membro da comissão organizadora do VI Curso em Oncologia Molecular FMUSP/ICESP.
- 2021 (atual) – Membro da Sociedade SNEV (*Student Network on Extracellular Vesicles*).

2.3. Premiações

- Menção honrosa de apresentação na modalidade de Biotecnologia (XXV Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica da UFSCar, 2018).
- Menção honrosa de apresentação - 4º lugar na categoria mestrado (Trabalho apresentado na XI Jornada da Pós Graduação em Oncologia, 2019)
- Melhor pôster na categoria mestrado - 1º lugar (Trabalho apresentado no I Congresso de Câncer de São Paulo, 2020)

3) Publicações

3.1. Trabalhos publicados

- BETTANI, S.R.; RAGAZZO, G.O; SANTOS, N.L; KIECKBUSCH, T.G; GASPAR, B.R; SOARES, M.R; da SILVA, M.A. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. *Carb. Pol*, v. 203, p. 322-330, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.041>
- SANTOS, N.L; RAGAZZO, G.O; CERRI, B.C; SOARES, M.R; KIECKBUSCH, T.G; da SILVA, M.A. Physicochemical properties of konjac glucomannan/alginate films enriched with sugarcane vinasse intended for mulching applications. *Int. J. Bio. Macromol.*, v. 165, p. 1717-1726, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.049>
- SANTOS, N.L; BUSTOS, S.O; BHATT, D; CHAMMAS, R AND ANDRADE, L.N.S. Tumor-Derived Extracellular Vesicles: Modulation of Cellular Functional Dynamics in Tumor Microenvironment and Its Clinical Implications. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.737449>

3.2. Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- SANTOS, N.L.; RAGAZZO, G.O; BETTANI, S.R; SOARES, M.R; da SILVA, M.A. *Efeito da adição de ácido cítrico nas propriedades de filmes de pectina e vinhaça*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2017, São Carlos. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2016. p. 1262.
- RAGAZZO, G. O; SANTOS, N. L; BETTANI, S. R; SOARES, M. R; da SILVA, M.A. *Estudo da solubilidade e resistência mecânica de partículas de pectina, quitosana e vinhaça para uso como biofertilizante*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2017, São Carlos. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2016. p. 1268.

3.3. Resumos publicados em anais de congressos

- SANTOS, N.L; RAGAZZO, G.O; BETANNI, S.R; KIECKBUSH, T. G; SOARES, M. R; da SILVA, M.A. *Evaluation of the production process of pectin and vinasse biodegradable films for soil applications*. In: 18th International Symposium on Toxicity Assessment, 2017, Limeira. 18th International Symposium on Toxicity Assesment - Conference Proceedings. São Paulo: Applied Research in Toxicology, 2017. v. 2. p. 55-55.
- RAGAZZO, G.O; SANTOS, N. L; BETANNI, S.R; KIECKBUSH, T. G; SOARES, M. R.; da SILVA, M.A. *Use of vinasse in the production of biodegradable pectin beads as an*

alternative soil fertilizer. In: 18th International Symposium on Toxicity Assessment, 2017, Limeira. 18th International Symposium on Toxicity Assessment - Conference Proceedings. São Paulo: Applied Research in Toxicology, 2017. v. 2. p. 72-72.

- BETTANI, S. R; RAGAZZO, G. O; SANTOS, N. L; BASTOS, R. G; SOARES, M.R; davSILVA, M.A. *Physico-chemical properties of chitosan vinasse biodegradable beads as biofertilizer. In: ASABE Annual International Meeting, 2017, Spokane. Proceedings of the 2017 ASABE Annual International Meeting, 2017. p. 1-1.*
- SANTOS, N.L; Andrade, L.N.S; Chammas, R. *Extracellular vesicles secreted by melanoma cells overexpressing miR-195 modulates naïve cells sensitivity to targeted therapy. In: I Congresso de Câncer de São Paulo - SP Câncer, 2020, SP. I Congresso de Câncer de São Paulo - SP Câncer, 2020.*
- SANTOS, N.L.; Chammas, R; Andrade, L.N.S. *Extracellular vesicles carrying miR-195 sensitizes melanoma cells to combined targeted therapy. In: SNEV 2021 International Virtual Conference, 2021. Abstract Book - International Virtual Conference 2021, 2021.*

3.4. Capítulos de livro

- SANTOS, N.L; FURUYA, T.K; NAGAI, M.A. *Expressão Gênica e Epigenética. In: Oncologia - da molécula à clínica. In press. Editora dos Editores. 2021.*

4) Projetos Aprovados

4.1. Concluídos

- Estudo da biodegradação de filmes de pectina, quitosana e vinhaça para uso na agricultura. Iniciação Científica, CNPq. (2016-2017).
- Processo de obtenção e caracterização de filmes à base de biopolímeros e vinhaça para aplicação na agricultura. Iniciação Científica, CNPq. (2017-2018).
- Efeito da super-expressão do miR-195 na carga de microRNAs presentes em vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma humano e na regulação da sensibilidade ao tratamento alvo-dirigido via transferência horizontal de informação. Mestrado, FAPESP. (2019-2021).

Apêndice II. Cópia do Manuscrito Publicado



Tumor-Derived Extracellular Vesicles: Modulation of Cellular Functional Dynamics in Tumor Microenvironment and Its Clinical Implications

Nathalia Leal Santos¹, Silvina Odete Bustos¹, Darshak Bhatt^{1,2}, Roger Chammas^{1*} and Luciana Nogueira de Sousa Andrade^{1*}

¹ Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Department of Medical Microbiology and Infection Prevention, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, Netherlands

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Karina Oliveira,
National Center for Research
in Energy and Materials, Brazil

Reviewed by:

Ariane Lopes,
National Center for Research
in Energy and Materials, Brazil
Hinrich Peter Hansen,
University of Cologne, Germany

*Correspondence:

Roger Chammas
rchammas@usp.br
Luciana Nogueira de Sousa Andrade
luciana.nsandrade@hc.fm.usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Pathology,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 07 July 2021

Accepted: 09 August 2021

Published: 31 August 2021

Citation:

Santos NL, Bustos SO, Bhatt D,
Chammas R and Andrade LNS (2021)
Tumor-Derived Extracellular Vesicles:
Modulation of Cellular Functional
Dynamics in Tumor Microenvironment
and Its Clinical Implications.
Front. Cell Dev. Biol. 9:737449.
doi: 10.3389/fcell.2021.737449

Cancer can be described as a dynamic disease formed by malignant and stromal cells. The cellular interaction between these components in the tumor microenvironment (TME) dictates the development of the disease and can be mediated by extracellular vesicles secreted by tumor cells (TEVs). In this review, we summarize emerging findings about how TEVs modify important aspects of the disease like continuous tumor growth, induction of angiogenesis and metastasis establishment. We also discuss how these nanostructures can educate the immune infiltrating cells to generate an immunosuppressive environment that favors tumor progression. Furthermore, we offer our perspective on the path TEVs interfere in cancer treatment response and promote tumor recurrence, highlighting the need to understand the underlying mechanisms controlling TEVs secretion and cargo sorting. In addition, we discuss the clinical potential of TEVs as markers of cell state transitions including the acquisition of a treatment-resistant phenotype, and their potential as therapeutic targets for interventions such as the use of extracellular vesicle (EV) inhibitors to block their pro-tumoral activities. Some of the technical challenges for TEVs research and clinical use are also presented.

Keywords: extracellular vesicles, tumor microenvironment, cell communication, tumor progression, functional dynamics

INTRODUCTION

Malignant tumors are defined as a microenvironment composed not only by different clones of tumor cells, but also by stromal cells as well as extracellular matrix (ECM) (Quail and Joyce, 2013). All these components interact with each other dictating the natural history of the disease and the response to treatment. From an ecological point of view, these interactions can be described as cooperative or competitive and, in both cases, depend on the mechanism of cellular communication (Pelham et al., 2020). In fact, these interactions are dynamic and mediated not only by soluble factors secreted by cells or trapped in the ECM, but also by extracellular vesicles (EVs) (Tkach and Théry, 2016).

Extracellular vesicles are spherical lipid bilayer structures secreted by many cell types which play an important role in tumor progression (Schubert and Boutros, 2021). In the last decade, it has become clear that EVs shuttle messages between cells at short and large distances, changing the way cell communication has been described so far (Raposo and Stahl, 2019). Two major classes of EVs, exosomes (or small vesicles, from 30 to up 150 nm in size) and microvesicles (or large vesicles, from > 100 nm to 1 μ m) are the most studied and better characterized among the other EVs types. Exosomes have endocytic origin, being formed as intraluminal vesicles (ILVs) by inward budding of the limiting membrane of late endosomes. After the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane, exosomes are released into the extracellular environment. By contrast, microvesicles are formed by outward budding of the plasma membrane (van Niel et al., 2018). The other classes of EVs, like large oncosomes, apoptotic bodies and platelet-derived vesicles, will not be discussed in this Review.

Amongst the diverse means of communication, EVs are the only ones that are known to carry almost all types of signaling molecules varying from DNA, different types of RNAs, protein/ligands, enzymes, metabolites, growth factors, lipids and even cytokines as recently described (Fitzgerald et al., 2018; Anand et al., 2019; Lázaro-Ibáñez et al., 2019; O'Brien et al., 2020). In general, EVs exert their effects by the transfer of their cargo to recipient cells modulating their phenotype and function (Yáñez-Mó et al., 2015). In this review, we will discuss some examples of how EVs can orchestrate cellular communication in the tumor microenvironment (TME) to promote tumor progression. In addition, we will exploit the role of these EVs in treatment response and discuss the gaps and future directions for clinics and EVs research. We apologize to all authors whose relevant and important work could not be cited due to space constraints.

TEVs AS IMPORTANT MEDIATORS OF CELL COMMUNICATION DURING MALIGNANT TRANSFORMATION AND TUMOR PROGRESSION

In the past years, several groups showed that extracellular vesicles secreted by tumor cells (Tumor-Derived Extracellular Vesicles, TEVs) can modulate the cancer hallmarks described in 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011). For example, it is already known that TEVs are able to promote cooperation with stromal cells like endothelial cells to allow tumor development (Aslan et al., 2019), to suppress the anti-tumor immune response in cancer patients (Sharma et al., 2020), and to signal at distant sites to resident cells for the establishment of pre-metastatic niche (Costa-Silva et al., 2015).

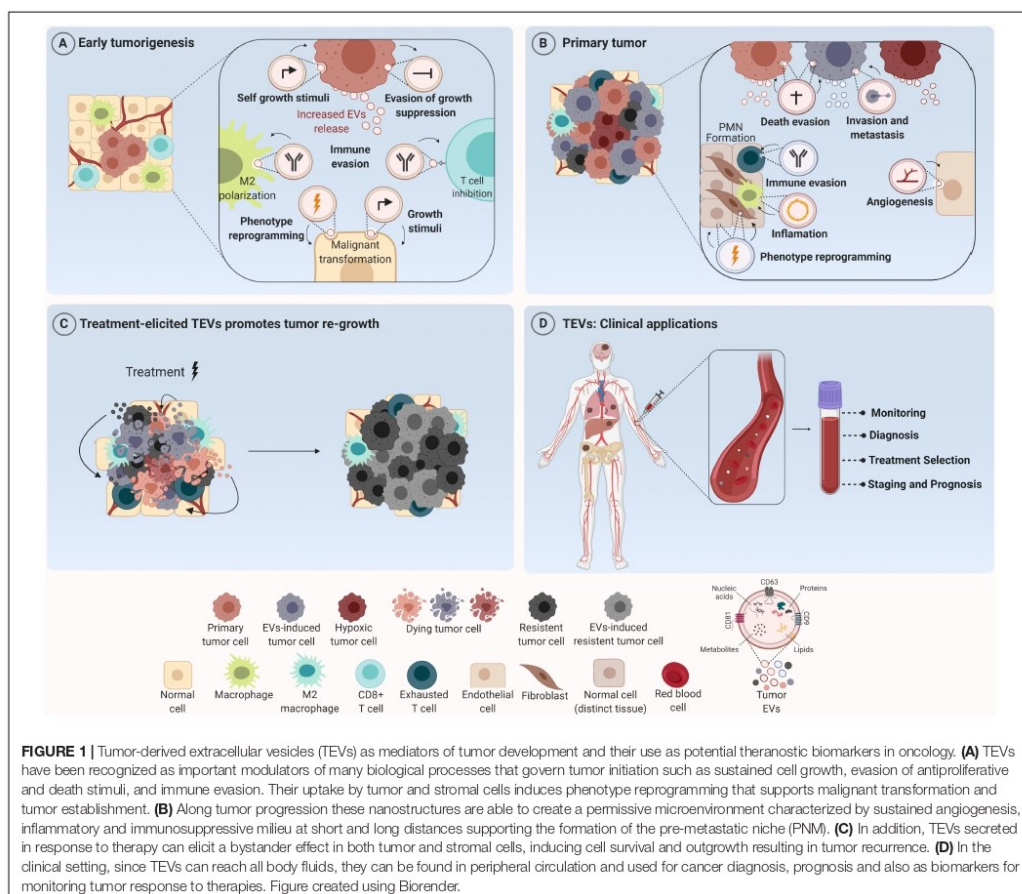
In fact, TEVs can also participate in tumor initiation and propagation. In the study of Kalra et al. (2019), TEVs from colorectal cancer (CRC) cells harboring β -catenin mutation were shown to transfer this protein to wild-type CRC recipient cells, inducing the activation of WNT signaling pathway in these cells

and, consequently, boosting tumor growth in xenograft models. Similarly, Fonseka et al. (2019) showed that TEVs secreted by N-myc-amplified neuroblastoma cells increased the proliferative and migratory potential of N-myc-non-amplified tumor cells, increasing tumor aggressiveness. Furthermore, very recently, an interesting study conducted by Kilinc et al. (2021) demonstrated that oncogene activation led to regulation of EVs release and cargo, suggesting that these nanostructures are biologically relevant even in the initial phases of the disease (Figure 1A).

Beyond this scenario, an important hallmark of solid tumors is the induction of angiogenesis – a *sine qua non-condition* for continuous tumor growth and progression (Folkman, 1975). More recently, several groups showed that TEVs are one of the mediators for this process (Yang et al., 2018; Bai et al., 2019; He et al., 2019; Wang et al., 2019; Shang et al., 2020; Biagioni et al., 2021). Indeed, in 2017, it was demonstrated that TEVs from glioma stem-like cells carried VEGF-A (Treppe et al., 2017). One year later, Tang et al. (2018) observed that TEVs from ovarian cancer contained E-cadherin in their surface which were able to form heterodimers with VE-cadherin in endothelial cells, promoting their sprouting and angiogenesis *in vivo*. Furthermore, Sato et al. (2019) demonstrated that higher expression of EPHB2 within EVs isolated from head and neck squamous carcinoma cell lines were able to promote angiogenesis through the activation of ephrin reverse signaling in endothelial cells. Interestingly, Ko et al. (2019) observed that TEVs from ovarian cancer induced migration and tube formation by endothelial cells through a bevacizumab-insensitive VEGF presented in vesicles, showing that TEVs can also impair the efficacy of anti-angiogenic therapies. Furthermore, the pro-angiogenic role of TEVs can also be a consequence of their uptake by other stromal cells like fibroblasts, inducing a pro-tumoral phenotype in these cells (Zhou et al., 2018; Fan et al., 2020; Figure 1B).

Additionally, environmental stimuli like hypoxia can somehow modify TEVs release and/or TEVs cargo leading to increased angiogenesis (Chen X. et al., 2018; Guo et al., 2018; Wang et al., 2018; Park et al., 2019; Qian et al., 2020). Under hypoxia, for example, lung cancer cells produce more exosomes in comparison to normoxia. Elevated levels of miR-23a were found inside these exosomes which targeted prolyl hydroxylase 1 and 2 (PHD1 and 2), leading to an increase in HIF-1 alpha in endothelial recipient cells and sustained angiogenesis and tumor growth *in vivo*. Furthermore, enrichment of Wnt4 protein and carbonic anhydrase 9 (CA9) in TEVs in response to hypoxia were demonstrated to be responsible for increased angiogenesis in colorectal cancer (Horie et al., 2017; Huang and Feng, 2017). Beyond angiogenesis, TEVs secreted under hypoxia can also promote cancer progression through the induction of drug resistance (Dorayappan et al., 2018), stemness phenotype and increased invasive capability (Ramteke et al., 2015).

In fact, concerning metastasis, the mechanisms triggered by TEVs are quite diverse. EVs derived from the plasma of CRC patients were enriched with ITGBL1 and associated with lung and liver metastasis. This effect was caused by the activation of resident fibroblasts, which were induced to secrete pro-inflammatory cytokines, promoting the establishment of the



pre-metastatic niche (Ji et al., 2020). Similarly, EVs secreted by pancreatic tumor cells were shown to be selectively taken up by Kupffer cells (KC) in the liver leading to the release of TGF β and the production of fibronectin by hepatic stellate cells, which recruited bone marrow-derived macrophages to establish a pro-inflammatory milieu to facilitate tumor metastasis (Costa-Silva et al., 2015). Few years later, Zeng et al. (2018) observed that TEVs from CRC not only increased vascular permeability, but also enhanced CRC metastasis in liver and lungs. Moreover, exosomes carrying miR-122 released by breast cancer cells reduced glucose uptake by normal recipient cells in pre-metastatic niche, increasing nutrient supply for metastatic cells Fong et al., 2015). Then, the metastatic effect by TEVs can also be mediated by their effect in stromal cells like fibroblasts (Fang et al., 2018; Xu et al., 2019); macrophages (Liang et al., 2019; Zhao et al., 2020) and in bone stroma (Dai et al., 2019) at long distances (Figure 1B).

THE ESTABLISHMENT OF AN IMMUNOSUPPRESSIVE ENVIRONMENT BY TEVs

Regarding the regulation of immune cells in TME, TEVs can educate infiltrating immune cells to cooperate with malignant cells, creating a permissive environment for tumor progression. In this context, EVs shed by GBM cells displaying PD-L1 were able to induce CD8 T cells exhaustion by directly binding to PD-1, thus facilitating tumor progression and impairing immunotherapy treatment efficacy (Ricklefs et al., 2018). Similar results were obtained for EVs derived from metastatic melanoma (Chen G. et al., 2018). In NSCLC patients, PD-L1 enriched exosomes from these patients inhibited IL-2 and IFN- γ production by T CD8 $^{+}$ lymphocytes (Kim et al., 2019). In fact, exosomal PD-L1 is already pointed

out as an important biomarker in treatment management which demonstrates the translation of these findings into clinical practice. In hepatocarcinoma cells, TEVs can induce an immunosuppressive phenotype also in infiltrating B cells (Ye et al., 2018). In addition, interestingly, these immunosuppressive effects of TEVs also occur at long distances beyond the primary tumor site. Hsieh et al. (2018) showed that EVs shed by head and neck cancer cells induced M2 polarization through the transfer of miR-21 to CD14⁺ human monocytes, favoring tumor growth (Figure 1B). In fact, this work shows that these cooperative relationships mediated by TEVs are not restricted to the tumor primary site and indeed can be established even at larger distances due to their presence in all body fluids, reinforcing the notion of cancer as a systemic disease under the influence of vesicles.

TREATMENT-ELICITED TEVs PROMOTES TUMOR RE-GROWTH

Tumor recurrence is considered one of the major causes of treatment failure, being directly correlated with a poor prognosis. The cellular mechanisms behind this involve intrinsic and/or acquired resistance (Zhu et al., 2021). The latter one can be mediated by vesicular cargo transfer of multidrug resistance transporters (Bebawy et al., 2009; Corcoran et al., 2012), anti-apoptotic and pro-tumorigenic molecules (Khan et al., 2012; Vella et al., 2017) from resistant to sensitive tumor cells, for example. Mrowczynski et al. (2018) showed that EVs derived from nervous system cancer cells upon Ionizing Radiation (IR) therapy could induce cell death evasion and consequent treatment resistance. Interestingly, higher radiation doses were significantly correlated with more expressive decrease in tumor suppressive molecules (STAT4, TPM1, miR-516, and miR-365) and greater increase of oncogenic cargo (CCND1, ANXA2, NPM1, and miR-889). Also, vesicles derived from dying pancreatic cancer cells after radiotherapy were shown to be enriched with miR-194-5p and could potentiate the survival of recipient cells by up-regulating DNA damage responses. In addition, the inhibition of TEVs release by aspirin significantly suppressed tumor re-growth and increased the survival of tumor-bearing mice (Jiang et al., 2020).

Moreover, EVs released upon chemotherapy have also been reported to promote tumor resistance. Survivin was found to be enriched in EVs secreted by chemotherapy-treated breast cancer cells and was able to promote the survival of tumor cells and tumor associated fibroblasts exposed to paclitaxel (Kreger et al., 2016). Furthermore, targeted therapy treatment with vemurafenib in BRAF-mutated melanoma cells resulted in altered miRNA and protein profile within EVs, inducing increased resistance in recipient cells (Lunavat et al., 2017). In accordance with these findings, Marconi et al. (2021) demonstrated that TEVs secreted by ERBB2 + breast cancer cells in response to trastuzumab carry a different protein cargo that are known to be associated with cytokinesis, lipid metabolism and organelle organization, indicating that this process might be altered in the recipient cells.

Our group recently demonstrated that EVs release by melanoma cells treated with temozolomide are taken up not only by tumor cells, which showed an increase in pluripotent and DNA repair gene expression levels, but were also able to induce a M2-phenotype in macrophages, promoting tumor repopulation in nude mice (Andrade et al., 2019). Additionally, EVs released by breast cancer cells upon paclitaxel or doxorubicin treatment were reported to contain higher amounts of ANXA6 protein, which could induce the pre-metastatic niche formation, by promoting Ccl2 expression, monocyte expansion and NF- κ B-dependent endothelial cells activation in pulmonary tissues, favoring lung metastasis at *in vivo* models (Keklikoglou et al., 2019). In myelomas, TEVs released upon chemotherapy were able to induce ECM remodeling and promote chemoresistance and relapse (Bandari et al., 2018; Figure 1C).

Still under this context, another process which is often sped up and induced by cytotoxic therapy is the autophagic flux. In the last few years, some studies have shown cross-regulation between autophagy and exosome release. Initially, autophagy was known as a catabolic process of intracellular degradation of proteins and organelles destined to the recycling of material and the balance of energetic cellular metabolism maintaining cellular homeostasis. However, autophagy can also interfere within the TME communication through its secretory function called secretory autophagy (SA) in a similar way as observed for TEVs (Thorburn et al., 2009; Claude-Taupin et al., 2018; Rak, 2020). Based on studies showing the similarities between EVs and autophagy concerning their biogenesis and secretory function (Murrow et al., 2015; Galluzzi et al., 2017; Pathan et al., 2019), one might speculate that this interconnection can be used by tumor cells to establish a cooperative relationship among different cells in the TME, impacting both tumor progression and treatment response in some tumors as discussed below.

Few years ago, Dutta et al. (2014) observed that exosomes released by breast cancer cells were taken up by normal epithelial cells, which was accompanied by an increase in ROS levels and autophagy in recipient cells. Consequently, these cells secreted soluble growth factors that induced the proliferation of malignant cells. More recently, cooperation among different cells in TME was shown to be dependent on the synergism between these two secretory pathways. In response to oxidative stress, pancreatic ductal adenocarcinoma cells released exosomes enriched in KRAS^{G12D} during autophagy-dependent ferroptosis. These vesicles were engulfed by macrophages which, in turn, were polarized to M2 phenotype and promoted tumor growth in a mouse model (Dai E. et al., 2020).

About tumor response to therapy, it has been demonstrated that the use of chemotherapy and inhibitors of mTOR pathway led to an increased autophagic flux and, simultaneously, the exosome release (Hessvik et al., 2016; Xu J. et al., 2018; Ma et al., 2019). Exosomes harvested from irradiated brain cells carrying the miR-7 induced autophagy and transferred this signal to non-irradiated lung cells, mediating a bystander effect of autophagy in the lung after brain irradiation (Cai et al., 2017). In non-small cell lung carcinoma cells, exosomal miR-425-3p released in response to cisplatin decreased responsiveness to this drug via targeting the AKT1/mTOR signaling pathway and upregulation of autophagic

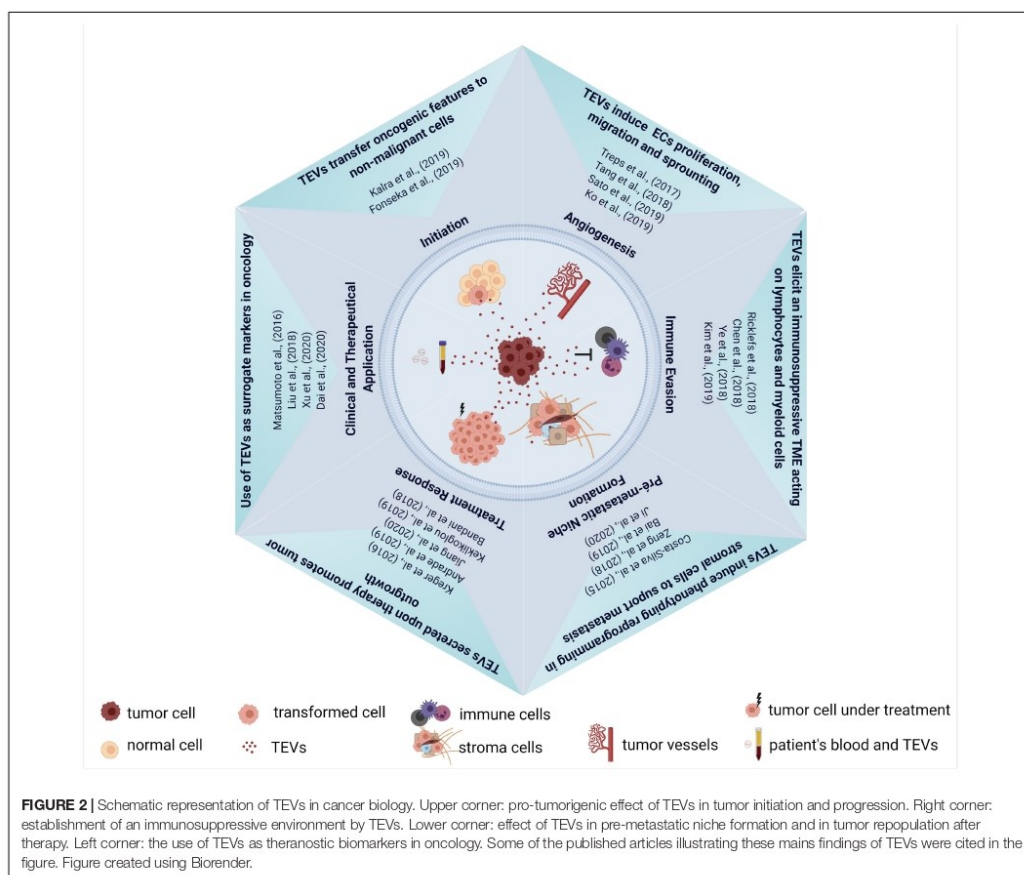
activity in recipient cells. On the other hand, enhanced miR-567 levels in HER2 + breast cancer cells were packaged into exosomes which were responsible for suppressing autophagy and reversing chemoresistance by targeting ATG5 in recipient cells (Han et al., 2020).

TEVs: FROM THE BENCH TO THE BEDSIDE

As already discussed, TEVs are multifaceted regulators of tumor progression and response to different therapeutic modalities. Although some aspects regarding their biogenesis and cargo sorting are still largely unknown, their diagnostic and therapeutic potential in oncology have been explored with enthusiasm for several groups. At some level, TEVs cargo reflects the molecular composition of malignant cells and, since these nanostructures can be found in all body fluids, they can serve

as circulating biomarkers in liquid biopsy (LeBleu and Kalluri, 2020). Moreover, many studies demonstrated that the level of EVs in plasma is significant higher in cancer patients than healthy individuals as reported for esophageal squamous cell carcinoma (Matsumoto et al., 2016) and glioblastoma (Osti et al., 2019), indicating that EVs plasma quantification can be a useful surrogate indicator for cancer screening. Besides that, it has been demonstrated that plasma exosomal level increases with tumor stage progression as observed in patients with non-small cell lung cancer (Liu et al., 2018) and can be used also as an indicator of disease progression (Figure 1D).

Another aspect of EVs biology that has been explored in translational studies relies on the presence of macromolecules carried by these nanostructures. A very recent study by Hoshino et al. (2020) identified tissue-specific and tumor derived proteins in TEVs from cancer plasma patients in comparison to health individuals, indicating the potential use of vesicular proteins in cancer diagnosis. Moreover, in colorectal patients (CRC), it



was found that elevated levels of serum exosomal circ-PNN, a circular RNA, can be used for CRC diagnosis according to the validation analysis conducted by the authors (Xie et al., 2020). Interestingly, even the lipidic profile of plasma exosomes shows to be a promising biomarker in cancer (Bestard Escalas et al., 2021). To date, there are 16 clinical studies registered in Clinicaltrials.gov that aim to evaluate EVs potential in cancer diagnosis for different tumors, demonstrating that although the biology behind these nanostructures is still largely unknown, their use in clinical practice has been already explored.

Another promising use of TEVs in clinical settings is the potential of EVs as vehicles for the delivery of therapeutic agents which has also generated considerable excitement in the field. In fact, several studies evaluating the use of exosomes for the delivery of miRNAs, mRNAs, proteins, peptides, and synthetic drugs have been performed in the last years (Xu R. et al., 2018; Dai J. et al., 2020). Drugs such as doxorubicin (Srivastava et al., 2016), paclitaxel (Kim et al., 2016) and siRNA against oncogenic KRASG12D (Kamerkar et al., 2017) were successfully loaded in EVs and demonstrated potential anticancer effects *in vitro* and *in vivo*.

On the other hand, one alternative to explore the use of TEVs in cancer therapy is to reduce the exosome production or inhibit their secretion by tumor cells (Qi et al., 2016). A plenty of exosome inhibitors have been discovered and tested *in vitro* and in pre-clinical models to evaluate their effectiveness against transformed cells especially as neoadjuvant compounds. Most of them were developed to target important molecules of the exosome biogenesis machinery such as Rab27A and sphingomyelinases (Zhang et al., 2020) showing exciting results.

OUTSTANDING QUESTIONS, GAPS, AND CONCLUSION

Although remarkable progress has been made in the EVs field, as summarized in **Figure 2**, there are some gaps in our understanding of molecular mechanisms that control vesicle packaging and also how the cargo loading can be modified in response to different stimuli such as cancer therapies. This aspect is crucial for the comprehension of how EVs can promote resistance and tumor recurrence after therapy and to design new therapeutic strategies to minimize and block these

pro-tumoral effects. Furthermore, EVs heterogeneity should be considered in pre-clinical and clinical studies and our understanding of functional differences among EVs classes is still limited. The answer for this question in particular will be necessary especially for the use of EVs as biomarkers in cancer diagnosis and prognosis.

Second, technical challenges are still debated in the EVs community and an effort for the standardization of methods for EV isolation, purification, quantification, and molecular characterization has been made to allow interlaboratory comparisons of pre-clinical and clinical data.

Third, even though interventions in TEVs like the ones involving drug loading and the use of EVs secretion inhibitors indicate therapeutic potential, new criteria become relevant to be investigated such as the timing of therapy, tumors to be treated and chemo-radio-immunotherapy combinations. It is also crucial to determine how the effect of different strategies to regulate exosomes in particular could influence the autophagy machinery or vice versa. Nevertheless, beyond these considerations, we believe that the study of the complex regulation between both pathways after chemo and radiotherapy, among other modalities, may open avenues for the design of novel therapies as well as improve the current ones, avoiding tumor recurrence. Then, in our opinion, the comprehension of the tumor-driven cooperation mediated by TEVs during tumor progression and upon therapy will pave the way to improve therapy outcomes in cancer patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RC and LA conceptualized the manuscript, reviewed, and edited the manuscript before submission. LA, NS, SB, DB, and RC provided intellectual input, analyzed the literature, and participated in the writing. NS prepared the figures. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This research was supported by grants from FAPESP (Grant Number 2020/09176-8 and 2019/07278-0) and CNPq (Grant Number 305700/2017-0). The funder did not play any role in design, interpretation, or writing of the review.

REFERENCES

- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., and Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1867:140203. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.02.005
- Andrade, L. N. S., Otake, A. H., Cardim, S. G. B., da Silva, F. I., Ikoma Sakamoto, M. M., Furuya, T. K., et al. (2019). Extracellular vesicles shedding promotes melanoma growth in response to chemotherapy. *Sci. Rep.* 9:14482. doi: 10.1038/s41598-019-50848-z
- Aslan, C., Maralbashi, S., Salari, F., Kahroba, H., Sigaroodi, F., Kazemi, T., et al. (2019). Tumor-derived exosomes: implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *J. Cell Physiol.* 234, 16885–16903. doi: 10.1002/jcp.28374
- Bai, M., Li, J., Yang, H., Zhang, H., Zhou, Z., Deng, T., et al. (2019). miR-135b delivered by gastric tumor exosomes inhibits foxo1 expression in endothelial cells and promotes angiogenesis. *Mol. Ther.* 27, 1772–1783. doi: 10.1016/j.yjth.2019.06.018
- Bandari, S. K., Purushothaman, A., Ramani, V. C., Brinkley, G. J., Chandrashekar, D. S., Varambally, S., et al. (2018). Chemotherapy induces secretion of exosomes loaded with heparanase that degrades extracellular matrix and impacts tumor and host cell behavior. *Matrix Biol.* 65, 104–118. doi: 10.1016/j.matbio.2017.09.001
- Bebawy, M., Combes, V., Lee, E., Jaiswal, R., Gong, J., Bonhoure, A., et al. (2009). Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* 23, 1643–1649. doi: 10.1038/leu.2009.76
- Bestard Escalas, J., Reigada, R., Reyes, J., de la Torre, P., Liebis, G., and Barceló-Coblijn, G. (2021). Fatty acid unsaturation degree of plasma exosomes in

- colorectal cancer patients: a promising biomarker. *Int. J. Mol. Sci.* 22:60. doi: 10.3390/ijms22105060
- Biagioni, A., Laurenzana, A., Menicacci, B., Peppicelli, S., Andreucci, E., Bianchini, F., et al. (2021). uPAR-expressing melanoma exosomes promote angiogenesis by VE-Cadherin, EGFR and uPAR overexpression and rise of ERK1,2 signaling in endothelial cells. *Cell Mol. Life Sci.* 78, 3057–3072. doi: 10.1007/s00018-020-03707-4
- Cai, S., Shi, G. S., Cheng, H. Y., Zeng, Y. N., Li, G., Zhang, M., et al. (2017). Exosomal miR-7 mediates bystander autophagy in lung after focal brain irradiation in mice. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 1287–1296. doi: 10.7150/ijbs.18890
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., et al. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560, 382–386. doi: 10.1038/s41586-018-0392-8
- Chen, X., Zhou, J., Li, X., Wang, X., and Lin, Y. (2018). Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer cells deliver microRNAs to macrophages and elicit a tumor-promoted phenotype. *Cancer Lett.* 435, 80–91. doi: 10.1016/j.canlet.2018.08.001
- Claude-Taupin, A., Bissa, B., Jia, J., Gu, Y., and Deretic, V. (2018). Role of autophagy in IL-1 β export and release from cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 83, 36–41. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.03.012
- Corcoran, C., Rani, S., O'Brien, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Sheikh, R., et al. (2012). Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 7:e50999. doi: 10.1371/journal.pone.0050999
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17, 816–826. doi: 10.1038/ncb3169
- Dai, E., Han, L., Liu, J., Xie, Y., Kroemer, G., Klionsky, D. J., et al. (2020). Autophagy-dependent ferroptosis drives tumor-associated macrophage polarization via release and uptake of oncogenic KRAS protein. *Autophagy* 16, 2069–2083. doi: 10.1080/15548627.2020.1714209
- Dai, J., Escara-Wilke, J., Keller, J. M., Jung, Y., Taichman, R. S., Pienta, K. J., et al. (2019). Primary prostate cancer educates bone stroma through exosomal pyruvate kinase M2 to promote bone metastasis. *J. Exp. Med.* 216, 2883–2899. doi: 10.1084/jem.20190158
- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., et al. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct. Target Ther.* 5:145. doi: 10.1038/s41392-020-00261-0
- Dorayappan, K. D. P., Wanner, R., Wallbillich, J. J., Saini, U., Zingarelli, R., Suarez, A. A., et al. (2018). Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins. *Oncogene* 37, 3806–3821. doi: 10.1038/s41388-018-0189-0
- Dutta, S., Warshall, C., Bandyopadhyay, C., Dutta, D., and Chandran, B. (2014). Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells. *PLoS One* 9:e97580. doi: 10.1371/journal.pone.0097580
- Fan, J., Xu, G., Chang, Z., Zhu, L., and Yao, J. (2020). miR-210 transferred by lung cancer cell-derived exosomes may act as proangiogenic factor in cancer-associated fibroblasts by modulating JAK2/STAT3 pathway. *Clin. Sci.* 134, 807–825. doi: 10.1042/CS20200039
- Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., Han, Q., et al. (2018). Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat. Commun.* 9:191. doi: 10.1038/s41467-017-02583-0
- Fitzgerald, W., Freeman, M. L., Lederman, M. M., Vaslieva, E., Romero, R., and Margolis, L. (2018). A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *Sci. Rep.* 8:8973. doi: 10.1038/s41598-018-27190-x
- Folkman, J. (1975). Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann. Intern. Med.* 82, 96–100. doi: 10.7326/0003-4819-82-1-96
- Fong, M. Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A. Y., Chandra, M., Ashby, J., et al. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 17, 183–194. doi: 10.1038/ncb3094
- Fonseka, P., Liem, M., Ozcitti, C., Adda, C. G., Ang, C. S., and Mathivanan, S. (2019). Exosomes from N-Myc amplified neuroblastoma cells induce migration and confer chemoresistance to non-N-Myc amplified cells: implications of intra-tumour heterogeneity. *J. Extracell. Vesicles.* 8:1597614. doi: 10.1080/20013078.2019.1597614
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36, 1811–1836. doi: 10.15252/embj.201796697
- Guo, X., Qiu, W., Liu, Q., Qian, M., Wang, S., Zhang, Z., et al. (2018). Immunosuppressive effects of hypoxia-induced glioma exosomes through myeloid-derived suppressor cells via the miR-10a/Rora and miR-21/Pten Pathways. *Oncogene* 37, 4239–4259. doi: 10.1038/s41388-018-0261-9
- Han, M., Hu, J., Lu, P., Cao, H., Yu, C., Li, X., et al. (2020). Exosome-transmitted miR-567 reverses trastuzumab resistance by inhibiting ATG5 in breast cancer. *Cell Death Dis.* 11:43. doi: 10.1038/s41419-020-2250-5
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- He, L., Zhu, W., Chen, Q., Yuan, Y., Wang, Y., Wang, J., et al. (2019). Ovarian cancer cell-secreted exosomal miR-205 promotes metastasis by inducing angiogenesis. *Theranostics* 9, 8206–8220. doi: 10.7150/thno.37455
- Hessvik, N. P., Øverbye, A., Brech, A., Torgersen, M. L., Jakobsen, I. S., Sandvig, K., et al. (2016). PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 4717–4737. doi: 10.1007/s00018-016-2309-8
- Horie, K., Kawakami, K., Fujita, Y., Sugaya, M., Kameyama, K., Mizutani, K., et al. (2017). Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 492, 356–361. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.107
- Hoshino, A., Kim, H. S., Bojmar, L., Gyan, K. E., Cioffi, M., Hernandez, J., et al. (2020). Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell* 182, 1044–1061. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009
- Hsieh, C. H., Tai, S. K., and Yang, M. H. (2018). Snail-overexpressing Cancer Cells Promote M2-Like Polarization of Tumor-Associated Macrophages by Delivering MiR-21-Abundant Exosomes. *Neoplasia* 20, 775–788. doi: 10.1016/j.neo.2018.06.004
- Huang, Z., and Feng, Y. (2017). Exosomes Derived From Hypoxic Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis Through Wnt4-Induced β -Catenin Signaling in Endothelial Cells. *Oncol. Res.* 651–661. doi: 10.3727/096504016X14752792816791
- Ji, Q., Zhou, L., Sui, H., Yang, L., Wu, X., Song, Q., et al. (2020). Primary tumors release ITGBL1-rich extracellular vesicles to promote distal metastatic tumor growth through fibroblast-niche formation. *Nat. Commun.* 11:1211. doi: 10.1038/s41467-020-14869-x
- Jiang, M. J., Chen, Y. Y., Dai, J. J., Gu, D. N., Mei, Z., Liu, F. R., et al. (2020). Dying tumor cell-derived exosomal miR-194-5p potentiates survival and repopulation of tumor repopulating cells upon radiotherapy in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 19:68. doi: 10.1186/s12943-020-01178-6
- Kalra, H., Gangoda, L., Fonseka, P., Chitti, S. V., Liem, M., Keerthikumar, S., et al. (2019). Extracellular vesicles containing oncogenic mutant β -catenin activate Wnt signalling pathway in the recipient cells. *J. Extracell. Vesicles* 8:1690217. doi: 10.1080/20013078.2019.1690217
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruyivo, C. F., Melo, S. A., et al. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 546, 498–503. doi: 10.1038/nature22341
- Keklikoglou, I., Gianciarus, C., Güç, E., Squadrito, M. L., Spring, L. M., Tazzyman, S., et al. (2019). Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat. Cell Biol.* 21, 190–202. doi: 10.1038/s41556-018-0256-3
- Khan, S., Jutzy, J. M., Valenzuela, M. M., Turay, D., Aspe, J. R., Ashok, A., et al. (2012). Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One* 7:e46737. doi: 10.1371/journal.pone.0046737
- Kilinc, S., Paisner, R., Camarda, R., Gupta, S., Momcilovic, O., Kohnz, R. A., et al. (2021). Oncogene-regulated release of extracellular vesicles. *Dev. Cell* 2021:14. doi: 10.1016/j.devcl.2021.05.014
- Kim, D. H., Kim, H., Choi, Y. J., Kim, S. Y., Lee, J. E., Sung, K. J., et al. (2019). Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–13. doi: 10.1038/s12276-019-0295-2
- Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., et al. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine* 12, 655–664. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.012
- Ko, S. Y., Lee, W., Kenny, H. A., Dang, L. H., Ellis, L. M., Jonasch, E., et al. (2019). Cancer-derived small extracellular vesicles promote angiogenesis by

- heparin-bound, bevacizumab-insensitive VEGF, independent of vesicle uptake. *Commun. Biol.* 2:386. doi: 10.1038/s42003-019-0609-x
- Kreger, B. T., Johansen, E. R., Cerione, R. A., and Antonyak, M. A. (2016). The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers* 2016:8120111. doi: 10.3390/cancers8120111
- Lázaro-Ibáñez, E., Lässer, C., Shelke, G. V., Crescitelli, R., Jang, S. C., Cvjetkovic, A., et al. (2019). DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *J. Extracell. Vesicles* 8:1656993. doi: 10.1080/20013078.2019.1656993
- LeBleu, V. S., and Kalluri, R. (2020). Exosomes as a Multicomponent Biomarker Platform in Cancer. *Trends Cancer* 6, 767–774. doi: 10.1016/j.trecan.2020.03.007
- Liang, Z. X., Liu, H. S., Wang, F. W., Xiong, L., Zhou, C., Hu, T., et al. (2019). LncRNA RPPH1 promotes colorectal cancer metastasis by interacting with TUBB3 and by promoting exosomes-mediated macrophage M2 polarization. *Cell Death Dis.* 10:829. doi: 10.1038/s41419-019-2077-0
- Liu, Q., Xiang, Y., Yuan, S., Xie, W., Li, C., Hu, Z., et al. (2018). Plasma exosome levels in non-small-cell lung cancer: Correlation with clinicopathological features and prognostic implications. *Cancer Biomark.* 22, 267–274. doi: 10.3233/CBM-170955
- Lunavat, T. R., Cheng, L., Einarsdottir, B. O., Olofsson Bagge, R., Veppil Muralidharan, S., Sharples, R. A., et al. (2017). BRAF(V600) inhibition alters the microRNA cargo in the vesicular secretome of malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114, E5930–E5939. doi: 10.1073/pnas.1705206114
- Ma, Y., Yuwen, D., Chen, J., Zheng, B., Gao, J., Fan, M., et al. (2019). Exosomal Transfer Of Cisplatin-Induced miR-425-3p Confers Cisplatin Resistance In NSCLC Through Activating Autophagy. *Int. J. Nanomedicine* 14, 8121–8132. doi: 10.2147/IJN.S221383
- Marconi, S., Santamaria, S., Bartolucci, M., Stigliani, S., Aiello, C., Gagliani, M. C., et al. (2021). Trastuzumab Modulates the Protein Cargo of Extracellular Vesicles Released by ERBB2. *Membranes* 2021:11030199. doi: 10.3390/membranes11030199
- Matsumoto, Y., Kano, M., Akutsu, Y., Hanari, N., Hoshino, I., Murakami, K., et al. (2016). Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 36, 2535–2543. doi: 10.3892/or.2016.5066
- Mrowczynski, O. D., Madhankumar, A. B., Sundstrom, J. M., Zhao, Y., Kawasawa, Y. I., Slagle-Webb, B., et al. (2018). Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer. *Oncotarget* 9, 36083–36101. doi: 10.18632/oncotarget.26300
- Murrow, L., Malhotra, R., and Debnath, J. (2015). ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nat. Cell Biol.* 17, 300–310. doi: 10.1038/ncb3112
- O'Brien, K., Breyné, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., and Brakefield, X. O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 585–606. doi: 10.1038/s41580-020-0251-y
- Osti, D., Del Bene, M., Rappa, G., Santos, M., Matafora, V., Richichi, C., et al. (2019). Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res.* 25, 266–276. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1941
- Park, J. E., Dutta, B., Tse, S. W., Gupta, N., Tan, C. F., Low, J. K., et al. (2019). Hypoxia-induced tumor exosomes promote M2-like macrophage polarization of infiltrating myeloid cells and microRNA-mediated metabolic shift. *Oncogene* 38, 5158–5173. doi: 10.1038/s41388-019-0782-x
- Pathan, M., Fonseca, P., Chitti, S. V., Kang, T., Sanwani, R., Van Deun, J., et al. (2019). Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* 47, D516–D519. doi: 10.1093/nar/gky1029
- Pelham, C. J., Nagane, M., and Madan, E. (2020). Cell competition in tumor evolution and heterogeneity: Merging past and present. *Semin. Cancer Biol.* 63, 11–18. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.008
- Qi, H., Liu, C., Long, L., Ren, Y., Zhang, S., Chang, X., et al. (2016). Blood Exosomes Endowed with Magnetic and Targeting Properties for Cancer Therapy. *ACS Nano* 10, 3323–3333. doi: 10.1021/acsnano.5b06939
- Qian, M., Wang, S., Guo, X., Wang, J., Zhang, Z., Qiu, W., et al. (2020). Hypoxic glioma-derived exosomes deliver microRNA-1246 to induce M2 macrophage polarization by targeting TERF2IP via the STAT3 and NF- κ B pathways. *Oncogene* 39, 428–442. doi: 10.1038/s41388-019-0996-y
- Quail, D. F., and Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437. doi: 10.1038/nm.3394
- Rak, J. (2020). LICensing of exosomes for RNA export. *Nat. Cell Biol.* 22, 137–139. doi: 10.1038/s41556-020-0466-3
- Ramteke, A., Ting, H., Agarwal, C., Mateen, S., Somasagara, R., Hussain, A., et al. (2015). Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol. Carcinog.* 54, 554–565. doi: 10.1002/mc.22124
- Raposo, G., and Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 509–510. doi: 10.1038/s41580-019-0158-7
- Ricklefs, F. L., Alayo, Q., Krenzin, H., Mahmoud, A. B., Speranza, M. C., Nakashima, H., et al. (2018). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci. Adv.* 4:eaar2766. doi: 10.1126/sciadv.aar2766
- Sato, S., Vasaikar, S., Eskaras, A., Kim, Y., Lewis, J. S., Zhang, B., et al. (2019). EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling. *JCI Insight* 4:132447. doi: 10.1172/jci.insight.132447
- Schubert, A., and Boutros, M. (2021). Extracellular vesicles and oncogenic signaling. *Mol. Oncol.* 15, 3–26. doi: 10.1002/1878-0261.12855
- Shang, D., Xie, C., Hu, J., Tan, J., Yuan, Y., Liu, Z., et al. (2020). Pancreatic cancer cell-derived exosomal microRNA-27a promotes angiogenesis of human microvascular endothelial cells in pancreatic cancer via BTG2. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 588–604. doi: 10.1111/jcmm.14766
- Sharma, P., Diergaarde, B., Ferrone, S., Kirkwood, J. M., and Whiteside, T. L. (2020). Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci. Rep.* 10:92. doi: 10.1038/s41598-019-56542-4
- Srivastava, A., Amreddy, N., Babu, A., Panneerselvam, J., Mehta, M., Muralidharan, R., et al. (2016). Nanosomes carrying doxorubicin exhibit potent anticancer activity against human lung cancer cells. *Sci. Rep.* 6:38541. doi: 10.1038/srep38541
- Tang, M. K. S., Yue, P. Y. K., Ip, P. P., Huang, R. L., Lai, H. C., Cheung, A. N. Y., et al. (2018). Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface. *Nat. Commun.* 9:2270. doi: 10.1038/s41467-018-04695-7
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A. E., and Thorburn, A. L. (2009). Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.* 16, 175–183. doi: 10.1038/cdd.2008.143
- Tkach, M., and Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226–1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043
- Treps, L., Perret, R., Edmond, S., Ricard, D., and Gavard, J. (2017). Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 6:1359479. doi: 10.1080/20013078.2017.1359479
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125
- Vella, L. J., Behren, A., Coleman, B., Greening, D. W., Hill, A. F., and Cebon, J. (2017). Intercellular Resistance to BRAF Inhibition Can Be Mediated by Extracellular Vesicle-Associated PDGFR β . *Neoplasia* 19, 932–940. doi: 10.1016/j.neo.2017.07.002
- Wang, X., Luo, G., Zhang, K., Cao, J., Huang, C., Jiang, T., et al. (2018). Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3Ky to Promote Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 78, 4586–4598. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3841
- Wang, Z. F., Liao, F., Wu, H., and Dai, J. (2019). Glioma stem cells-derived exosomal miR-26a promotes angiogenesis of microvessel endothelial cells in glioma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38:201. doi: 10.1186/s13046-019-1181-4
- Xie, Y., Li, J., Li, P., Li, N., Zhang, Y., Binang, H., et al. (2020). RNA-Seq Profiling of Serum Exosomal Circular RNAs Reveals Circ-PNN as a Potential Biomarker for Human Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* 10:982. doi: 10.3389/fonc.2020.00982
- Xu, J., Camfield, R., and Gorski, S. M. (2018). The interplay between exosomes and autophagy partners in crime. *J. Cell Sci.* 131:215210. doi: 10.1242/jcs.215210
- Xu, R., Rai, A., Chen, M., Suwakulsiri, W., Greening, D. W., and Simpson, R. J. (2018). Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements

- in cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 617–638. doi: 10.1038/s41571-018-0036-9
- Xu, Z., Zheng, X., and Zheng, J. (2019). Tumor-derived exosomes educate fibroblasts to promote salivary adenoid cystic carcinoma metastasis via NGF-NTRK1 pathway. *Oncol. Lett.* 18, 4082–4091. doi: 10.3892/ol.2019.10740
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles.* 4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066
- Yang, H., Zhang, H., Ge, S., Ning, T., Bai, M., Li, J., et al. (2018). Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. *Mol. Ther.* 26, 2466–2475. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.07.023
- Ye, L., Zhang, Q., Cheng, Y., Chen, X., Wang, G., Shi, M., et al. (2018). Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1. *J. Immunother. Cancer.* 6:145. doi: 10.1186/s40425-018-0451-6
- Zeng, Z., Li, Y., Pan, Y., Lan, X., Song, F., Sun, J., et al. (2018). Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat. Commun.* 9:5395. doi: 10.1038/s41467-018-07810-w
- Zhang, H., Lu, J., Liu, J., Zhang, G., and Lu, A. (2020). Advances in the discovery of exosome inhibitors in cancer. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 35, 1322–1330. doi: 10.1080/14756366.2020.1754814
- Zhao, S., Mi, Y., Guan, B., Zheng, B., Wei, P., Gu, Y., et al. (2020). Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *J. Hematol. Oncol.* 13:156. doi: 10.1186/s13045-020-00991-2
- Zhou, X., Yan, T., Huang, C., Xu, Z., Wang, L., Jiang, E., et al. (2018). Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37:242. doi: 10.1186/s13046-018-0911-3
- Zhu, X., Li, S., Xu, B., and Luo, H. (2021). Cancer evolution: A means by which tumors evade treatment. *Biomed. Pharmacother.* 133:111016. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111016

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Santos, Bustos, Bhatt, Chammas and Andrade. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.