



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação de proteínas do processamento de microRNA de vesículas
extracelulares provenientes de linhagens celulares tumorais**

2017

NATALIA GURGEL DO CARMO

**Avaliação de proteínas do processamento de microRNA de vesículas
extracelulares provenientes de linhagens celulares tumorais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília

2017

Faça todo o bem que puder,
Por todos os meios que puder,
De todas as maneiras que você puder,
Em todos os lugares que você puder,
Em todas as vezes que você puder,
Para todas as pessoas que você puder,
Enquanto você pode.

(John Wesley)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Dr. Rinaldo Wellerson Pereira por acreditar em mim e me oferecer a oportunidade de concluir o doutorado com este novo trabalho. A Professora Dra. Rosângela Vieira de Andrade pelos anos me acompanhando na pós-graduação e me ajudar ao longo deste doutorado. A Marcela por ter me auxiliado com a parte de análise das proteínas e finalização do trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e do Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília!

Agradeço aos professores que me instruíram, ao CNPq pelo auxílio financeiro e as universidades pela estrutura física para que o trabalho fosse realizado.

Agradeço a todos que fizeram parte dessa jornada no Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília. Obrigada aos técnicos (Adevilton, Davi e em especial ao Lucas), aos colegas e aos amigos que fiz e que me ajudaram de alguma forma! Obrigada Leidy, Wellington, Getúlio, Iara e Lana!

Agradeço a todos que me apoiaram nesta jornada, meus familiares e amigos. Em especial, quero dedicar este trabalho aos que me apoiaram incondicionalmente desde o início, e ao meu querido Emerson Morais Gonçalves pelo seu apoio e compreensão incondicional. Agradeço imensamente as pessoas que contribuíram no desenvolvimento e conclusão do meu Doutorado nestes longos 5 anos e meio!

RESUMO

Exossomos e microvesículas fazem parte das vesículas extracelulares. Estas são produzidas e liberadas por uma variedade de tipos celulares, inclusive em sobrenadante do meio celular, e estão presentes em diferentes fluidos biológicos. Elas podem carregar mRNA e miRNA, dentre outras moléculas. No câncer, os miRNA associados às vesículas extracelulares estão relacionados com a comunicação entre as células tumorais e o microambiente tumoral. Este estudo avaliou a presença das proteínas relacionadas com a maquinaria de processamento de miRNA, nas vesículas extracelulares secretadas pelas linhagens celulares MDA-MB231 (câncer de mama humano) e fibroblasto humano no tempo de crescimento celular de 72 horas. Para purificar estas partículas foi utilizado o método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação. Após isto, caracterizou-se as vesículas pelo seu tamanho e distribuição de partículas utilizando a resistência de pulso, pelo sistema qNANO. Para a detecção de proteínas, a técnica de western blot foi realizada a fim de se identificar a presença das proteínas de interesse. Como resultado, as vesículas extracelulares provenientes dos sobrenadantes das linhagens celulares foram purificadas e caracterizadas pelo seu tamanho adequadamente. Observou-se também que a quantidade de partículas de vesículas extracelulares da linhagem tumoral obtida pelo sistema qNANO, foi superior quando comparada à amostra não-tumoral. Os resultados da detecção de proteínas por western blot demonstram que as proteínas Dicer, Ago2 e TRBP2 estão presentes na amostra proveniente da linhagem tumoral MDA-MB231. Confirmou-se a presença de proteínas TSG101, Alix, CD63 - marcadoras moleculares de vesículas extracelulares. Confirmou-se também ausência nas amostras, da proteína Calnexina, a qual é controle negativo e é indicativo de contaminação nas vesículas extracelulares. Por fim, foram identificadas em ambas as amostras as proteínas ApoA-IV, AQP2 e IL-6, as quais estão associadas ao microambiente tumoral na sinalização do miRNA. Conclui-se que as proteínas Dicer, Ago2 e TRBP2, pertencentes a maquinaria de processamento de miRNA, bem como proteínas ainda não discutidas pela literatura em vesículas extracelulares na linhagem tumoral estudada, estão presentes no sobrenadante da linhagem tumoral MDA-MB231, sugerindo um papel para essas moléculas na biologia tumoral.

Palavras-chaves: células tumorais, vesículas extracelulares, maquinaria de processamento de miRNA, proteínas.

ABSTRACT

Exosomes and microvesicles are part of the extracellular vesicles. There are produced and released by a variety of cell types, including cell media supernatant, and be present in different biological fluids. They can carry mRNA and miRNA, among other molecules. In cancer, miRNAs associated with extracellular vesicles are related to the communication between tumor cells and the tumor microenvironment. This study evaluated the presence of proteins related to the miRNA processing machinery in the extracellular vesicles secreted by cell lines MDA-MB231 (human breast cancer) and human fibroblast at cell growth time of 72 hours. Purification of the culture medium supernatant was carried out by the differential ultracentrifugation method. After this, the vesicles were characterized by their size and particle distribution using the pulse resistance by qNANO system. For the detection of proteins, the western blot technique was performed to identify the presence of the proteins of interest. As a result, extracellular vesicles from cell line supernatants were purified and characterized by their size appropriately. It was also observed that the number of extracellular vesicles particles of the tumor lineage obtained by qNANO system was superior when compared to the non-tumor sample. The results of western blot detection of proteins demonstrate that Dicer, Ago2 and TRBP2 proteins, related to miRNA processing machinery, are present in the sample from the MDA-MB231 tumor line. We confirmed the presence of TSG101, Alix, CD9 – which are extracellular vesicle molecular marker proteins. Also, we confirmed in both samples the absence of Calnexin, which is a negative control, it is indicative of contamination in the extracellular vesicles. Lastly, we identified in both samples ApoA-IV, AQP2 and IL-6 proteins which are associated with tumor microenvironment in miRNA signaling. In conclusion, Dicer, Ago2 and TRBP2 proteins belonging to miRNA processing machinery, as well as proteins not yet discussed in the literature in extracellular vesicles from tumor cell, were present in the supernatant of the MDA-MB231 tumor cell, suggesting a role for these molecules in tumor biology.

Keywords: tumor cell, extracellular vesicles, machinery processing miRNA, proteins.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. CLASSIFICAÇÃO E BIOGÊNESE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	12
1.1.1. EXOSSOMOS.....	16
1.1.2. MICROVESÍCULAS.....	17
1.2. FUNÇÕES DE EV NOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS E PATOGÊNICOS	18
1.3. miRNA.....	21
1.3.1 BIOGÊNESE DE miRNA.....	22
1.3.2. MAQUINARIA DE PROCESSAMENTO DE miRNA EM EV	23
1.3.3. miRNA PROVENIENTES DE EV DESCRITOS EM TUMORES	25
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVO.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MÉTODOS.....	29
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.2. CULTURA CELULAR	30
4.2.1. LINHAGENS CELULARES.....	30
4.2.2. CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR	31
4.3. PURIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	31
4.4. CONTAGEM E CONCENTRAÇÃO DE EV UTILIZANDO RESISTÊNCIA DE PULSO.....	32

4.5.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	33
4.6.	ELETROFORESE SDS-PAGE UNIDIMENSIONAL	34
4.7.	WESTERN BLOT	34
4.8.	ESPECTROMETRIA DE MASSA	37
5.	RESULTADOS	39
5.7.	SDS-PAGE UNIDIRECIONAL COM COLORAÇÃO COOMASSIE® BLUE SILVER.....	60
5.8.	ESPECTROMETRIA DE MASSA	61
6.	DISCUSSÃO.....	62
7.	CONCLUSÕES.....	72
8.	REFERÊNCIAS	73
9.	APÊNDICE	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características dos tipos de vesículas extracelulares.....	12
Tabela 2. Comparação dos níveis de agressividade entre as linhagens celulares tumorais MDA-MB231 e fibroblasto humano	30
Tabela 3. Tabela com as especificações de nanoporos que podem ser utilizados no qNANO, conforme indicação do fabricante.	33
Tabela 4. Relação dos anticorpos primários, referência, seus respectivos pesos moleculares em quilodaltons, diluição feita e seus respectivos anticorpos secundários com a diluição feita.	36
Tabela 5. Descrição das linhagens celulares, meios de cultura utilizados e crescimento celular.	41
Tabela 6. Valores obtidos das EV do sobrenadante de linhagens celulares em seus respectivos tempos de coleta, quanto ao tamanho da sua partícula (em média), quantidade e concentração de partículas por volume (em média), utilizando resistência de pulso. .	42
Tabela 7. Quantificações das proteínas totais provenientes de 400ul e 500ul de EV purificadas de sobrenadante de linhagens celulares por ultracentrifugação diferencial.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição de uma vesícula extracelular.	15
Figura 2. Biogênese das vesículas extracelulares.	16
Figura 3. Esquema da biogênese do miRNA.	23
Figura 4. Delineamento experimental realizado para o projeto de Doutorado.	29
Figura 5. Imagens das linhagens celulares observadas por microscópio óptico durante seu crescimento celular até a coleta do sobrenadante.	40
Figura 6. Gráfico geral de todas as EV provenientes das amostras analisadas em duplicata, por resistência de pulso.	43
Figura 7. Gráfico das EV proveniente da linhagem celular Fibroblasto humano por resistência de pulso.	44
Figura 8. Gráfico das EV provenientes da linhagem tumoral MDAMB 231 no tempo 72 horas analisadas em triplicata por resistência de pulso.	45
Figura 9. SDS-PAGE unidimensional com poliacrilamida à 8% de proteína total de diversos pellets de células.	47
Figura 10. SDS-PAGE unidimensional com poliacrilamida à 8% das amostras Fibroblasto humano e MDA-MB231.	49
Figura 11. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Dicer (216KDa) nas amostras de interesse.	51
Figura 12. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Drosha (160KDa) nas amostras de interesse.	52
Figura 13. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Dicer (216KDa) e Drosha (160KDa) nas amostras de interesse.	52
Figura 14. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Ago2 (eIF2C2 – 94KDa) nas amostras de interesse.	53
Figura 15. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo TRBP2 (45KDa) nas amostras de interesse.	54
Figura 16. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo TSG101 (45KDa) nas amostras de interesse.	55
Figura 17. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Alix (95KDa) nas amostras de interesse.	56

Figura 18. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo CD63 (60KDa) nas amostras de interesse.	57
Figura 19. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo CD9 (24KDa) e CD81(22-26KDa) nas amostras de interesse.	57
Figura 20. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Calnexina (90/80/75 KDa) nas amostras de interesse.	58
Figura 21. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo apoA-IV (46 KDa) nas amostras de interesse.	59
Figura 22. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo AQP2 (29 KDa) nas amostras de interesse.....	59
Figura 23. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo IL-6 (21 KDa) nas amostras de interesse.....	60
Figura 24. Espectros gerados pela espectrometria de massa de uma amostra analisada, o qual se observa baixa intensidade de sinal que não permite realizar o MS/MS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

AGO2 – Proteína argonauta 2
ATP – Adenosina trifosfato
BSA- Bovine serum albumin
DGCR8 - DiGeorge syndrome Critical Region gene 8
DMEM –Dulbecco Modifical Eagle’s Medium
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EGF - Receptor de fator de crescimento epidérmico
ESCRT - Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV - Vesículas extracelulares
GTP – Guanosina trifosfato
ISEV – Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares
lncRNA – RNA longos não codificadores
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
miRNA, miR - micro RNA
mRNA - RNA mensageiro
MS – Espectrometria de Massa
MSC - células-tronco mesenquimais
mtDNA – DNA mitocondrial
MV – Microvesícula
MVB – Corpos multivesiculares
PIC - Coquetel inibidor de protease
pre-miRNA – precursor de microRNA
pri-miRNA – microRNA primário
PVDF - Fluoreto de Polivinilideno
qPCR – Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase
Rab GTPase - Proteína relacionada ao Ras, da família GTPase
Ran – Proteína nuclear relacionada ao Ras
RPTEC - células epiteliais tubulares renais
RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA.
RLC – Complexo de carregamento do RISC
RNA - Ácido ribonucleico
rRNA - RNA ribossômico
SFB – Soro fetal bovino
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

1. INTRODUÇÃO

1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares são principalmente classificadas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Elas são partículas que se diferem quanto a origem e quanto as características (que variam desde o tamanho, densidade, morfologia, composição proteica e lipídica, entre outros) (COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C., 2014; VAN DER POL et al., 2012). De modo geral, as vesículas extracelulares são estruturas esféricas delimitadas por bicamada lipídica, análoga a membrana celular. Em seu interior identificou-se vários tipos de moléculas bioativas, bem como proteínas e lipídios, além de material ribonucléico, como DNA, mRNA, miRNA e metabólitos que reproduzem a condição e o tipo celular de origem (KIM DK, LEE J, SIMPSON RJ et al., 2015; YOON YJ, KIM OY e GHO YS, 2014).

Os exossomos e microvesículas se diferenciam principalmente quanto a biogênese, que será descrita no próximo tópico (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Ambas são constituídas por bicamada lipídica, que as modelam na forma esférica e apresentam conteúdo rico em meio aquoso, com tamanho variando entre 30-1000nm. Já os corpos apoptóticos são maiores que 1µm e menos estruturados, e não serão abordados aqui (NAITO et al., 2016). (**Tabela 1**) (KASTELOWITZ N, YIN H, 2014; MANTEL PY, MARTI M, 2014; a. CVJETKOVIC A et al., 2016).

Tabela 1. Principais características dos tipos de vesículas extracelulares. Os exossomos e as microvesículas apresentam sobreposição de diâmetro. Observa-se que a biogênese os diferencia. Os marcadores encontrados também são distintos entre as vesículas extracelulares. As funções apresentadas são bem similares e relacionadas a processos inflamatórios. (Ling ZL et al., 2011)

	Exossomos	Microvesículas	Corpos apoptóticos
Tamanho (nm)	30-150	100-1000	1000-4000
Biogênese	Exocitose de MVB/Compartimentos internos	Ectocitose – superfície celular	Brotamento e fragmentação
Marcadores	CD63, CD81, CD9, LAMP1	Fator tecidual, marcador de superfície celular da célula de origem	DNA genômico, histonas
Funções	Pro- e anti-inflamatório, apresentador de antígeno	Pro- e anti-inflamatório, apresentador de antígeno, coagulação	Pro- e anti-inflamatório, apresentador de antígeno

Para compreender tanto os exossomos quanto as microvesículas, visto que as características biológicas podem se sobrepor, aqui restringimos ambas as partículas pela sigla EV (do inglês, **Extracellular Vesicles**). Esta é uma recomendação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV).

Quanto aos tipos celulares, sabe-se que estes podem, por sua vez, liberar diferentes tipos de vesículas para o ambiente extracelular, ao mesmo tempo, constitutivamente ou de forma regulada (CHOI DS et al., 2015; GYÖRGY B et al., 2011; KIM DK, LEE J, SIMPSON RJ et al., 2015). Sendo assim, é possível isolá-las de fluidos extracelulares, por exemplo, a partir do meio de cultura celular (LÖTVALL J, HILL AF, HOCHBERG F et al., 2014).

Desde de 1980, estudos tem demonstrado um aumento significativo de EV em fluídos biológicos de pacientes oncológicos, bem como em diversas culturas celulares tumorais (POSTE e NICOLSON, 1980). Nota-se um interesse crescente pelo papel das EV na progressão tumoral. A maioria dos tipos celulares, incluindo células tumorais e células do sistema imunológico, secretam EV que influenciam o fenótipo das células nas quais elas agem e interagem (COPPIETERS et al., 2009; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; NAITO et al., 2016). Diferentes linhagens celulares foram avaliadas em relação as EV, por exemplo, as células dendríticas (COPPIETERS et al., 2009) e as células tumorais, como as leucêmicas (PAGGETTI et al., 2015; RAIMONDO et al., 2015), mamárias (MELO et al., 2014; AL-MAYAH et al., 2015) e de pele (PEINADO H et al., 2012).

As vesículas extracelulares são encontradas em outros fluídos biológicos também, por exemplo, na saliva (MACHIDA et al., 2016), no leite materno (FOSTER et al., 2016), no sangue periférico (HUNTER MP et al., 2008), na urina (FOSTER et al., 2016), fluidos cefalorraquidianos, biliar, lacrimal (HANNAFON e DING, 2013). Além disso, as EV desempenham papéis em vários aspectos da biologia, por exemplo: no tráfego e comunicação intercelular, possui função no sistema imune, na microbiologia, neurobiologia e no desenvolvimento celular; contribuem para os processos-doença, como câncer, infecções virais, cardiovasculares, entre outras (SILVA T, 2015), que serão discutidos depois.

Em 2006, Ratajczak e colaboradores identificaram a presença de RNA (ácido ribonucléico) em EV. Dentre os tipos de RNA, já foram identificados RNA mensageiros (mRNA), RNA longos não-codificadores (lncRNA), RNA ribossômicos (rRNA), microRNA (miRNA) sendo transportados por EV. Os miRNA tem função de regulação na etapa pós-transcricional na expressão gênica. Em células tumorais, os miRNA são

protagonistas no avanço do crescimento tumoral (LI Y, ZHANG Y, QIU F, 2011). Segundo György B et al., 2011, as EV das células tumorais são potenciais biomarcadores do câncer por fornecerem informações sobre a origem e o desenvolvimento do tumor. Yoon Yj, Kim Oy e Gho Ys (2014) adicionam a informação de que miRNA podem ativar moléculas de sinalização e receptores de célula-alvo.

A presença desses variados RNA reforça o papel delas servirem como meio de transporte de informação. Também já foram identificados dentro das EV, moléculas de DNA (ácido desoxirribonucléico) oncogênico, DNA mitocondrial (mtDNA), DNA fita simples e dupla fita, além de lipídeos (fosfatidilserina, esfingomiéline e colesterol) e proteínas (CRESCITELLI et al., 2013; HEEDOO L, DUO Z, JASLEEN M, YANG J, 2016). Em relação as proteínas, as EV foram caracterizadas por análise proteômica utilizando a espectrometria de massa (COCUCCI e MELDOLESI, 2015).

A análise proteômica é a metodologia mais comum para caracterizar as proteínas advindas das EV. Segundo Choi DS et al., 2015 as proteínas identificadas mais encontradas foram: anexinas, flotilinas, proteínas Rab, TSG101 – que são proteínas de transporte de membrana; proteínas apresentadoras de antígeno; tetraspaninas, integrinas – que são proteínas adesivas; proteínas da membrana (LAMP, do inglês lysosome-associated membrane protein); TrF (do inglês, transferrin receptor); histonas, proteínas do choque térmico (HSP) e ribossomais – que são proteínas citosólicas; actina, tubulina e outras que são do citoesqueleto. Na linhagem celular tumoral de mama MDA-MB231, um trabalho de 2014 identificou as proteínas actina, anexinas (A1, A2 e A5), isozimas piruvato kinase (M1/M2), tubulina (β e α), proteína HSP 90 α , histona H4 e integrina α -2 (KRUGER S et al., 2014). Abaixo, na **Figura 1**, está a representação esquemática dos componentes proteicos identificados por diversos autores.

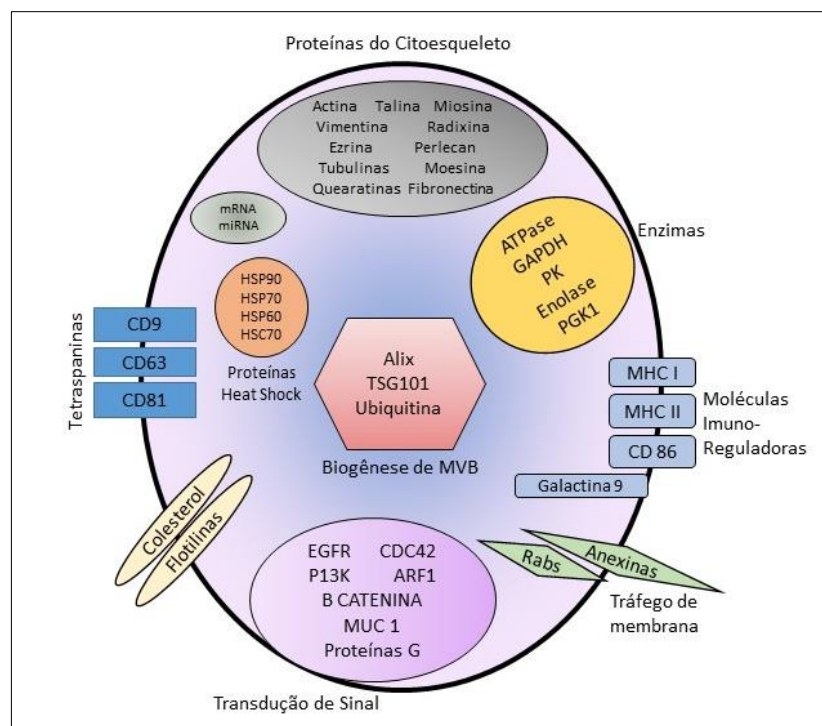


Figura 1. Composição de uma vesícula extracelular. Nesta micropartícula é identificado componentes proteicos associados ao citoesqueleto, por exemplo, actina e miosina; componentes da biogênese de MVB, como Alix e TSG101; bem como proteínas de superfície celular, as chamadas tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81). Adaptado de MECKES DG Jr, RAAB-TRAUB N., 2011 e LÄSSER C, ELDH M, LÖTVALL J, 2012.

Devido ao assunto ser relativamente novo e por haver crescente depósito de informações científicas, dois bancos de dados se destacam, os quais agrupam informações a respeito da composição das vesículas extracelulares, são eles, o “EVpedia” (<http://evpedia.com>) e o “Vesiclopedia” (<http://microvesicles.org>). Nas últimas atualizações do portal Vesiclopedia, os dados de entrada informam que são 35,264 proteínas, 18,718 mRNA, 1,772 miRNA e 342 lipídeos de 341 estudos independentes e publicados associados às EV (VESICLOPEDIA, 2016).

Portanto, análises proteômicas, transcriptomas e genômicas contribuem para compreender a biogênese e o papel funcional das EV em busca de novas terapias, estratégias de diagnósticos e marcadores moleculares nas principais patologias, especialmente no câncer (MELO et al., 2014; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; a. CVJETKOVIC A et al., 2016).

1.1.1. EXOSSOMOS

Os exossomos foram inicialmente identificados e relatados em um estudo sobre o tráfego de receptores de transferrina em reticulócitos (PAN BT et al., 1983). Neste estudo, os autores foram capazes de identificar, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), que nos reticulócitos maduros existiam pequenas vesículas de tamanho 30-100 nm dentro do seu citoplasma. Estudos posteriores corroboraram que estes corpos multivesiculares (MVB - do inglês, MultiVesicular Bodies) podem fundir com a membrana plasmática e liberar o seu conteúdo interno (os chamados exossomos) nos compartimentos extracelulares (HARDING et al., 1983).

Na **Figura 2**, observa-se que os exossomos são produzidos dentro da célula pela via endocítica, durante a maturação dos MVB. Os exossomos brotam a partir da face interna desses corpos que se limita com a membrana externa, formando pequenas vesículas intraluminais com a fase citosólica da membrana dentro da própria vesícula por fusão direta via um mecanismo cálcio-dependente. A liberação dos exossomos para o espaço extracelular decorre da exocitose, mediada pela fusão dos MVB com o limite da membrana celular (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013; KASTELOWITZ N, YIN H, 2014; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

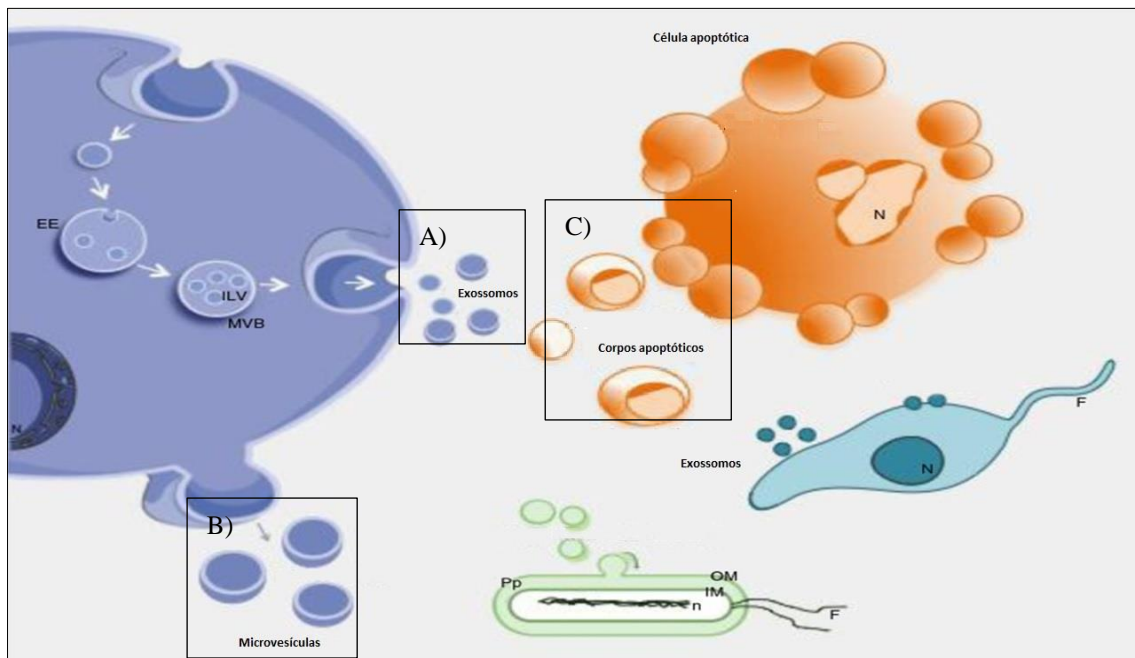


Figura 2. Biogênese das vesículas extracelulares. As EV podem ser divididas em: A) exossomos – que são formados a partir de da via endocítica e liberados após fusão dos corpos multivesiculares (MVB) com a membrana plasmática; B) microvesículas – que são formadas por brotamento e fissão da membrana plasmática; e C) corpos apoptóticos – que são formados de vesículas de células com sinal de apoptose. Como observado na figura, outros organismos, como bactérias e parasitas, também podem secretar EV. Adaptado de YÁÑEZ-MÓ et al., 2015. Legenda: EE -

endossomo inicial, ILV – vesícula intraluminal, MVB - corpos multivesiculares. N- núcleo, F – Flagelo, Pp – periplasma, OM – membrana externa, IM – membrana interna, n- nucleóide.

A via de sinalização relacionada com a biogênese dos MVB é a via ESCRT (do inglês, Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Esta via consiste em três complexos (ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) responsáveis pela regulação do brotamento da membrana na superfície celular e atua na formação do endossomo tardio. Este complexo endocítico está relacionado com o transporte de conteúdo proteico, pois o mesmo se separa da membrana do MVB levando o material interno consigo. Portanto, em diversos estudos, estes complexos são considerados um tipo de marcador de exossomos (HENNE et al., 2013; RAPOSO, STOORVOGEL, 2013). TSG101 e Alix são componentes do ESCRT, e são utilizados atualmente como identificadores de membrana de exossomo (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013). O TSG101 (do inglês, *Tumor Susceptibility Gene 101*) é um componente do complexo ESCRT-1. Alix (do inglês, *ALG-2 interacting protein X*) é uma proteína citosólica de células mamárias identificadas inicialmente em associação com a sinalização pró-apoptótica, como no complexo da proteína de ligação ESCRT-III (MISSOTTEN et al., 1999; SUN S et al., 2016).

O tamanho dessas partículas é dado pelo seu diâmetro, que pode variar entre 30 a 150 nm. Quanto a composição lipídica, os exossomos contêm um alto nível de aminofosfolipídios, ceramida, esfingolipídeos e colesterol (LÄSSER et al., 2012; ZHAO L et al., 2015). Quanto as proteínas, reconhece-se as tetraspaninas (proteínas de superfície celular, por exemplo, CD9, CD63 e CD81), as chaperonas (HSP70) e membros da família Rab GTPase (OSTROWSKI et al., 2010), as flotilinas, as proteínas *heat shock*, as proteínas de síntese de MVB (Alix e TSG101), e proteínas e fosfolipases relacionadas com lipídeos (GREENING et al., 2015; ZHANG J et al., 2015; ZHAO L. et al., 2015).

1.1.2. MICROVESÍCULAS

Em 1967, Wolf e colaboradores demonstraram a presença de pequenas vesículas provenientes da membrana celular de plaquetas ativadas. Eles realizaram uma ultracentrifugação de plasma livre de plaquetas, e utilizaram a técnica de microscopia eletrônica para visualizar estes achados. Além disso, constataram que estas pequenas vesículas apresentavam atividade pró- coagulante comparável à célula de origem (WOLF, 1967).

Em termos gerais, as microvesículas (MV), também denominadas por ectossomos ou micropartículas, são originadas da fissão da membrana plasmática ou por brotamento,

sendo liberadas para o meio extracelular (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). O tamanho dessas partículas é dado pelo seu diâmetro, que pode variar entre 100 a 1000 nm (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013; KASTELOWITZ N, YIN H, 2014). Apesar do tamanho das MV se sobreporem ao de exossomos, o que os diferencia é a biogênese.

A biogênese das MV pode ser também observada na **Figura 2**. As MV são formadas principalmente pela contração de proteínas do citoesqueleto e da redistribuição fosfolipídica, que promove uma perda de assimetria de fosfolipídios presentes na membrana plasmática (LEVENTIS, GRINSTEIN, 2010). Nas MV, diferente dos exossomos, descreve-se a presença elevada de fosfatidilserinas, que se posicionam para o lado exterior da membrana da partícula sendo relacionado, portanto, com os mecanismos de sinalização (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010; KASTELOWITZ, 2016). Alguns estudos indicam que a liberação de MV pode ser induzida quando ocorre a ativação de receptores purinérgicos com ATP, ou por lipopolissacarídeos em um modelo de resposta nas células dendríticas (RAPOSO, STOORVOGEL, 2013). Outro modo de regulação observado é o fluxo de cálcio intracelular (GYÖRGY B et al., 2011).

Ressalta-se que alguns estudos denominam de oncosomos, as EV liberadas por células tumorais e que são caracterizadas por um tamanho um pouco maior do que os exossomos e algumas microvesículas (DI VIZIO et al., 2009; MORELLO et al., 2013). A nomenclatura dessas partículas em artigos científicos é tema de constante repercussão.

1.2. FUNÇÕES DE EV NOS PROCESSOS FISIOLÓGICOS E PATOGÊNICOS

A diversidade de EV descritas e sua capacidade de levar consigo informações refletem no desenvolvimento dos processos patogênico e fisiológico (XU W, YANG Z, LU N, 2016). Algumas características fisiopatológicas relacionadas as EV conferem uma capacidade modulatória nas células-alvo, entre estas estão: a transferência horizontal de ácidos nucleicos, a liberação de citocinas e metaloproteinases, a transferência de receptores entre as células e o desempenho de funções específicas no processo de angiogênese (CAMUSSI G et al., 2010; MITTELBRUNN M et al., 2011; O'DRISCOLL L, 2015).

Grande parte das EV descritas estão relacionadas com processos tumorais (NAITO et al., 2016), com a regulação do sistema imunológico e reparo tecidual (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015), em nos processos patológicos hematológicos (AHARON A, REBIBO-SABBAH A, TZORAN I, LEVIN C, 2014), e em doenças virais, por exemplo, na imunodeficiência adquirida (MADISON MN, OKEOMA CM, 2015) e no vírus Epstein

Barr (MECKES DG Jr, 2015). Em outros organismos, estudos demonstram a troca de informação existente por meio de EV. No caso de doenças parasitárias foi visto que as EV são utilizadas como estratégias de imunização (MANTEL PY, MARTI M, 2014). No reino vegetal, relata-se a troca de ácidos nucleicos provenientes de plantas para outras espécies animais por influência das EV (CHIN AR, WANG SE, 2016).

A maioria das células liberaram vesículas e fatores solúveis para o meio extracelular. Células não tumorais liberam vesículas para o meio extracelular em quantidades menores (SILVA T, 2015). Vesículas de células endoteliais são formadas após estímulos com citocinas e espécies reativas de oxigênio, e estas, podem estar elevadas no plasma sanguíneo de pacientes com doenças vasculares como visto por GYÖRGY B et al., 2011. Células do sistema nervoso liberam vesículas atuantes nos processos neurobiológicos como descrito por YOON YJ, KIM OY e GHO YS (2014). COLOMBO, M., RAPOSO, G. e THÉRY, C. (2014) citam que linfócitos T e mastócitos liberam o conteúdo dos seus grânulos de secreção. HANNAFON e DING (2013) adicionam ainda a liberação de adipócitos, neurônios, plaquetas, células dendríticas, epiteliais e endoteliais para o meio extracelular.

Nos processos tumorais, as características observadas nas células oncogênicas são influenciadas pelo microambiente que a compõem. Este microambiente está repleto de fibroblastos, linfócitos, células inflamatórias, células epiteliais e células-tronco mesenquimais (NAITO et al., 2016). Diversos autores identificaram que células tumorais liberam EV para o microambiente tumoral as quais são capazes de regular as células adjacentes (D'SOUZA-SCHOREY, CLANCY, 2012; MURALIDHRAN-CHARI et al., 2010). As principais características correlacionadas e observadas foram a capacidade de células tumorais resistirem ao processo imune, estímulos a angiogênese, progressão, invasão e metástase do tumor (D'ASTI et al., 2016; VADER, BREAKEFIELD e WOOD, 2014; D'SOUZA-SCHOREY e CLANCY, 2012).

O microambiente tumoral apresenta fatores que podem permitir maior agressividade ou por exemplo, a sua expansão celular, dando origem a uma comunicação ímpar entre esse conjunto de células. Hanahan e Weinberg (2010) apontam os processos de ciclo celular, apoptose, proliferação celular, diferenciação, migração, invasão que podem ser regulados pelo microambiente tumoral.

Em 2001 foi demonstrado que as EV derivadas de áreas tumorais podem carregar antígenos para células específicas para promoção de efeitos antitumorais (WOLFERS et al., 2001). Estudos recentes demonstraram que as células tumorais liberam por meio de

EV fatores que apresentam a capacidade de modular essa comunicação com o microambiente tumoral para que ocorra o crescimento tumoral e o processo de metástases (KASTELOWITZ N, YIN H, 2014; COSTA-SILVA B et al., 2015; FALCONE G, 2015; b.GREENING D et al., 2015; SOUNG YH et al., 2015).

Antonyak et al., 2011 demonstraram que microvesículas derivadas de células tumorais induzem a transformação por meio da transferência de transglutaminase e de fibronectina tecidual para células receptoras. Outros estudos avaliaram o sobrenadante de culturas celulares e mostraram um aumento significativo de EV provenientes de glioblastoma multiforme, tumores mamários e melanomas (SKOG J et al., 2008; PEINADO H et al., 2012; SUETSUGU A et al., 2013).

Também em 2015, o grupo de Webber do Reino Unido demonstrou em EV provenientes de linhagens celulares de mesotelioma e no câncer de próstata que a proteína TGF- β (Fator de Crescimento Transformador Beta) está presente na sua superfície. O TGF- β está relacionado com a proliferação e diferenciação celular, entre outras funções biológicas. Sabe-se que esta proteína tem papel antiproliferativo em células normais e em estágios iniciais da oncogênese. No perfil oncológico, as células tumorais aumentam a expressão dessa proteína, influenciando também o aumento de TGF- β nas células vizinhas. Os dados de Webber e colaboradores indicam para o fenômeno da comunicação por meio de EV, observado entre as células tumorais e o microambiente tumoral (WEBBER J et al., 2015; CHOWDHURY R et al., 2015)

Outros estudos têm focado em mostrar o potencial das EV em serem utilizadas como método de diagnóstico ou terapêutico. Evidências científicas sugerem que as EV provenientes de células tumorais podem ser distinguidas de EV provenientes de células normais. Em 2003, Kim HK e seu grupo, consideraram a importância de se avaliar as EV em relação à classificação prognóstica. Isso se deu pelo fato de eles terem encontrado elevada presença de microvesículas circulantes em pacientes com mau prognóstico de câncer gástrico.

Em 2015, um grupo avaliou biópsias líquidas de pacientes com câncer pancreático de estágio inicial, e identificaram um marcador, a glipican-1, em exossomos provenientes das células tumorais (MELO SA, LUECKE LB, KAHLERT C et al., 2015). Um outro grupo de pesquisadores utilizaram a técnica de *ExoScreen*, que permitiu identificar EV provenientes do sangue de pacientes com câncer de colorretal. Para validar que a técnica funcionava de fato, eles testaram as linhagens celulares tumorais de próstata (PC3), epitelial de próstata (PNT2), e câncer de mama (MDA-MB-231-luc-D3H2LN e MCF7)

além das células tumorais de colorretal (células HCT116, HCT15, HT29, COLO201, COLO205, células WiDr e células SW1116), para identificar CD63 e CD9 que são marcadores de superfície de EV (YOSHIOKA Y, KOSAKA N, KONISHI Y et al., 2014).

Evidências utilizando outros fluídos biológicos, como foi o caso de um estudo de 2011, a partir de amostras de urina que compararam pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas e grupo controle. Eles identificaram um potencial biomarcador proteico, o LRG1 (do inglês, Leucine-Rich α -2-Glycoprotein), a partir do perfil proteico das EV provenientes da urina de pacientes com câncer quando comparadas a grupos controles sem a neoplasia (LI Y, ZHANG Y, QIU F, 2011).

Outro potencial biomarcador descoberto em um estudo de câncer de pulmão é o EGF (receptor de fator de crescimento epidérmico) encontrado na membrana de EV. A partir de análises do plasma sanguíneo dos indivíduos oncológicos e não-oncológicos, eles observaram altos níveis de EGF nas EV provenientes dos indivíduos com câncer. Os resultados encontrados apontam para o real valor de diagnóstico *in vitro*, que pode ser mensurado utilizando níveis de proteínas de origem de EV (YAMASHITA T, KAMADA H, KANASAKI S et al., 2013).

Dentre tantas evidências científicas de marcadores proteicos e dos níveis dessas pequenas partículas quando comparados casos tumorais e controles, observa-se um crescente interesse científico nas análises quanto a presença e regulação de alguns tipos de RNA. Dentre eles estão os estudos sobre os pequenos RNA não codificadores, os chamados micro RNA (denominados também por miRNA ou miR). miRNA únicos tem sido identificados por regularem processos tumorais. Exemplo disso, foi o experimento de um grupo do Japão que transferiu miR-143 provenientes de células normais da próstata para uma cultura celular tumoral. Essa transferência induziu a inibição do crescimento em células tumorais da próstata quando houve a repressão do miR-143 (KOSAKA N, IGUCHI H, YOSHIOKA Y, et al, 2012).

1.3. miRNA

Os miRNA são pequenos RNA não codificadores, com tamanho aproximado de 18 a 24 nucleotídeos. Eles podem silenciar o gene alvo no nível pós-transcricional. Isto ocorre seja degradando o seu mRNA alvo pelo complexo RISC ou inibindo sua transcrição (PENFORNIS P, VALLABHANENI KC, WHITT J, POCHAMPALLY R, 2016). Em relação ao código genético humano, dados computacionais preveem que os

miRNA podem regular a expressão de mais de 50% dos genes humanos (FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP, 2009 apud CHERRADI N, 2015).

Os processos biológicos como ciclo celular, apoptose, proliferação celular, diferenciação, migração, invasão e outros processos ligados a biologia do câncer são regulados pelos miRNA (BENNETT P, BEMIS L, NORRIS D, 2013; GOH J, LOO S, DATTA A et al., 2016). Isto se deve principalmente pela capacidade de cada miRNA poder controlar diversos genes e um único transcrito aportar vários sítios de ligação para vários miRNA (CHERRADI N, 2015).

Os miRNA circulantes já foram identificados em diversos fluídos biológicos como no soro, plasma, líquido amniótico, saliva, suor, urina e leite materno (BLONDAL S, JENSBY NIELSEN S, BAKER A et al., 2012).

1.3.1 BIOGÊNESE DE miRNA

Resumidamente, a biogênese do miRNA inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação (**Figura 3**).

A transcrição dos genes miRNA (pri-miRNA) é mediada pela RNA polimerase II. Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNA (pri-miRNA) formam estruturas *hairpin*. No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui Drosha (RNase III), a qual requer um cofator, a proteína DGCR8 (do inglês, DiGeorge syndrome Critical Region gene 8). A estrutura resultante, denominada precursor de miRNA (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5, que é uma proteína de exportação nuclear que utiliza como cofator, a proteína Ran-GTP (do inglês, RAs-related Nuclear protein). O pre-miRNA é convertido em miRNA maduro e funcional pela ribonuclease III Dicer. O miRNA fita dupla maduro formado é de aproximadamente 22 nucleotídeos, e é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (do inglês, RNA-Induced Silence Complex), que inclui as proteínas Argonautas, Dicer e Tarbp2 (HA M, KIM N, 2014). Somente uma das fitas do duplex de miRNA se mantém no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo, a outra fita é degradada. A expressão alterada de componentes da maquinaria de biogênese dos miRNA como Drosha, Dicer e Argonautas, tem sido associada a diferentes tumores humanos, destacando a importância desta via no funcionamento adequado da célula (CHENDRIMADA et al., 2005; OLENA AF e PATTON JG, 2010; HA M, KIM N, 2014; CHERRADI N, 2015).

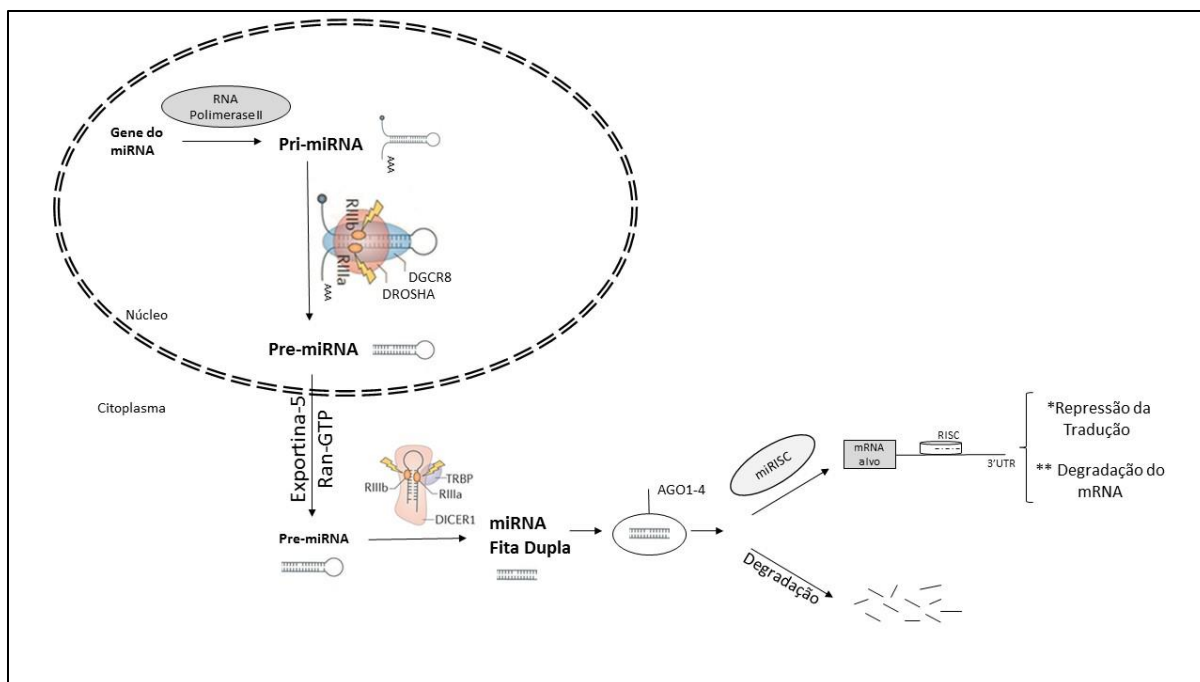


Figura 3. Esquema da biogênese do miRNA. A enzima RNA polimerase II realiza a transcrição de um miRNA primário (pri-miRNA). O complexo enzimático da Drosha cliva os grampos formando precursores do miRNA (pre-miRNA), que são transportados para o citoplasma e associados ao complexo dependente Exportina5/Ran-GTP. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pelo complexo enzimático Dicer, perdendo o formato de grampo. O miRNA fita-dupla gerado associa-se à proteína Argonauta 2 e uma das fitas é acoplada ao complexo de proteínas que reprime a expressão de gene alvo (complexo RISC), enquanto a outra fita é degradada. O complexo RISC contendo o miRNA, liga-se ao mRNA-alvo, reprimindo a sua tradução ou promovendo a sua degradação.

1.3.2. MAQUINARIA DE PROCESSAMENTO DE miRNA EM EV

Como visto anteriormente, o mRNA e o miRNA podem ser carregados dentro das EV e serem transportados entre as células. Tal processo é denominado por alguns autores de “transporte do RNA exossomal” (do inglês, exosomal shuttle RNA) (ZHAO L et al., 2015). O desempenho deste processo é muito importante para a regulação de funções de células distantes, devido as questões levantadas envolvendo o microambiente tumoral e sua influência (KASTELOWITZ N, YIN H, 2014; IPAS H, GUTTIN A, ISSARTEL JP, 2015).

Além de serem encontrados dentro das EV, miRNA circulantes também podem ser encontrados ligados a proteínas. Um exemplo disso é o caso dos miRNA ligados as proteínas Argonauta 2 (Ago2), o qual formam um complexo estável. O grupo de Eldh M, Lötvall J, Malmhall C, et al., 2012 apontaram que devido a este complexo estável, torna-se desafiador traçar a origem dos miRNA circulantes uma vez que a proteína se liga ao

miRNA e podem ser co-isolados nas preparações de EV provenientes de soro e plasma sanguíneo (PENFORNIS P et al., 2016).

Contudo, o mecanismo de como miRNA e miRNA ligados a proteínas são organizados dentro de EV ainda é desconhecido. Estudos avaliando uma ribonucleoproteína chamada hnRNPA2B1, no processo de modificação pós-transcricional, denominado sumoilação, aparentemente controla a triagem de miRNA carregados pelas EV (VILLARROYA-BELTRI et al., 2013). Entretanto, o trabalho de Gibbings et al., 2009 que estudou a associação entre a maquinaria do complexo RISC e os MVB (corpos multivesiculares endossômicos), sugere a existência de outro mecanismo que pode controlar a liberação de miRNA e miRNA ligados a proteínas por meio de EV. O grupo evidenciou a presença da proteína Ago2 e um enriquecimento de GW182 em amostras purificadas de EV provenientes de monócitos conhecidos por produzirem exossomos (Mono-Mac6 (DSMZ) e HeLa) (GIBBINGS et al., 2009).

Muitos estudos reportam a presença da proteína Ago2 livre no espaço extracelular (ARROYO et al., 2011; RUSSO et al., 2012; TURCHINOVICH et al., 2011). Todavia, desde o ano de 2014, identificou-se a proteína Ago2 presente em EV (MELO et al., 2014; SQUADRITO et al., 2014). Em 2014, Melo e colaboradores relataram que Dicer foi detectada nas linhagens celulares MCF7, MDA-MB231, 67NR e 4T1, contudo não foi detectada em linhagens celulares não tumorais de MCF10A e NMuMG. Concomitantemente, AGO2 e TRBP foram detectadas nestas mesmas linhagens celulares tumorais, contudo não foram detectadas nas linhagens celulares não-tumorais. O trabalho ainda relata que o complexo Dicer/TRBP foi detectado por imunoprecipitação nas linhagens celulares tumorais, mas não foi detectada nas linhagens celulares não-tumorais.

Similar a este estudo, McKenzie et al., 2016 encontraram Dicer e Ago2 em EV de células tumorais de colón, bem como a presença de GW182. Conseguiram ainda identificar que em amostras com mutações em KRAS, a quantidade de Ago2, GW182 e miRNA presente é baixa quando comparados a amostras KRAS selvagens (grupo controle). Portanto, os dados encontrados apontam para que haja vias de sinalização distintas que podem regular a triagem de miRNA carregados pelas EV, seja na biogênese do miRNA (Dicer e TRBP) ou na maquinaria de RISC (Ago2 e GW182) (McKENZIE et al., 2016).

Os dados de McKenzie et al, 2016 corroboram para a sugestão feita por Gibbings et al., em 2009 referente a existência de outro mecanismo que pode controlar a liberação de miRNA e miRNA ligados a proteínas por meio de EV. Na revisão feita por Bella e

Taylor (2017), a via de sinalização da p53 também está associada na modulação e perfil de miRNA de EV a partir das células (BELLA E, TAYLOR MA, 2017).

Em relação aos miRNA, foi relatado que o conteúdo de miRNA de EV não corresponde ao perfil intracelular destas moléculas, dado que um subconjunto de miRNA, aparentemente, localizam-se dentro de exossomos. Verificou-se que os miRNA com função onco-gênica ou inflamatória aumentam nas vesículas extracelulares que circulam nos fluídos corporais de pacientes. Os mecanismos que controlam a carga específica de miRNA em exossomos são ainda desconhecidos, e parece plausível que vários mecanismos de carga podem reger a triagem de vesículas extracelulares de subconjuntos específicos de miRNA (SANTANGELO L et al., 2016).

1.3.3. miRNA PROVENIENTES DE EV DESCRITOS EM TUMORES

Foi corroborado recentemente que as células em geral, e em diferentes níveis, secretam diferentes tipos de EV (a. CVJETKOVIC A et al., 2016). Estudos diversos mostraram que linhagens tumorais de câncer de mama apresentam uma variedade de EV que carregam muitos tipos de miRNA comparados a células normais (PALMA J, YADDANAPUDI SC, PIGATI L, et al., 2012; MELO et al., 2014).

Como exemplo, cita-se aqui dois miRNA, o miR7a e o miR10b, que estão envolvidos na biologia do câncer e são carregados pelas partículas extracelulares. O miR7a está descrito no processo de proliferação (BOYERINAS et al., 2010). Um estudo demonstrou uma grande quantidade da família miRlet-7 em EV de linhagem celular de câncer gástrico (OHSHIMA et al., 2010), e outro mostrou que Let-7a de EV pode inibir a migração de células de melanomas e inibir a proliferação de células troncos mesenquimais obtidas de medula óssea (HOU X et al., 2016). O miR-10b provenientes de células MDA-MB231 foram identificadas por promover a invasão quando transferidas para linhagens não malignas (SINGH et al., 2014). Em estudos de câncer de próstata, o miR10b novamente foi identificado como promotor da migração e invasão das células tumorais (XIAO et al., 2014).

Um estudo que avaliou quantitativamente os miRNA de EV, assinalou que estas não carregam muitas cópias de molécula de miRNA por partícula de EV, e sugeriu que haja uma reavaliação dos modelos contemporâneos para os mecanismos de comunicação mediados por partículas de EV (CHEVILLET JR, KANG Q, RUF IK et al., 2014).

Bryant et al., 2012 observaram que elevados níveis de EV contendo miRNA estavam presentes no soro de pacientes com câncer de próstata. Eles também observaram

um aumento no nível de EV no plasma de pacientes com adenocarcinoma de pulmão e melanoma. Yeh YY et al., 2015 analisaram amostras de pacientes com leucemia linfóide crônica. Eles identificaram no plasma, os marcadores de superfície de membrana CD37, CD9 e CD63 de partículas de EV. Além disso, identificaram miRNA associados a esta doença, incluindo os da família miR-29, miR-150 e miR-223. Chiabotto et al., 2016 encontraram em amostras de RNA provenientes de EV oriundas de células epiteliais tubulares renais (RPTEC), 237 miRNA expressos. Eles demonstraram que estas EV são as principais mediadoras da diferenciação epitelial em células-tronco mesenquimais (MSC) derivados de medula óssea.

Os resultados observados por diversos pesquisadores indicam uma importante implicação das EV no compartilhamento de informações moleculares entre diversas populações de células presentes no microambiente tumoral. Isto posto, é razoável especular que a transformação maligna poderia estar diretamente associada as moléculas carregadas/produzidas pelas EV, com importante impacto na sua função. Portanto, é notória a importância de se investigar os miRNA provenientes das EV e sua capacidade de regulação das funções biológicas, especialmente no câncer.

Em conjunto, esses resultados sugerem uma significativa participação das EV e seus componentes na capacidade de agressividade entre as diferentes populações de células. Desta forma, faz-se pertinente avaliar se os componentes da maquinaria de processamento de miRNA poderiam estar fortemente associados às EV tumorais de fenótipo mais agressivo. A fim de examinar essa questão, propôs-se avaliar os componentes proteicos presentes nas EV provenientes de quatro linhagens celulares tumorais, de agressividade distintas para comparação.

2. JUSTIFICATIVA

Observa-se um crescente interesse nas pesquisas científicas para avaliar as vesículas extracelulares secretadas por diversas células e outros fluídos biológicos. Como descrito anteriormente aqui, as EV podem modular os processos biológicos das células, especialmente de células com características tumorais e seus respectivos microambientes, por meio de proteínas, mRNA e miRNA associados a eles. É sabido que as EV contribuem ativamente para as características tumorais em diversos cânceres, como no processo de metástases, comunicação, migração, transferência horizontal de oncogenes, alteração da transcrição de células alvos por meio do complexo RISC associado ao miRNA, entre outros.

Portanto, os miRNA provenientes das EV são uma potencial ferramenta para prognósticos, diagnósticos e novas terapias. Contudo, ainda não é compreendido a origem da maquinaria de processamento dos miRNA presentes nas EV. É importante saber a origem destes, se são ou não dependentes da célula de origem, para que em seguida sejam pensados métodos/ferramentas que possam reter ou diminuir o processamento de novos miRNA associados ao processo-doença, como o câncer.

Estudos recentes indicam que os miRNA são independentes da célula de origem, com a maquinaria de processamento própria. Além disso, outros estudos demonstraram que diferentes linhagens tumorais, e de diferentes organismos, apresentam um painel distinto de moléculas que as EV secretam. Estas moléculas são capazes de influenciar no microambiente tumoral, sendo relacionados com inúmeros processos biológicos que compactuam para a agressividade celular. Por fim, faz-se pertinente uma avaliação dos principais componentes proteicos da maquinaria de processamento de miRNA. Esta abordagem ajudará compreender os mecanismos moleculares das EV nos organismos, por exemplo, o seu papel na capacidade de transmitir informações de tumores metastáticos e altamente invasivos em um microambiente tumoral.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Detectar os componentes proteicos da maquinaria de processamento de miRNA nas vesículas extracelulares provenientes de linhagens celulares MDA-MB231 e Fibroblasto humano.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Isolar vesículas extracelulares a partir do sobrenadante das linhagens celulares MDA-MB231 e fibroblasto humano;
- b. Analisar a distribuição das vesículas extracelulares purificadas em relação ao tamanho e a concentração de partículas;
- c. Avaliar a presença/ausência das proteínas Alix, Calnexina, CD63, CD9, CD81 e TSG101 marcadores de vesículas extracelulares;
- d. Avaliar a presença/ausência das proteínas Dicer, Drosha, TRBP2, AGO2, relacionadas a maquinaria de processamento de miRNA;
- e. Analisar os achados proteicos de modo comparativo das vesículas extracelulares provenientes do sobrenadante da cultura celular MDA-MB231 e fibroblasto humano.

4. MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para alcançar os objetivos propostos para este trabalho, partiu-se da cultura de linhagens celulares MDA-MB231 (tumoral mamário humano) e fibroblastos humano, que foram cultivadas até o momento a qual a confluência celular atingisse 60% aproximadamente, sendo feita a troca do meio por um meio contendo soro fetal bovino depletado. A coleta do sobrenadante da cultura celular se deu após 72 horas, com a finalidade de se identificar e comparar componentes específicos da maquinaria de processamento de miRNA presentes nestes sobrenadantes. Para tanto, foi utilizado técnicas de biologia molecular e proteômica. Abaixo, observa-se o fluxograma seguido para aquisição dos dados (**Figura 4**).

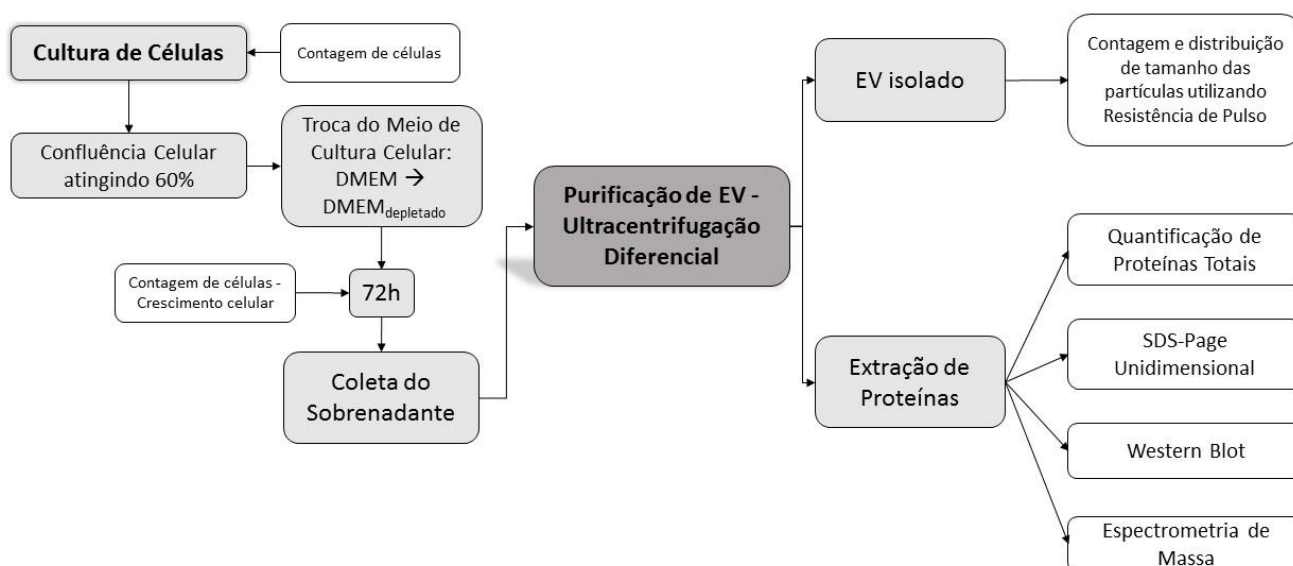


Figura 4. Delineamento experimental realizado para o projeto de Doutorado.

4.2. CULTURA CELULAR

4.2.1. LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares utilizadas foram:

- MDA-MB231 (ATCC® CRM-HTB-26™), gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB). É uma linhagem humana com morfologia epitelial (KRAS CRM) derivado de adenocarcinoma mamário de sítio metastático.
- Fibroblasto humano, gentilmente cedida pela Prof. Juliana Lott de Carvalho, Diretora de Tecnologia Celular da empresa e professora e pesquisadora da Universidade Católica de Brasília. As células são derivadas da pele de doadores saudáveis que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Na terceira passagem, as células foram analisadas por citometria de fluxo e são > 90% para o marcador de superfície CD90. Estas células foram produzidas pela empresa CellSeq Solutions, como lotes-piloto.

As linhagens celulares foram cultivadas, processadas e analisadas no Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB). As características fenotípicas das linhagens celulares MDA-MB231 e fibroblasto humano estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Comparação dos níveis de agressividade entre as linhagens celulares tumorais MDA-MB231 e fibroblasto humano (adaptado de <www.atcc.org>).

Características	MDA-MB231	Fibroblasto
Identificação/Catálogo	Adenocarcinoma mamário de sítio metastático/ ATCC® CRM-HTB-26™	Fibroblasto Humano
Tipo histológico	Carcinoma ductal invasivo	Epitelial
Potencial invasivo	++++	Ausente
Potencial metastático	++	Ausente

4.2.2. CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm², à temperatura de 37°C e a 5% de CO₂. Para cada linhagem foi utilizado o meio DMEM (Gibco®, Life Technologies™, EUA), suplementado com 4.5g/L D-Glicose, 110mg/L Piruvato de sódio, sem L-glutamina; 10% (V/V) Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®, Life Technologies™, EUA), 1% (V/V) de antibiótico PenStrep (Penicilina + Streptomicina) (Gibco®, Life Technologies™, EUA).

As linhagens celulares cultivadas eram do tipo aderentes. Novas garrafas eram realizadas a cada 2-3 dias, quando atingido confluência celular de 80% aproximadamente. Quando obtido o número suficiente de garrafas para aquisição de material, esperou-se que as mesmas crescessem até atingir 60% (aproximadamente) de confluência para que fosse realizada a troca do meio de cultivo celular, composto especificamente por 10% (V/V) SFB depletado de EV por ultracentrifugação (120.000g por 18h à 4° C, rotor SW41Ti, tubos 331372, Optima XE-90 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Califórnia EUA), meio DMEM (Gibco®, Life Technologies™, EUA), suplementado com 4.5g/L D-Glicose, 110mg/L Piruvato de sódio, sem L-glutamina e 1% (V/V) de antibiótico PenStrep (Gibco®, Life Technologies™, EUA).

A coleta do sobrenadante foi feita após 72 horas. O volume final coletado do sobrenadante das linhagens celulares foi de 500 ml, aproximadamente. Em seguida, foi realizado as centrifugações diferenciais como explicado no próximo tópico.

4.3. PURIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

A purificação das vesículas extracelulares contidas no sobrenadante das culturas celulares foi executada adaptando-se o método de ultracentrifugação diferencial descrito por Théry et al., 2006, Luga et al., 2012, e Melo et al., 2014.

As centrifugações foram realizadas na seguinte ordem: 2.000g por 30min. a 4°C, para descarte de resquícios celulares; 10.000g por 40 min. a 4°C, para descarte de debris celulares e outros compostos; as amostras foram filtradas utilizando filtro de 0,22µm (KASVI, Brasil) e, por fim, realizado uma ultracentrifugação por 120.000g por 2h a 4° C. O pool dos pellets de cada sobrenadante das distintas linhagens celulares foram novamente ultracentrifugadas por 120.000g por 2h a 4°C. O equipamento de ultracentrífuga utilizado foi o Optima XE-90 (Beckman-Coulter, Califórnia, EUA), rotor SW41Ti e tubos 331372. Por fim, o novo pellet foi eluído em 1 mL de tampão PBS 1x

(NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ - filtrado e autoclavado) e armazenado imediatamente em freezer a -80° C.

4.4. CONTAGEM E CONCENTRAÇÃO DE EV UTILIZANDO RESISTÊNCIA DE PULSO

A tecnologia de resistência de pulso elétrico, sistema qNANO (Izon, Christchurch, Nova Zelândia), foi utilizada para determinar a variação do diâmetro das partículas purificadas do sobrenadante das culturas celulares, bem como sua concentração. Resumidamente, a técnica se baseia no monitoramento de fluxo de corrente elétrica que passa através de um poro de abertura ajustável. Partículas únicas são medidas em tempo real e em alto desempenho.

Foi utilizado o poro específico NP200 (referência A34948I, Izon, Christchurch, Nova Zelândia). A escolha do poro NP200 se deu por medir partículas de 80 a 640 nm, como observado na **Tabela 3**, de acordo com o manual do fabricante. Em um primeiro momento foi realizada leitura de 40µL de tampão PBS 1X, para verificar se a quantidade de partículas presentes iria interferir nas demais leituras. Na célula inferior foram utilizados 70 µL de PBS 1x. A calibração para o NP200 utilizou esferas de diâmetros e concentrações conhecidos diluídos em tampão PBS 1x e mensurados de forma idêntica às amostras. As amostras foram lidas em triplicata técnica, a partir de 40 µL de amostra na célula superior, de acordo com os parâmetros estabelecidos a seguir.

A largura do poro e a pressão foram reguladas por meio das válvulas laterais. A abertura do poro aplicado na membrana foi de 45mm e a tensão utilizada foi de 0,80V, como sugerido pelo fabricante. O nível do ruído se manteve constante ou menor que 10pA. A voltagem foi ajustada de forma a manter a corrente em torno de 110nA. A pressão nas amostras foi de 7cm.H₂O. A pressão foi aplicada na unidade celular do fluido usando a unidade de pressão variável do equipamento para facilitar a movimentação das partículas no poro, como sugerido pelo fabricante. Pressões manuais também foram aplicadas ao fluido celular superior, no intuito de facilitar a translocação das vesículas pelo poro, e, assim, permitir a leitura satisfatória de partículas no tempo máximo de 10 minutos. A análise do diâmetro médio, moda e concentração das partículas foram feitas utilizando o software Izon Control Suite versão 3.2.

Tabela 3. Tabela com as especificações de nanoporos que podem ser utilizados no qNANO, conforme indicação do fabricante.

Especificações do Nanoporo			
Tamanho do poro	Análise da faixa de leitura (nm)	Concentração (part./mL)	Calibração das partículas
NP100	40 a 320	1,00E+10	CPC100
NP150	60 a 480	5,00E+09	CPC100,200
NP200	80 a 640	2,00E+09	CPC200
NP300	115 a 1150	1,00E+09	CPC200,400
NP400	115 a 1150	5,00E+08	CPC400,500
NP800	320 a 3200	1,00E+08	CPC500,800
NP1000	400 a 4000	5,00E+07	CPC800,1000
NP2000	800 a 8000	5,00E+06	CPC2000
NP4000	1600 a 16000	1,00E+05	CPC4000

4.5. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A partir de 400µl e 500µl das amostras de EV purificadas provenientes de 500mL de sobrenadante de cultura celular das linhagens de MDA-MB231 e Fibroblasto humano é que foram obtidas as proteínas totais para realizar as técnicas de western blot e espectrometria de massa.

A extração de proteínas totais foi realizada com a adição de 1% (V/V) de coquetel inibidor de protease (PIC) (Sigma-Aldrich®, EUA) e utilizando um processador ultrassônico ou sonicador (UNIQUE, Ultrasonic Cleaner, lavadora ultrassônica, modelo USC-2800, Brasil) por 30 minutos. O sonicador é capaz de extrair proteínas totais de amostras, cortes de DNA, mistura de compostos, dispersão de nanopartículas e rompimento de células, devido a energia ultrassônica gerada. O equipamento utilizado atinge a frequência de 40kHz e potência de 154W.

As proteínas totais foram quantificadas utilizando o reagente de Bradford. A reação foi montada adicionando-se 190 µL de reagente Bradford (Gibco®, EUA) e 10 µL de amostra diluída 1:10 em solução tampão PBS (1x e filtrado). Diluições em série de concentrações conhecidas de BSA (albumina de soro bovino, do inglês, *Bovine Serum Albumin*), diluídas em água ultrapura, foram utilizadas para a construção da curva padrão. A partir da curva padrão, a equação da reta gerada no gráfico contendo as absorbâncias (eixo y) em relação as concentrações conhecidas de BSA (eixo x), permitiu o cálculo das concentrações das amostras. A leitura da placa foi realizada após 5 minutos do preparo da reação, utilizando comprimento de onda a 595nm e temperatura ambiente, no

programa Gen5 versão 2.00.18 (Biotek Instruments Inc, EUA) no espectrofotômetro Eon (Biotek Instruments Inc, EUA).

4.6. ELETROFORESE SDS-PAGE UNIDIMENSIONAL

A separação das proteínas totais, de acordo com seu tamanho, foi feita por eletroforese em gel de separação de poliacrilamida a 12%, e gel de empilhamento de poliacrilamida a 5%. O volume de 15 μ L de amostra foi misturada com 5 μ L de 4 \times Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, EUA) contendo 5% β -mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos, e aplicadas no gel em seguida. O marcador molecular utilizado foi SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O gel foi submetido a 20mA, por 3-4 horas. O corante *Coomassie Blue* foi utilizado para a visualização das bandas das proteínas totais contidas no gel após a eletroforese.

4.7. WESTERN BLOT

A técnica de western blot consiste em detectar proteínas específicas de acordo com seu peso molecular em membrana de nitrocelulose pela reação com anticorpos específicos.

A técnica foi utilizada com o objetivo de se identificar as proteínas Dicer, Drosha, TRBP2 e AGO2 relacionadas a maquinaria de processamento de miRNA, e para a confirmação das vesículas extracelulares foi utilizado as proteínas de superfície de membrana das vesículas extracelulares Alix, CD9, CD63, CD81 e TSG101 e como controle negativo para as EV foi utilizado a Calnexina, que é uma proteína do retículo endoplasmático, portanto presente apenas em células e pellets de células. Além dessas, foram testadas as proteínas IL-6, ApoA-IV e AQP2 pois estão relacionadas com o processo tumoral, nas cascatas de inflamação, colesterol da membrana e podem facilitar a migração celular, invasão e proliferação no desenvolvimento de tumores, além do transporte de água, respectivamente.

A separação das proteínas totais das amostras por tamanho foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5-8%, utilizando os mesmos parâmetros da eletroforese SDS-PAGE unidimensional descritos anteriormente.

O marcador molecular utilizado foi o Kaleidoscope™ Prestained (BioRad Laboratories®), CA, EUA) e o Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standarts (BioRad Laboratories®), CA, EUA). Como controle negativo foi utilizado o

PBS 1x, o mesmo que foi utilizado na diluição das amostras. O controle positivo utilizado foi o pellet celular da linhagem MDA-MB231. Aproximadamente 20µg de proteína total foi aplicado no gel de poliacrilamida. Ao término da eletroforese, as proteínas recém separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF de 0.45µm (fluoreto de polivinilideno) (Millipore®, Billerica, MA, EUA) previamente ativadas por metanol em tampão de transferência.

A transferência semi-seca foi utilizada principalmente para as proteínas de baixo peso molecular (entre 20kDa a 95kDa). O tampão de transferência semi-seco (solução de 500mL contendo 2,91g de Tris-HCl, 1,47g de Glicina, 100mL de Metanol e água destilada, pH=9,2) foi utilizado para molhar os filtros por 10 minutos antes do início da transferência, e metanol 100% foi utilizado para submergir a membrana de PVDF por menos de 1 minuto. Foi feito um “sanduíche” contendo: um filtro, a membrana de PVDF, o gel de poliacrilamida contendo as amostras e por último um segundo filtro. O sistema foi fechado e a transferência foi realizada utilizando uma diferença de potencial elétrico de 20V por membrana, por 40-50 minutos, amperagem oscilando entre 150 a 400 mA. Foi feito também um teste utilizando este tipo de transferência semi-seca, para as proteínas de alto peso molecular, utilizando os parâmetros de 20V por 3h 30minutos.

A transferência molhada foi utilizada também, especialmente, nas proteínas de alto peso molecular (entre 160kDa e 216kDa). Diferente da semi-seca, a transferência molhada foi submetida a uma diferença de potencial elétrico de 100V por gel, por 1 hora (para as proteínas de baixo peso molecular) e, a 15V por 12 horas (no caso das proteínas de alto peso molecular), em leve agitação (com o auxílio de uma bailarina) e em temperatura fria (4°C – mantido em câmara fria e com uma placa de gelo dentro do sistema de transferência), contendo tampão de transferência (Tris-HCl (48mM), glicina (39mM), metanol (20%) e SDS (10%), pH=9,2). Foi feito um “sanduíche” contendo: uma esponja, um filtro, o gel de poliacrilamida, a membrana de PVDF, um filtro, e por último uma esponja.

Após ambas as transferências, o gel de poliacrilamida foi corado com azul de comassie por 1 hora sob agitação para conferir a presença/ausência de proteínas totais e qualidade da etapa de transferência. O gel foi descorado com solução contendo metanol-ácido acético. Enquanto que as membranas de PVDF foram incubadas em solução de bloqueio contendo BSA 5% e solução TBST 1x (Tris-HCl a 50 mM com pH 7,4; NaCl a 150 mM; Tween-20 a 0,1%), por pelo menos 12h, em temperatura ambiente e em leve agitação, para saturar os sítios de ligação inespecíficos na membrana que podem ocorrer.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário de interesse nas condições de diluição descritas na **Tabela 4**, por 12-14 horas (overnight) a 4°C e em leve agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes usando TBS-T 1x por 5 minutos em leve agitação. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário específico (**Tabela 4**), e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e em leve agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes usando TBS-T 1x por 5 minutos em leve agitação. Por fim, para revelar a membrana de PVDF contendo as proteínas foi utilizado o kit colorimétrico Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (BioRad Laboratories [®], Hercules-CA, EUA). A reação foi interrompida após 10 minutos utilizando água destilada. Todos os anticorpos primários e secundários foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Dallas-TX, EUA).

Tabela 4. Relação dos anticorpos primários, sua referência/código, seus respectivos pesos moleculares em quilodaltons, diluição realizada e seus respectivos anticorpos secundários com a diluição realizada.

Anticorpo Primário	Referência	Peso Molecular (KDa)	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
DICER	(C-20) sc-25117	216	1:1000	Cabra	1:2.000
RNase III DROSHA	(E-19) sc-31159	160	1:1000	Cabra	1:2.000
ALIX	(Q-19) sc-49268	95	1:500	Cabra	1:2.000
EIF2C2 AGO2	(N-13) sc-32659	94	1:500	Cabra	1:2.000
Calnexina	(H-70) sc-11397	90	1:1000	Coelho	1:2.000
CD63	(H-193) sc-15363	30-60	1:500	Coelho	1:2.000
ApoA-IV	(N-20) sc-19036	46	1:500	Cabra	1:2.000
TRBP2	(V-15) sc-27615	45	1:500	Cabra	1:2.000
TSG 101	(M-19) sc-6037	45	1:500	Cabra	1:2.000
AQP2	(C-17) sc-9882	29	1:500	Cabra	1:2.000
CD9	(H-110) sc-9148	24	1:500	Coelho	1:2.000
CD81	(H-121) sc-9158	22-26	1:500	Coelho	1:2.000
IL-6	(M-19) sc-1265	21	1:500	Cabra	1:2.000

4.8.ESPECTROMETRIA DE MASSA

O perfil proteico das amostras analisadas foi realizado por espectrometria de massa, pela técnica MS/MS. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida a 12% e coradas com Coomassie® Blue Silver G-250. A coloração das proteínas totais com este reagente é compatível para aquisição de material peptídico para ser analisado pela técnica de espectrometria de massa. Dessa maneira, a separação das proteínas totais realizou-se em um único gel contendo as amostras, além de um poço para o marcador SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e um poço para o controle positivo proveniente de pellet celular da linhagem MDA-MB 231. O gel de poliacrilamida a 12% foi feito empregando os mesmos reagentes e concentrações de tampões, como descrito anteriormente no tópico 4.6.

Para executar a digestão das proteínas totais presentes nas bandas visíveis com tamanho conhecido utilizou-se de kit específico. O kit designado foi o *Trypsin Profile IGD Kit For In-Gel Digests* (SIGMA®, Saint Louis, Missouri, EUA).

Para a digestão do gel utilizou protocolo padrão recomendado pelo fabricante. De forma sucinta, as bandas com tamanho de interesse foram excisadas manualmente e colocadas em um tubo de plástico de 2 ml previamente pré-lavada com solução de extração de peptídeo. Em seguida, a solução descorante do kit foi inserida com volume para cobrir o pedaço do gel e incubada a 37° C por 30 minutos. Este passo foi realizado duas vezes. Para secar algum possível líquido da solução descorante, as amostras foram inseridas no SpeedVac por 20 minutos. Após isto, tripsinizações sucessivas foram adicionadas ao tubo e deixado overnight à 37° C. No dia seguinte, o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Por se querer maior quantidade de peptídeos possíveis das amostras, foi realizado o passo adicional recomendado ao final do protocolo que consiste na adição da solução de reação da tripsina e novamente deixado overnight a 37° C. Os sobrenadantes obtidos foram adequadamente pipetados em placa específica, contendo 10 amostras por vez, para a análise no equipamento de Espectrometria de Massa - instrumento AutoFlex Speed (Bruker Daltonik GmbH, Bremen - Alemanha).

Em resumo, obteve-se 5 amostras referentes à extração de proteína total de EV proveniente do sobrenadante da linhagem celular MDA-MB231 e também da linhagem não-tumoral de fibroblasto humano, e elas foram separadas em tubos de plástico (1,5ml) pelo tamanho da proteína visualizada no gel de proteínas coradas com o azul de comassie. Portanto, tubo 1 contendo as proteínas maiores que 200kDa, tubo 2 contendo as proteínas em torno de 160kDa, tubo 3 contendo as proteínas na faixa de 90kDa, tubo 4 contendo as

proteínas em torno de 45kDa, e, por fim, tubo 5 contendo as proteínas menores que 40kDa. As amostras para a análise da espectrometria de massa foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de inserção por pipetagem na placa de 96 poços apropriada para ser analisada no AutoFlex Speed.

5. RESULTADOS

As vesículas extracelulares têm sido identificadas em maiores quantidades em sistemas tumorais. Os miRNA já foram detectados em compartimentos extracelulares como em fluídos biológicos e cultura celular. Os tipos de miRNA presentes dentro das vesículas extracelulares está intimamente relacionada com a função que será desempenhada por estas vesículas. Sabendo que a maquinaria de processamento de um miRNA consiste em uma complexa rede de proteínas, elas podem estar diretamente envolvidas na biologia do câncer. A maioria dos estudos visam compreender o papel funcional das EV e identificar quais os miRNA estão presentes dentro das EV, especialmente nas doenças como o câncer, com a finalidade de se alcançar novas terapias, estratégias de diagnósticos e marcadores moleculares. Contudo, é importante averiguar e identificar a presença de determinados componentes proteicos da maquinaria de processamento de miRNA dentro das EV. Isto permitirá a compreender o papel de uma maquinaria de processamento própria de miRNA, no caso de ser independente como um trabalho publicado apontou, e como se regula, sua função, bem como relacionar com os tipos de miRNA que estão sendo identificados em análises de arranjos globais. Estes dados podem ser fundamentais para o desenvolvimento e progressão de tumores, especialmente aqueles com características mais agressivas.

5.1. MORFOLOGIA DAS LINHAGENS CELULARES

A morfologia celular da linhagem tumoral MDA-MB231 (**Figura 5 – A, B, C**) e da linhagem celular Fibroblasto humano (**Figura 5 – D, E**) apresentaram-se uniformes ao longo do crescimento e das passagens celulares, sem indicação de contaminação por microrganismos.

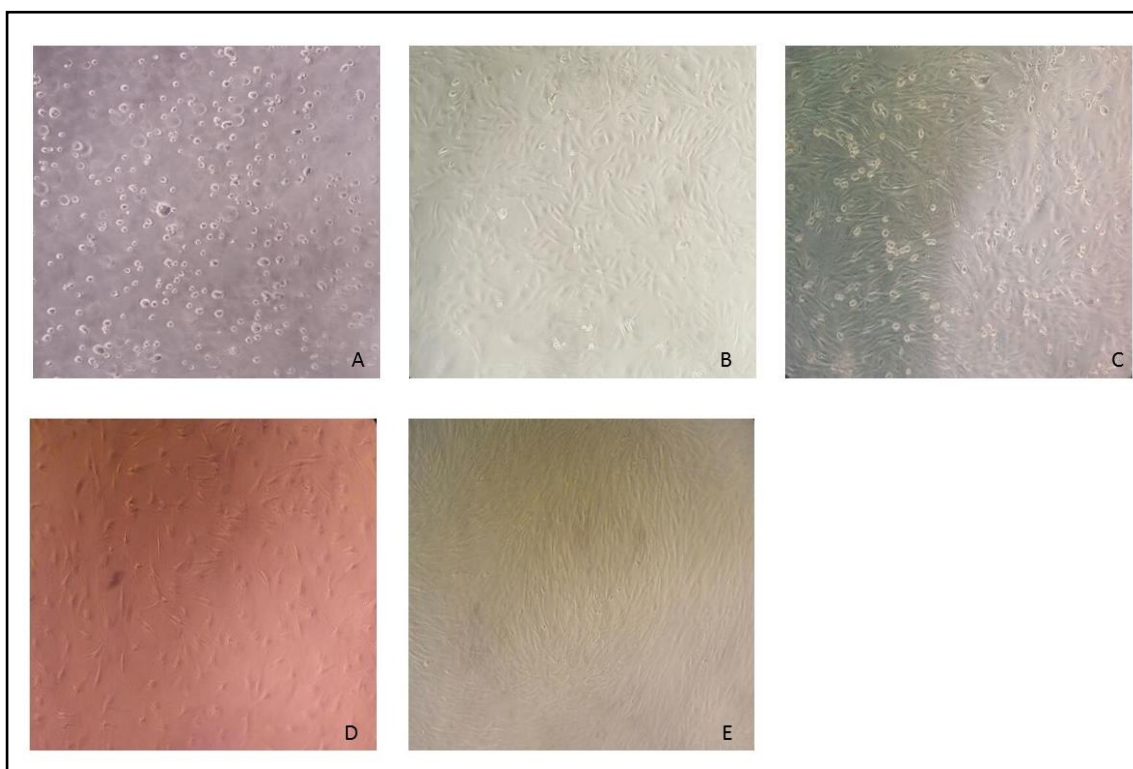


Figura 5. Imagens das linhagens celulares observadas por microscópio óptico durante seu crescimento celular até a coleta do sobrenadante. Respectivamente, na parte superior, da esquerda para direita, está a linhagem MDA-MB231, em A quando a linhagem foi descongelada, em B quando a linhagem atingiu 60% de confluência (aumento 10x), em C após 72h e feita a coleta do sobrenadante (aumento 10x). Respectivamente, na parte inferior, da esquerda para direita, está a linhagem Fibroblasto Humano, em D quando a linhagem atingiu 60% de confluência (aumento 10x), em E após 72h e feita a coleta do sobrenadante (aumento 10x). Foi observado morfologia celular de modo regular e sem contaminação aparente por microrganismos.

A contagem do crescimento celular foi realizada nos tempos 0h (60% confluência e troca do meio de cultura) e 72h (coleta do sobrenadante). A contagem de células foi realizada usando o reagente azul de Trypan, utilizando a câmara de Neubauer em microscópio óptico (Axiovert 40 CFL, Zeiss, EUA). Os valores do crescimento celular estão apresentados na **Tabela 5**. Observou-se que o crescimento foi elevado em ambas as linhagens.

Tabela 5. Descrição das linhagens celulares, meios de cultura utilizados e crescimento celular.

Linhagem Celular	Tipo Celular	Origem	Meio de Cultura	Contagem de células	
				0h	72h
MDA-MB231	Adenocarcinoma mamário	Humano	DMEM	$2,4 \times 10^4$	$5,3 \times 10^6$
Fibroblasto	Epitelial	Humano	DMEM	$1,2 \times 10^4$	$2,65 \times 10^6$

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS EV

5.2.1 RESISTÊNCIA DE PULSO

Para caracterizar as vesículas extracelulares purificadas a partir de 100ul das amostras de EV provenientes de 500mL de sobrenadante de cultura celular das linhagens de MDA-MB231 e Fibroblasto humano, o perfil foi analisado em relação ao seu diâmetro, à contagem de partículas, a média da corrente da leitura, a concentração de partículas das EV, utilizando a tecnologia de resistência de pulso pelo sistema qNANO (IZON, Nova Zelândia).

Os resultados das leituras feitas com as amostras das EV do sobrenadante de linhagens celulares estão descritos na **Tabela 6**. Apresenta-se os valores referentes ao tamanho da sua partícula (em média), quantidade e concentração de partículas por volume (em média). O sistema qNANO possui software próprio (Izon Control Suite versão 3.2) e o mesmo gera gráficos com todas as informações das leituras realizadas. Dessa maneira, a **Figura 6** representa, graficamente, a relação entre o tamanho das partículas e as suas respectivas concentrações lidas pelo sistema qNANO nas amostras purificadas, em triplicatas técnicas. Por conseguinte, a **Figura 7** representa, graficamente, a relação entre o tamanho das partículas e as suas respectivas concentrações lidas apenas no grupo das amostras da linhagem Fibroblasto humano. Enquanto que a **Figura 8** representa,

graficamente, a relação entre o tamanho das partículas e as suas respectivas concentrações lidas apenas no grupo das amostras da linhagem MDA-MB231.

Dentre os resultados observados, temos que todas as partículas alcançaram contagem superior a 500 partículas. A moda do diâmetro das partículas variou entre 122 a 127nm nas EV proveniente da linhagem Fibroblasto humano, e variou entre 111 a 121nm nas EV proveniente da linhagem MDA-MB231.

A concentração média bruta variou entre $1,01 \times 10^{13}$ a $1,66 \times 10^{13}$ partículas por mL nas EV proveniente da linhagem Fibroblasto humano, e variou entre $1,72 \times 10^{13}$ a $2,41 \times 10^{13}$ partículas por mL nas EV proveniente da linhagem MDA-MB231.

Em geral, a distribuição das partículas apresentou picos ótimos entre 115 a 130nm de diâmetro e uniformes, como pode ser visto nas figuras de 6 a 8. As EV purificadas provenientes da linhagem celular tumoral apresentaram maior rapidez na contagem de partículas do que as EV provenientes da linhagem celular de fibroblasto. As fichas com as informações de cada leitura foram fornecidas pelo Izon Control Suite versão 3.2.

Tabela 6. Valores obtidos das EV do sobrenadante de linhagens celulares em seus respectivos tempos de coleta, quanto ao tamanho da sua partícula (em média), quantidade e concentração de partículas por volume (em média), utilizando resistência de pulso.

Linhagem celular	Moda do diâmetro da partícula (nm)	Contagem de Partículas	Concentração média bruta (partícula/mL)
Fibroblasto	124	>500	1,33E+13
MDA-MB231	117	>500	2,06E+13

Legenda: nm (nanometro); mL (mililitro).

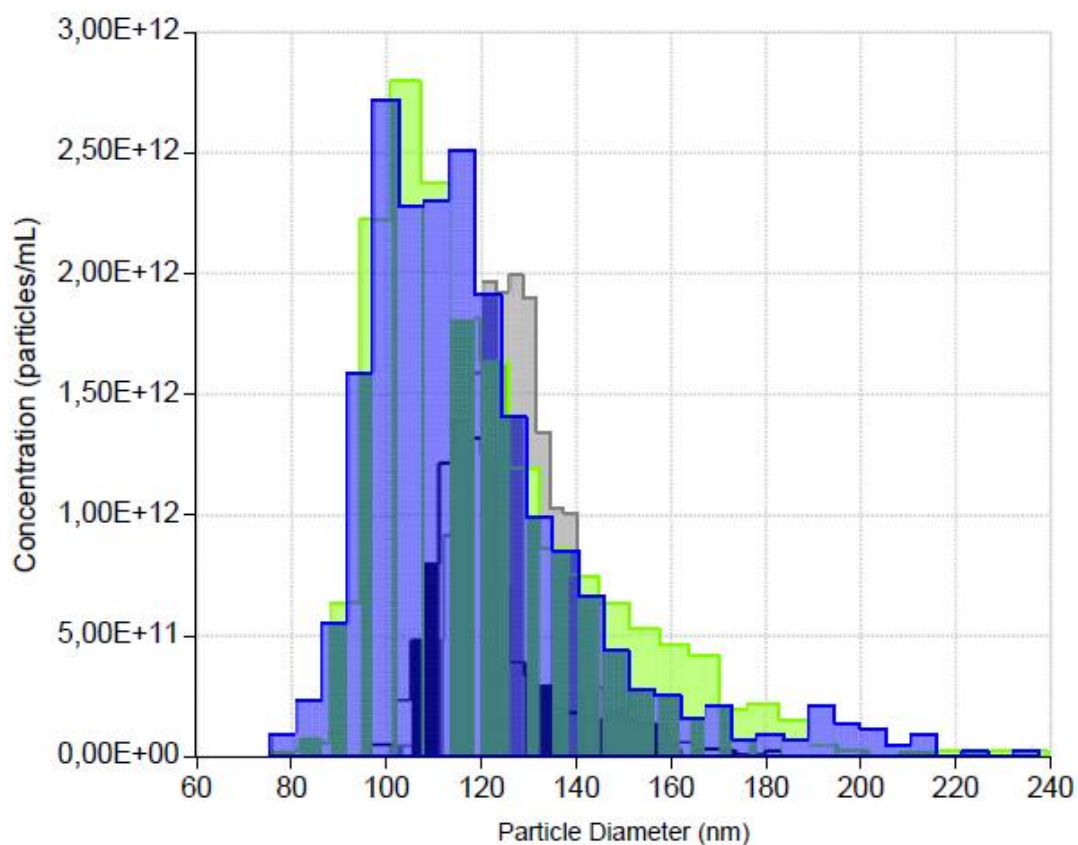


Figura 6. Gráfico geral de todas as EV provenientes das amostras analisadas em duplicata, por resistência de pulso. No eixo “x”, tem-se o diâmetro da partícula (nm), no eixo “y”, tem-se a concentração (partículas/mL) das partículas. As amostras analisadas estão identificadas por cores diversas. Em azul e verde estão as amostras das EV provenientes da linhagem MDA-MB231. Em tons de cinza, estão as amostras das EV provenientes da linhagem de Fibroblasto humano. Observa-se que a maioria das partículas medidas estão entre 90 a 140 nm, confirmando que são exossomos ou microvesículas. Gráfico gerado pelo software Izon Control Suite versão 3.2.

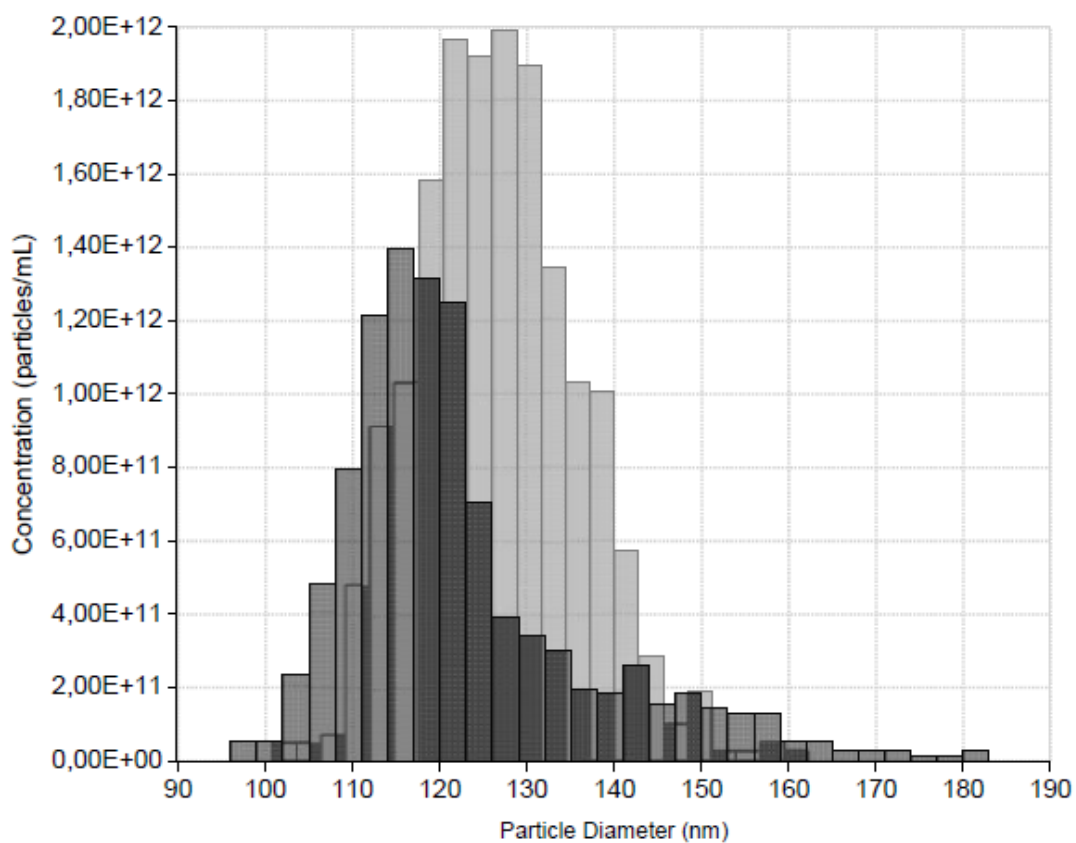


Figura 7. Gráfico das EV proveniente da linhagem celular Fibroblasto humano por resistência de pulso. No eixo “x”, tem-se o diâmetro da partícula (nm), no eixo “y”, tem-se a concentração das partículas (partículas/mL). As amostras analisadas em duplicata estão identificadas nas cores cinza claro e cinza escuro. Gráfico gerado pelo software Izon Control Suite versão 3.2.

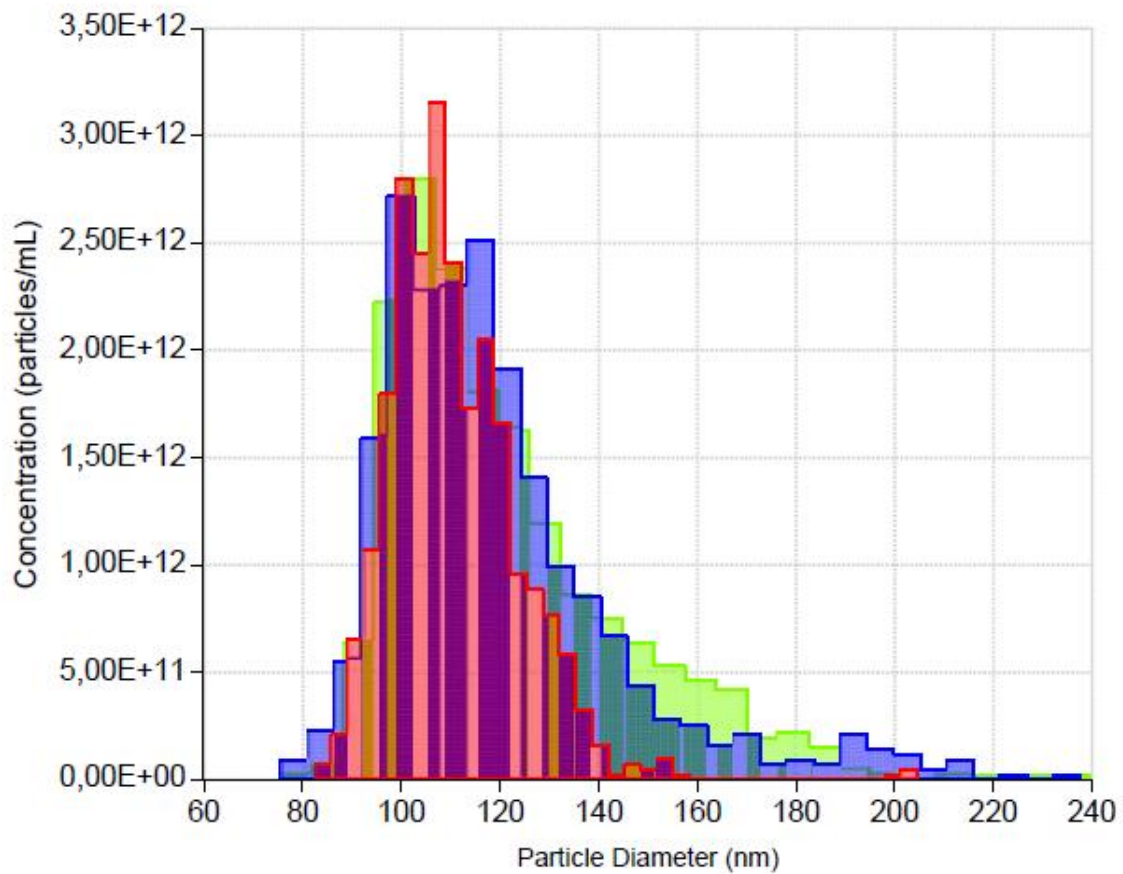


Figura 8. Gráfico das EV provenientes da linhagem tumoral MDAMB 231 no tempo 72 horas analisadas em triplicata por resistência de pulso. No eixo “x”, tem-se o diâmetro da partícula (nm), no eixo “y”, tem-se a concentração (partículas/mL) das partículas. As amostras analisadas em triplicata estão identificadas nas cores verde, azul e vermelho. Gráfico gerado pelo software Izon Control Suite versão 3.2.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

Para a quantificação das proteínas totais extraídas das vesículas extracelulares purificadas a partir de 400 e 500µl das amostras de EV provenientes de 500mL de sobrenadante de cultura celular das linhagens de MDA-MB231 e Fibroblasto humano, foi utilizada a técnica de quantificação de proteínas descrita por Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a obtenção da concentração das proteínas totais pelo reagente Bradford foi utilizado uma curva-padrão com pontos conhecidos de BSA. A partir da curva padrão, a equação da reta gerada permitiu o cálculo das concentrações das amostras. Foram selecionados os pontos entre 1,5 a 0,25 mg/ml para a obtenção da equação da reta, uma vez que os valores das absorvâncias das amostras estavam dentro dessa faixa. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**, referente as amostras 1 e 2 provenientes de 400µl, e referente as amostras 3 e 4 provenientes de 500µl. O primeiro valor obtido do R-quadrado foi igual a 0,92, sendo a equação da reta $y=0,168x + 0,25$. O segundo valor obtido do R-quadrado foi igual a 0,96, sendo a equação da reta $y=0,389x-0,4667$.

O reagente de Bradford apresenta uma estabilidade de 2 minutos a 1 hora e uma sensibilidade quatro vezes maior que a técnica de Lowry (BRADFORD, 1976). Os resultados demonstraram que a amostra de EV tumoral (MDA-MB231) apresentou uma maior quantidade de proteínas totais quando comparada a amostra de EV não tumoral (Fibroblasto humano). Os valores das concentrações de proteínas totais obtidas na técnica de Bradford foram compatíveis com os resultados observados em SDS-PAGE unidimensional, apresentados a seguir.

Tabela 7. Quantificações das proteínas totais provenientes de 400µl e 500µl de EV purificadas de sobrenadante de linhagens celulares por ultracentrifugação diferencial.

Amostra	Volume Extraído	Linhagem Celular	Método Bradford
			Concentração (mg/ml)
1	400	Fibroblasto Humano	5,70
2	400	MDA-MB 231	9,82
3	500	Fibroblasto Humano	15,59
4	500	MDA-MB231	18,42

5.4. SDS-PAGE UNIDIMENSIONAL

As proteínas totais das amostras purificadas de interesse foram separadas pelo seu tamanho em quilodaltons (kDa) utilizando eletroforese em gel de poliácridamida a 8% (SDS-PAGE unidimensional), para confirmar a qualidade e presença das proteínas totais extraídas provenientes das EV do sobrenadante das linhagens celulares estudados.

Primeiramente, fez-se apenas um gel para selecionar a amostra de controle positivo que foi utilizada nos western blots com as amostras de interesse (**Figura 9**). Para tanto, foram visualizadas as proteínas totais provenientes dos pellets celulares das linhagens celulares MDA-MB231, RAW264.7, Fibroblasto humano, tecido epitelial tumoral humano (carcinoma basocelular), NIH3T3 e MCF7 – estas células foram utilizadas em estudos anteriores e guardadas adequadamente em freezer a -80°C como estoque -, para utilizá-las no western Blot com os anticorpos de interesse relacionados ao estudo de EV aqui proposto. A partir deste gel, decidiu-se trabalhar com as proteínas totais do pellet celular da linhagem celular MDA-MB231, sendo estas utilizadas como controle positivo. Lembrando que as mesmas foram obtidas por sonicação de modo idêntico as amostras de interesse do estudo.

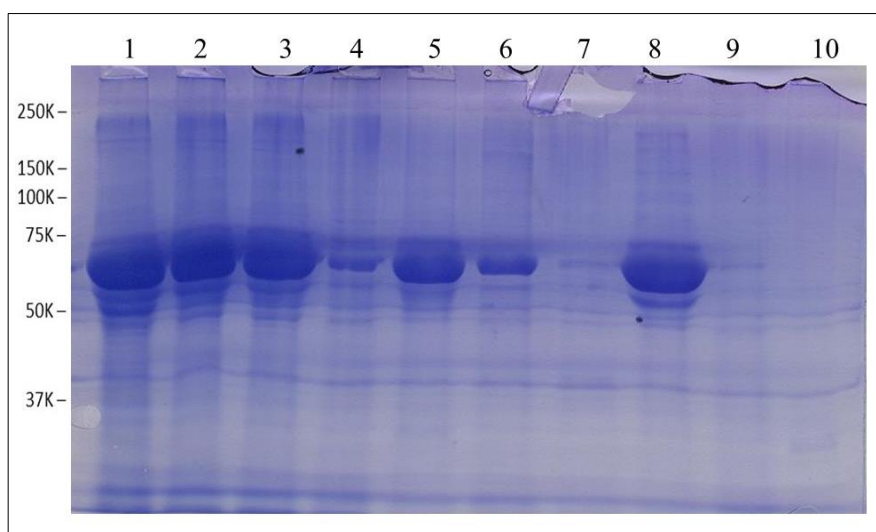


Figura 9. SDS-PAGE unidimensional com poliácridamida à 8% de proteína total de diversos pellets de células. Foram inseridos em torno de 20ug de proteína total por poço. Poço 1 – pellet celular de MDA-MB231 (câncer de mama). Poço 2 – pellet celular de MDA-MB231, segunda fração proveniente da mesma alíquota de origem. Poço 3 – pellet celular de MDA-MB231, terceira fração proveniente da mesma alíquota de origem; Poço 4 – pellet celular de RAW264.7 (macrófagos); Poço 5 – pellet celular de fibroblastos humano; Poço 6 – pellet celular de fibroblastos humano, amostra antiga; Poço 7 – pellet celular de tecido de carcinoma basocelular; Poço 8 – pellet celular de NIH3T3; Poço 9 – pellet celular de MCF7 (câncer de mama); Poço 10 – controle negativo contendo PBS1x.

Em um segundo momento, as amostras de proteínas totais provenientes das EV purificadas do sobrenadante das linhagens celulares de Fibroblasto humano e MDA-MB231 foram observadas por SDS-PAGE unidimensional (**Figura 10**). O gel de poliacrilamida foi corado com o reagente azul de comassie. Em ambos os géis apresentados, os controles negativos apresentaram-se ausentes.

Na **Figura 10.A**, observamos, partido de 30µg de proteína total obtidas por sonicação de 400µl da purificação de EV por ultracentrifugação de 500ml de sobrenadante da cultura celular, nos poços 4 e 5, as amostras de EV da cultura celular de Fibroblasto humano e MDA-MB231, respectivamente.

Na **Figura 10.B**, observa-se as mesmas amostras, contudo de uma nova alíquota partido de 10µg e 20µg de proteína total obtida por sonicação de 500µl da purificação de EV por ultracentrifugação de 500ml de sobrenadante da cultura celular de Fibroblasto humano e MDA-MB231. O poço 3 e 5 da Figura 13.B refere-se a amostra de Fibroblasto humano, e o poço 4 e 6 da mesma figura refere-se a amostra de MDA-MB231. O poço 4 da Figura 13.C refere-se a amostra de Fibroblasto humano e o poço 6 refere-se a amostra de MDA-MB231, partido de 30µg de proteína total dessa nova alíquota.

Observado os resultados, optou-se por se trabalhar com a quantidade mínima de 20µg de proteína total das amostras de interesse. Os dados observados permitiram identificar a presença de proteínas totais das amostras coletadas. O tamanho da banda mais presente foi o de valor aproximado à 65kDa, indicando possível presença da proteína albumina. Ainda mais, é possível identificar outras bandas de proteínas inferiores a 65 kDa. As proteínas de alto peso molecular (peso molecular maior que 90 kDa) foram observadas também nesta técnica.

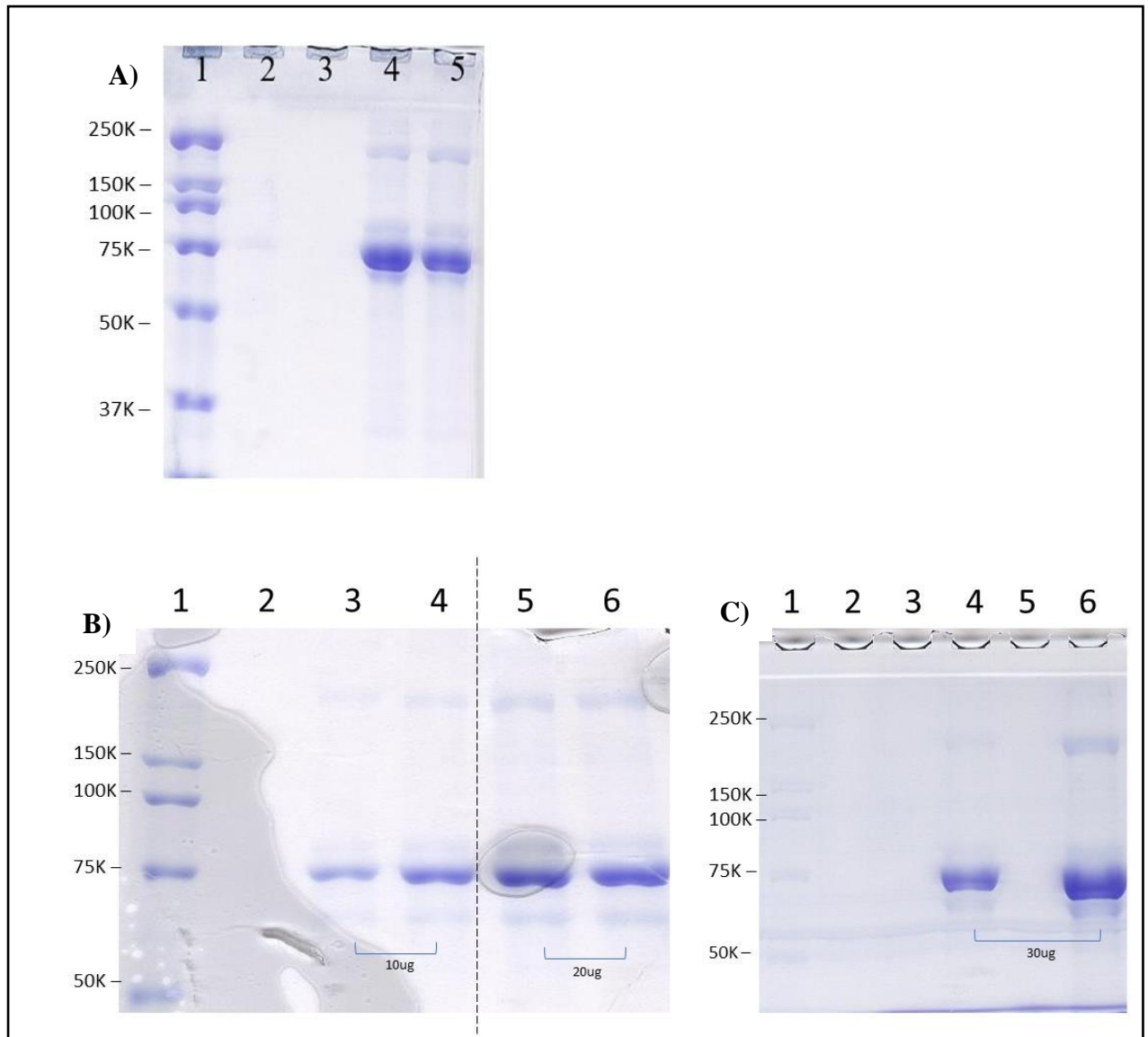


Figura 10. SDS-PAGE unidimensional com poliacrilamida à 8% das amostras Fibroblasto humano e MDA-MB231.

A) Foram inseridos 30µg de proteína total por poço. Poço 1 – marcador molecular SDS-Page padrão, Broad Range. Poço 2 - Controle Positivo pellet celular de MDA-MB231; Poço 3 – Controle negativo PBS 1X; Poço 4 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de Fibroblasto humano à 30µg; Poço 5 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de MDA-MB231 à 30µg.

B) Avaliação do perfil das proteínas totais partindo-se de 10 e 20µg. Poço 1 - marcador molecular SDS-Page padrão, Broad Range. Poço 2 - Controle negativo PBS 1X; Poço 3 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de Fibroblasto humano à 10µg; Poço 4 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de MDA-MB231 à 10µg; Poço 5 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de Fibroblasto humano à 20µg. Poço 6 - Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de MDA-MB231 à 20µg.

C) Avaliação do perfil das proteínas totais partindo-se de 30µg. Poço 1 - marcador molecular SDS-Page padrão, Broad Range. Poço 2 - Controle negativo PBS 1X; Poço 3 – vazio; Poço 4 – Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular de Fibroblasto humano à 30µg; Poço 5 – vazio. Poço 6 - Proteína total de EV do sobrenadante de linhagem celular MDA-MB231 à 30µg.

5.5. WESTERN BLOT

A técnica de western blot foi realizado para avaliar a presença ou ausência de proteínas específicas presentes em EV (Alix, CD9, CD63, CD81 e TSG-101) – são os controles positivos para EV -, de proteínas associadas à maquinaria de processamento de miRNA em EV (Dicer, Drosha, Ago2 (eIF2C2) e TRBP2), além de 3 outras proteínas associadas ao processo tumoral (AQP2, IL-6 e ApoA-IV). Além da Calnexina, que é uma proteína encontrada nas células e não em EV, portanto sendo o controle negativo experimental.

Em cada gel de poliacrilamida foi aplicado por poço 20µg de proteínas totais provenientes de EV purificadas de 500µl de sobrenadante de Fibroblasto humano e MDA-MB231, adicionando-se 5µl tampão de amostra 4x *Laemmli sample buffer* (Bio-Rad, Hercules, EUA), e quando necessário tampão PBS 1x para completar a reação. Todos os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese foram corados com azul de comassie para verificar a qualidade após a etapa de transferência para a membrana de PVDF.

Os anticorpos relacionados aos componentes de EV (biogênese) identificados foram Alix, CD9, CD63, CD81 e TSG-101. As imagens abaixo são os resultados do western blot obtidos por meio de transferência semi-seca e transferência molhada, revelados utilizando kit colorimétrico Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate - AP Color (BioRad Laboratories®), Hercules-CA, EUA). As imagens foram ajustadas utilizando para tanto o programa Windows Photo Gallery 2012 (Microsoft Corporation 2012, EUA).

As proteínas relacionadas com a maquinaria de processamento de miRNA avaliadas foram a Dicer, Drosha, Ago2 (eIF2C) e TRBP2. Para avaliar a Dicer (216kDa) e Drosha (160kDa) foram necessárias modificações comparadas as outras proteínas avaliadas. Na transferência semi-seca o tempo foi de 3 horas e 30 minutos, por 20V. Na transferência molhada o tempo foi de 15 horas, por 20V, em constante agitação e à 4°C. Em seguida, ambas as técnicas procederam a um bloqueio com BSA 5% overnight (em torno de 12 horas). E em ambas, o tempo de incubação dos anticorpos primários de interesse foi em torno de 12 horas, a uma diluição de 1:500 (para as membranas de transferência semi-seca) e de 1:1000 (para as membranas de transferência molhada). A revelação por método colorimétrico não é o mais adequado para avaliar essas proteínas, contudo foi a única opção haja visto não se ter outro kit ou reagentes e equipamentos para uma análise por quimio-luminescência. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras abaixo.

Foi possível observar a presença da proteína Dicer nas amostras de controle positivo e MDA-MB231. Para a proteína Drosha foi possível ver a sua presença na amostra de controle positivo. A **Figura 11** e **12** são os resultados das membranas de PVDF após a revelação por método colorimétrico referentes ao anticorpo Dicer e Drosha, respectivamente, utilizando a transferência molhada. A **Figura 13** é o resultado da membrana de PVDF após a revelação por método colorimétrico tendo sido utilizado a técnica de transferência semi-seca nas condições descritas na metodologia. Devido a estas proteínas serem relativamente grandes (216KDa e 160KDa), infere-se que a técnica de western blot para com estas deve ser realizada com uma transferência molhada, pois se mostrou mais adequada, e com um método de revelação mais sensível que o colorimétrico.

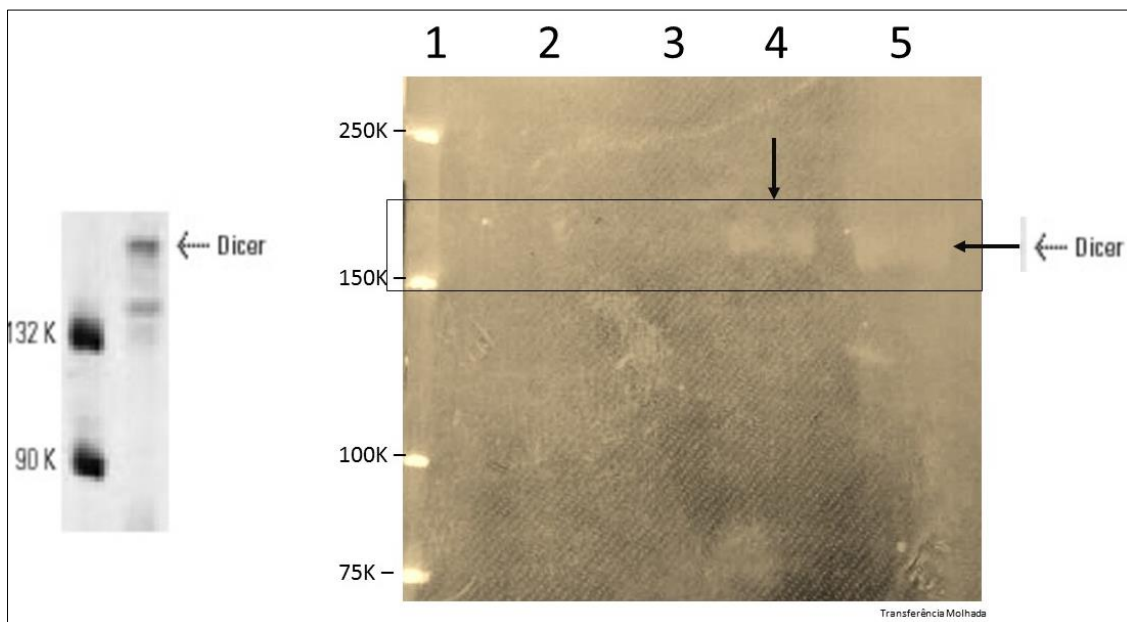


Figura 11. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Dicer (216KDa) nas amostras de interesse. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. As proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. Revelação por kit colorimétrico. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

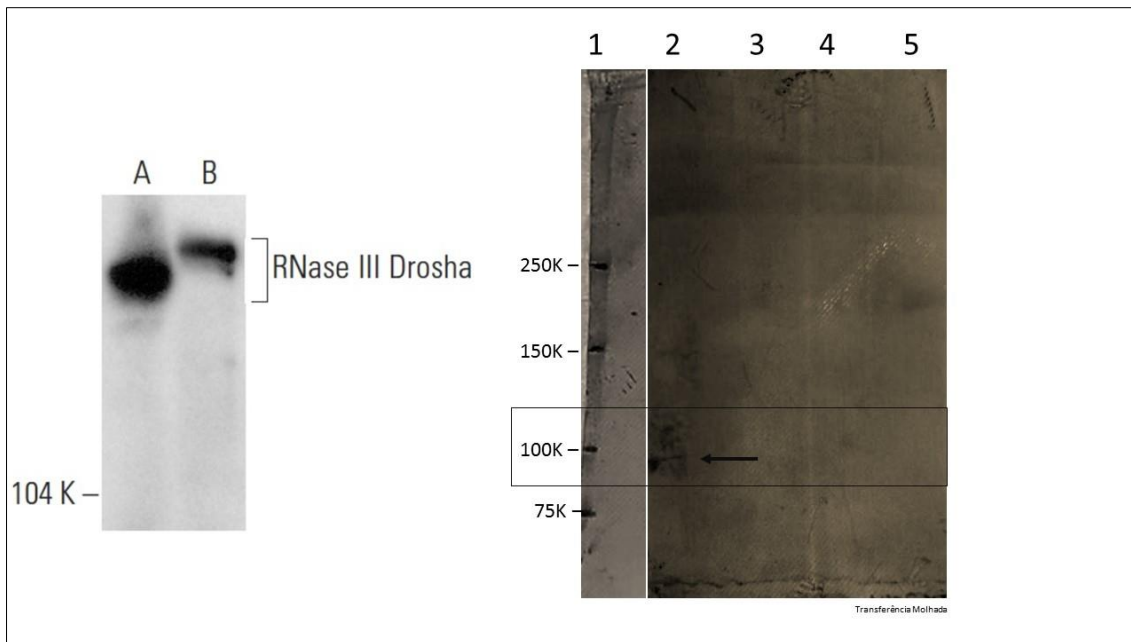


Figura 12. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Drosha (160KDa) nas amostras de interesse. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. As proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. Revelação por kit colorimétrico. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

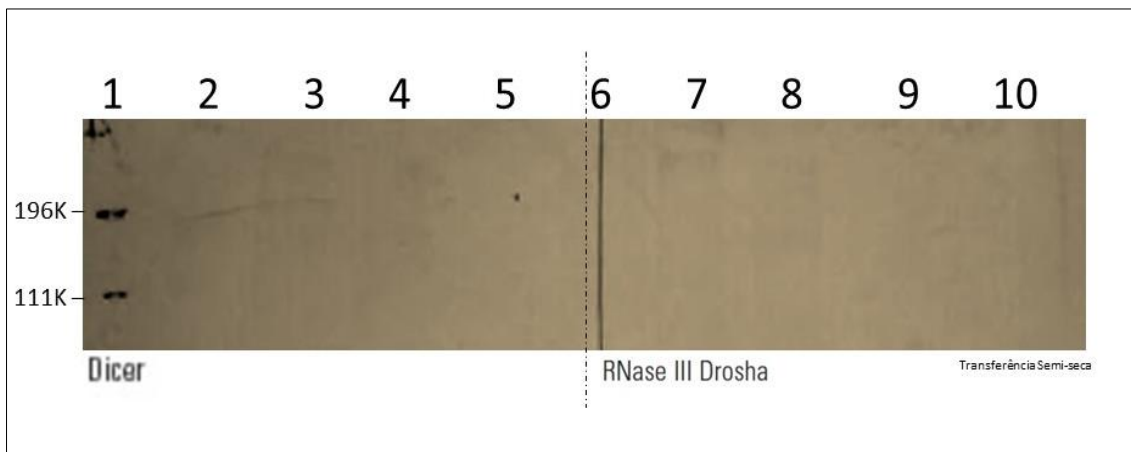


Figura 13. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Dicer (216KDa) e Drosha (160KDa) nas amostras de interesse. As proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. Revelação por kit colorimétrico. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231. Poço 6 – vazio. Poço 7– Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 8 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 9 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 10- 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

A proteína Ago2 (eIF2C2) está presente nas amostras de controle positivo, Fibroblasto humano e MDA-MB231, contudo na amostra não-tumoral de Fibroblasto humano, observa-se que a quantidade de proteína total que se ligou ao anticorpo Ago2 foi menor quando comparada a amostra tumoral MDA-MB231, e ambas partiram da mesma quantidade (20 μ g) de proteína total (**Figura 14**).

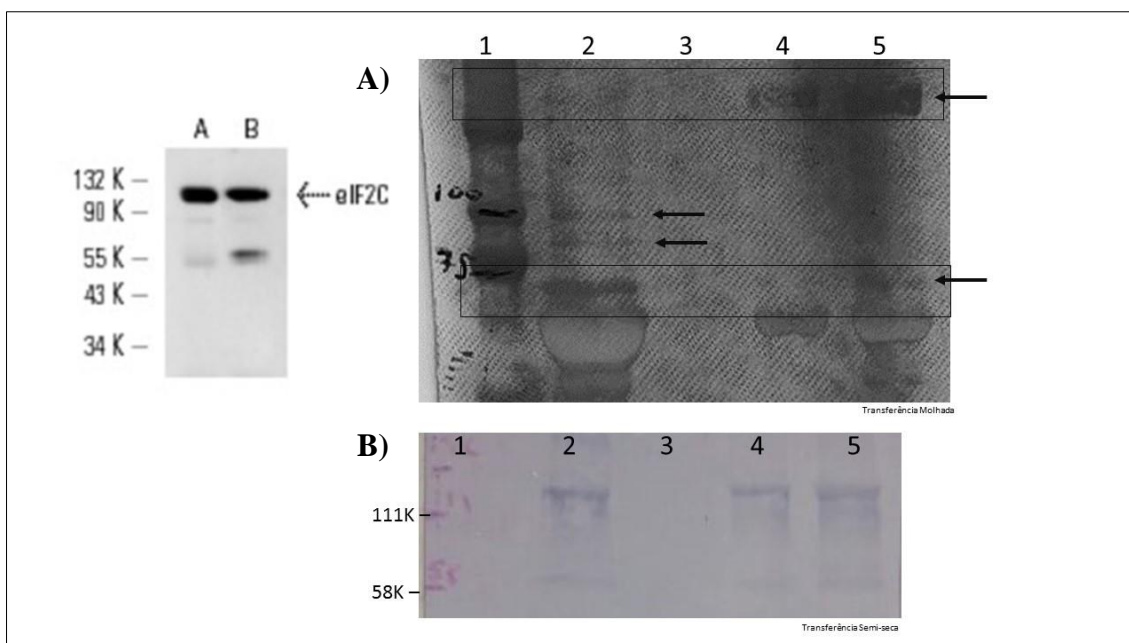


Figura 14. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Ago2 (eIF2C2 – 94KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231. Em B) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Para a proteína TRBP2 observa sua presença nas amostras de controle positivo, nas EV de Fibroblasto humano e nas EV de MDA-MB231, contudo, novamente, na amostra de EV não-tumoral de Fibroblasto humano, observa-se que a quantidade de proteína total que se ligou ao anticorpo TRBP2 foi menor (sinal mais fraco) quando comparada a amostra de EV tumoral MDA-MB231, e ambas partiram da mesma quantidade (20 μ g) de proteína total (**Figura 15**).

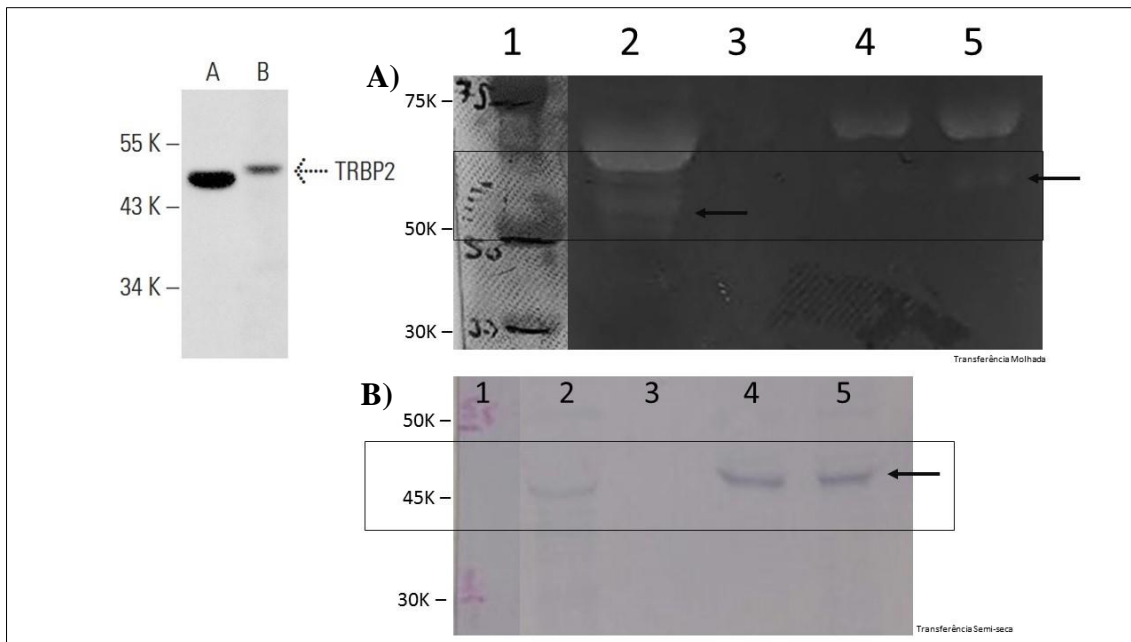


Figura 15. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo TRBP2 (45KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada da *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231. Em B) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

As proteínas marcadoras de vesículas extracelulares avaliadas aqui foram a TSG-101, Alix, CD63, CD9 e CD81. Para avaliar estas proteínas, realizou-se a transferência molhada por 1 hora, por 100V, em constante agitação e à 4°C. Também foi feita avaliação utilizando a técnica de transferência semi-seca por 30-45 minutos à 20V. Em seguida, ambas as técnicas procederam a um bloqueio com BSA 5% overnight (em torno de 12 horas). E em ambas, o tempo de incubação dos anticorpos primários de interesse foi em torno de 12 horas, a uma diluição de 1:500 (para as membranas de transferência semi-seca) e de 1:1000 (para as membranas de transferência molhada). A revelação da membrana foi feita por método colorimétrico. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras abaixo.

Em relação a proteína TSG-101 (46KDa) avaliada, a qual faz parte do grupo de proteínas de síntese de MVB, como a Alix, os resultados podem ser observados na **Figura 16**, que mostra as membranas de PVDF após a revelação por método colorimétrico tendo

sido utilizado a técnica de transferência molhada nas condições descritas na metodologia e transferência semi-seca. Para a proteína TSG-101 (46KDa) foi possível observar a presença na amostra de controle positivo da membrana com transferência molhada, bem como na amostra de EV de MDA-MB231 (**Fig.16A**, indicado por setas pretas). Na membrana da transferência semi-seca, é possível observar a proteína na amostra de EV de fibroblasto humano, apesar do sinal fraco da mesma, e, na amostra de EV de MDA-MB231 (**Fig. 16B**, indicado por seta preta).

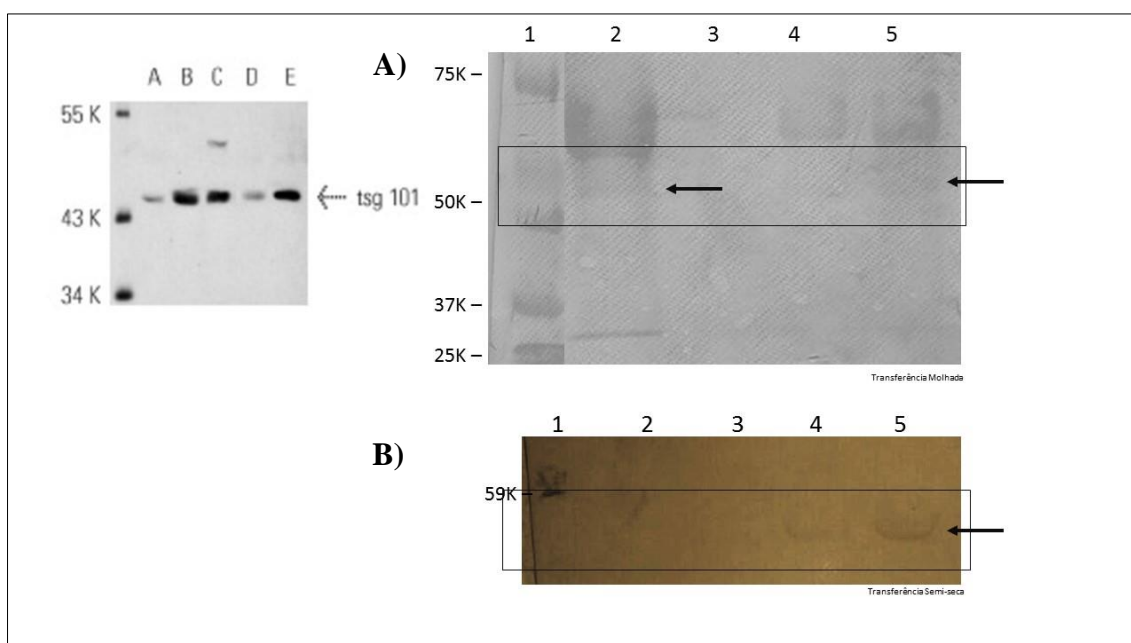


Figura 16. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo TSG101 (45KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada da *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231. Em B) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Para a proteína Alix foi possível observar a presença da proteína nas amostras de controle positivo, nas EV de Fibroblasto humano e nas EV de MDA-MB231 (**Figura 17**). Entretanto, mais uma vez, na amostra de EV não-tumoral de Fibroblasto humano, observa-se que a quantidade de proteína total que se ligou ao anticorpo Alix foi menor (sinal mais fraco) quando comparada a amostra de EV tumoral MDA-MB231, e ambas partiram da mesma quantidade (20 μ g) de proteína total.

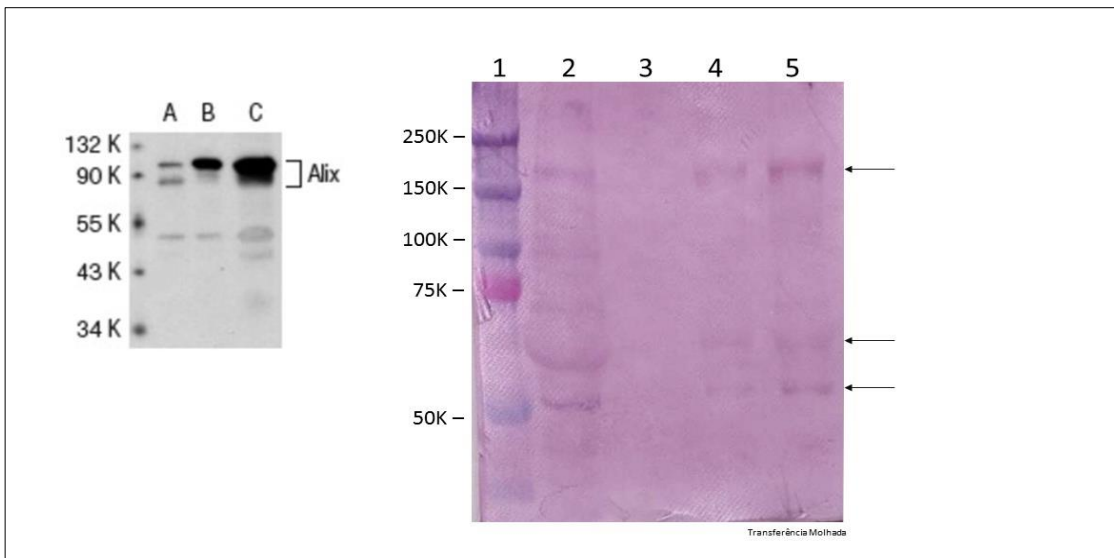


Figura 17. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Alix (95KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20µg de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20µg de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Em relação as tetraspaninas avaliadas, testamos 3 tipos dessas proteínas de superfície presentes em uma variedade de vesículas extracelulares. Os resultados podem ser observados nas próximas figuras, que mostram as membranas de PVDF após a revelação por método colorimétrico, tendo sido utilizado a técnica de transferência molhada nas condições descritas anteriormente.

Para a proteína CD63 (30-60KDa) foi possível observar a presença apenas nas amostras de controle positivo e na de EV de MDA-MB231 (**Figura 18**, indicado por setas pretas). Para a proteína CD9 (24KDa) e CD81(22-26KDa) foi possível observar um rastro no nível de sinal do tamanho dessas proteínas, contudo o sinal não foi satisfatório (**Figura 19**).

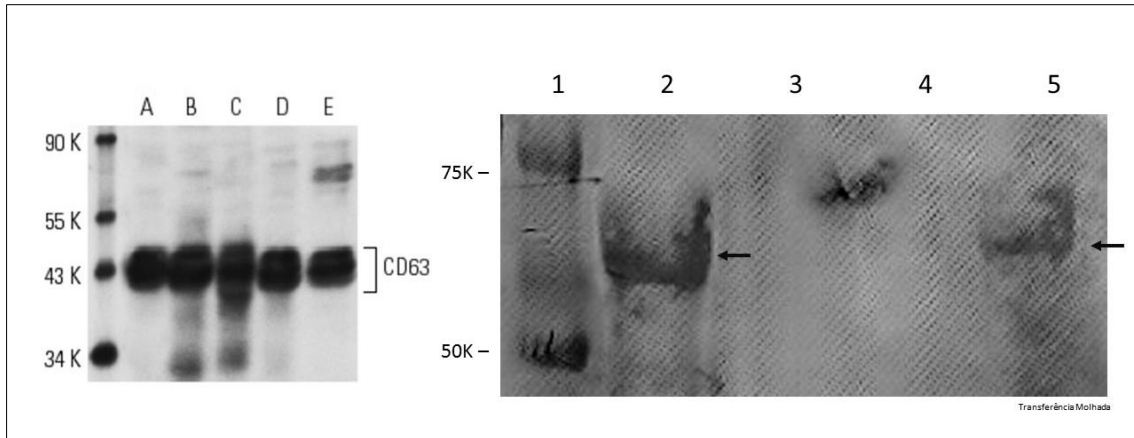


Figura 18. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo CD63 (60KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

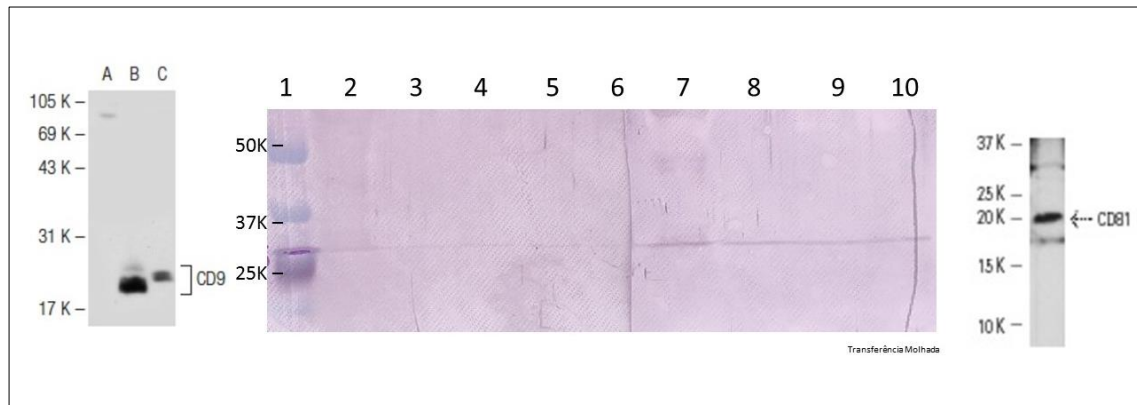


Figura 19. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo CD9 (24KDa) e CD81(22-26KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231. Poço 6 – vazio. Poço 7– Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 8 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 9 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 10- 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

A Calnexina foi utilizada como controle negativo para contaminação celular. O resultado observado permitiu identificar a presença de bandas de proteínas apenas no controle positivo do pellet celular de MDA-MB231, como esperado (**Figura 20**).

Portanto, observa-se que não há contaminação, ou ela é mínima ao ponto de não ser detectada para as amostras de EV de interesse do estudo.

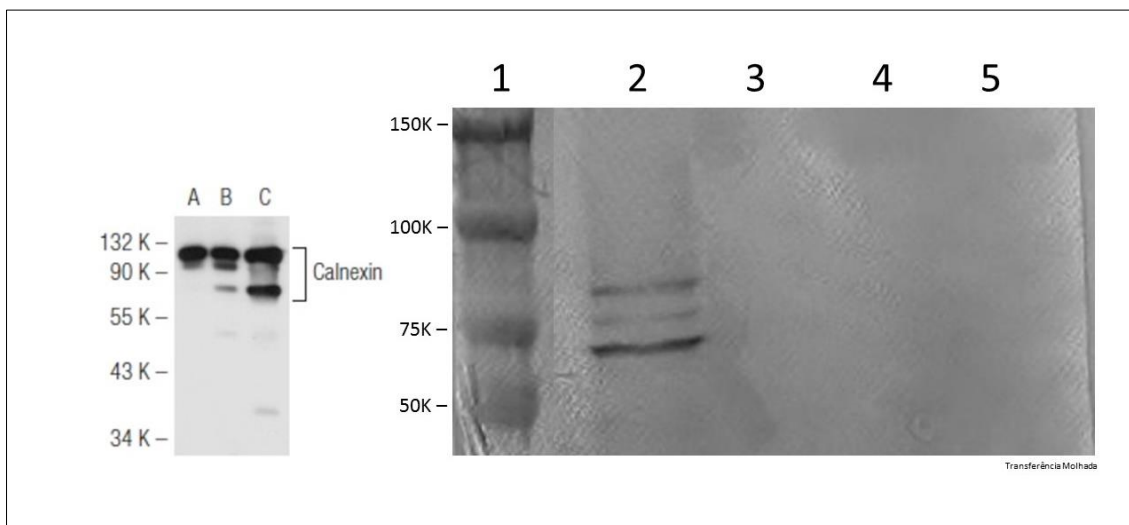


Figura 20. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo Calnexina (90/80/75 KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. Em A) as proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência molhada. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 4 - 20µg de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20µg de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Além das proteínas acima avaliadas, outras 3 proteínas associadas ou à processos tumorais ou que podem facilitar a migração celular, invasão e proliferação no desenvolvimento de tumores foram averiguadas. Avaliou-se, portanto, as proteínas IL-6 (relacionada com as cascatas de inflamação), ApoA-IV (relacionada ao colesterol da membrana) e AQP2 (relacionada com o transporte de água intracelular e extracelular).

Para identificar estas proteínas, realizou-se a transferência semi-seca por 35 minutos à 20V. Em seguida, foi feito o bloqueio com BSA 5% overnight (em torno de 12 horas). E o tempo de incubação dos anticorpos primários de interesse foi em torno de 12 horas, a uma diluição de 1:500. A revelação da membrana foi feita por método colorimétrico. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras abaixo.

Na **Figura 21**, observa-se a presença da proteína apoA-IV (46KDa) no poço 3 - referente ao controle positivo pellet celular de MDA-MB231-, no poço 4 - referente à amostra de EV de Fibroblasto humano-, e no poço 5 - referente à amostra de EV de MDA-MB231 (indicadas pela seta preta). Infere-se do resultado observado que a amostra

tumoral apresentou o sinal mais forte de ligação ao anticorpo apoA-IV, quando comparado as outras.

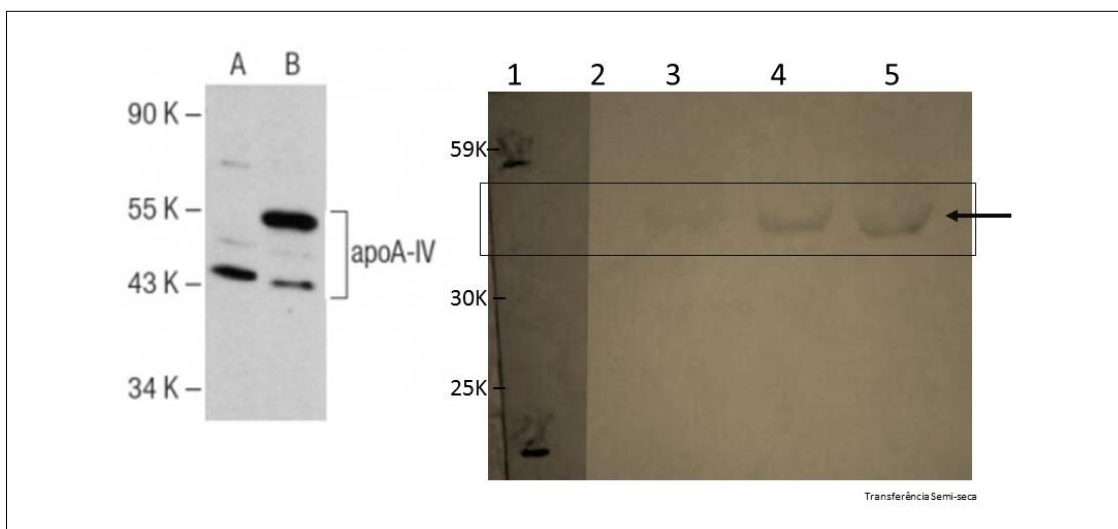


Figura 21. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo apoA-IV (46 KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. As proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 3 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 4 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20 μ g de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Na **Figura 22**, observa-se a presença da proteína AQP2 (29 KDa) no poço 3 - referente ao controle positivo pellet celular de MDA-MB231-, no poço 4 - referente à amostra de EV de Fibroblasto humano-, e no poço 5 - referente à amostra de EV de MDA-MB231. Mais uma vez, observa-se que na membrana a amostra tumoral apresentou o sinal mais forte de ligação ao anticorpo AQP2, quando comparado as outras.

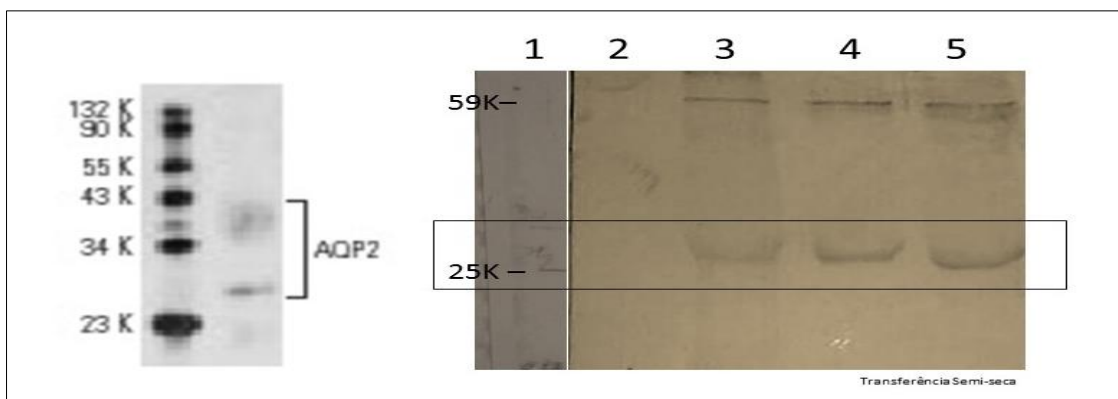


Figura 22. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo AQP2 (29 KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. As proteínas totais foram transferidas

para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Marcador molecular Precision Plus Protein Standarts (BioRad); Poço 2 – Controle Negativo PBS1 x; Poço 3 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 4 - 20µg de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 5 - 20µg de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Por último, na **Figura 23**, observa-se a presença da proteína IL-6 (21KDa) no poço 2 - referente ao controle positivo pellet celular de MDA-MB231-, no poço 3 - referente à amostra de EV de Fibroblasto humano-, e no poço 4 - referente à amostra de EV de MDA-MB231 (indicado pela seta preta). Inference do resultado observado na membrana que a amostra tumoral apresentou o sinal mais forte de ligação ao anticorpo IL-6, quando comparado as outras.

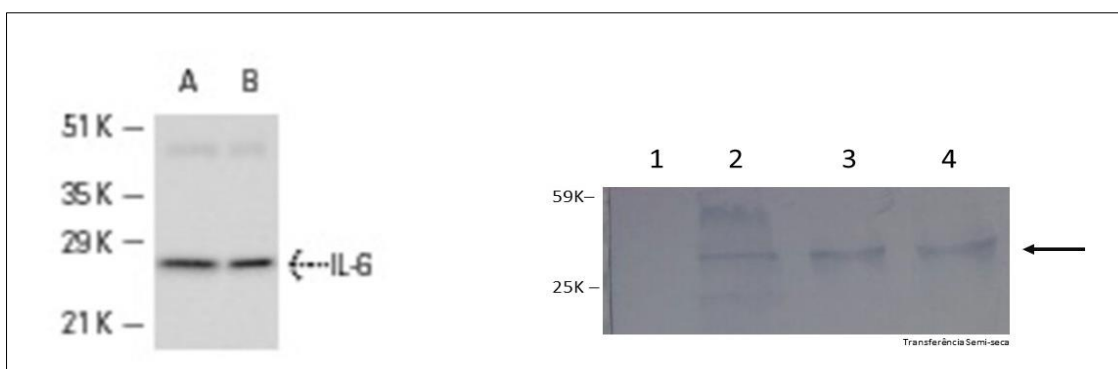


Figura 23. Resultado após revelação da membrana de PVDF da análise do anticorpo IL-6 (21 KDa) nas amostras de interesse. Revelação por kit colorimétrico. Ao lado, imagem retirada do *datasheet* do fabricante referente ao anticorpo analisado. As proteínas totais foram transferidas para a membrana por meio da técnica de transferência semi-seca. No poço 1 – Controle Negativo PBS 1x; Poço 2 – Controle positivo de pellet celular MDA-MB231; Poço 3 – 20µg de proteína total da amostra de EV de Fibroblasto Humano; Poço 4 - 20µg de proteína total da amostra de EV de MDA-MB231.

Por fim, vimos que foi possível identificar a presença em ambas as amostras provenientes das EV de 500ml de sobrenadante de cultura celular de fibroblasto humano e MDA-MB231, as proteínas Dicer, Ago2 e TRBP2, pertencentes a maquinaria de processamento de miRNA, o que nos sugere um papel para essas moléculas na biologia tumoral a ser investigado com mais vigor, inclusive em outras células ainda não investigadas para constatação dos achados deste trabalho. Além disso, foi possível detectar outras 3 proteínas (ApoA-IV, AQP2 e IL-6) ainda não discutidas pela literatura em vesículas extracelulares das linhagens estudadas, as quais estão associadas ao microambiente tumoral na sinalização do miRNA.

5.8. ESPECTROMETRIA DE MASSA

A partir do processamento das bandas visíveis pelo protocolo padrão, foi realizado o sequenciamento de pequenas regiões de peptídeos por espectrometria de massa (MS) de 10 amostras referentes a tamanho das bandas em quilodaltons das proteínas de interesse. Esta técnica é uma poderosa ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. Nela, alguma forma de energia é transferida à amostra para causar a sua ionização. O requisito básico para uma análise por MS é a formação de íons livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método é ditado pelo processo de ionização. Durante a aquisição dos dados, a energia de colisão é dinamicamente alterada entre um baixo e um alto valor. Isso produz de forma alternada espectros de massa dos íons intactos e os respectivos espectros de fragmentação de todos os íons precursores, além de perdas neutras. Todas essas informações são adquiridas em uma única análise.

Como resultado do MS, não foi possível realizar leitura dos picos de peptídeos que foram obtidos após clivagem com tripsina, associada ao tamanho equivalente as moléculas de interesse (Dicer, Drosha, Ago2, TRBP, bem como CD63, CD9, Alix), e, portanto, não foi possível realizar o MS/MS (**Figura 24**). Observa-se a presença de ruídos e picos com intensidade não equivalente para o MS/MS. Dentre as problemáticas, relaciona-se à obtenção das amostras por SDS-Page unidimensional após excisão de parte do gel nos tamanhos de interesse.

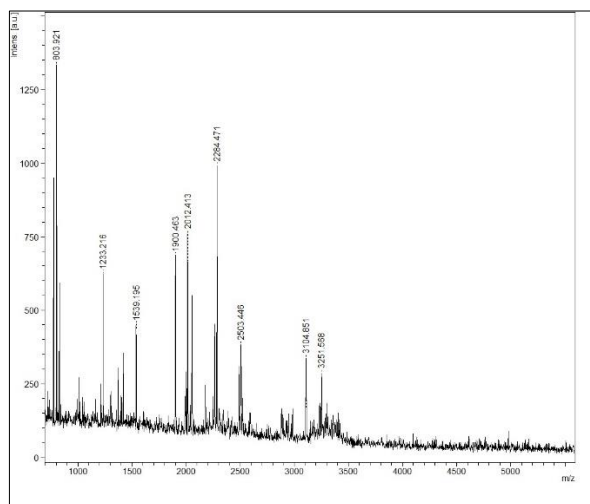


Figura 24. Espectros gerados pela espectrometria de massa de uma amostra analisada, o qual se observa baixa intensidade de sinal que não permite realizar o MS/MS. No eixo x, estão os valores da massa por carga (m/z). No eixo y estão os valores da intensidade (a.u).

6. DISCUSSÃO

As vesículas extracelulares foram primeiramente identificadas na metade do século passado, todavia apenas recentemente observamos um crescente interesse nas possíveis funções dos processos fisiopatológicos (WOLF et al., 1967; VALLABHANENI et al., 2015). Nota-se um crescente interesse quanto ao papel desses miRNA provenientes das EV, especialmente no contexto do câncer (OHSHIMA et al., 2010, PENFORNIS et al., 2016). Esta ideia é reforçada pela identificação de miRNA provenientes de EV frequentemente observado em culturas *in vitro* de várias linhagens celulares tumorais, bem como em fluídos biológicos, como sangue e urina, de pacientes oncológicos. Para tanto, muitos estudos têm se dedicado em compreender o microambiente tumoral e o papel dessas partículas.

Em 1980, Poste e Nicolson, relataram a produção espontânea de EV na linhagem de melanoma murino altamente metastática, a B16-F10. Além disso, eles evidenciaram a capacidade dessas partículas de estimular o potencial metastático da B16-F1, que é uma linhagem de melanoma murino menos agressiva (POSTE e NICOLSON, 1980).

Outro dado interessante é em relação ao material transportado pelas EV, como visto na literatura, este material pode definir a função apresentada pela EV. Ou seja, as EV parecem ser dependente do conteúdo que transportam. Este conteúdo depende do tipo celular pelo qual foi originado (MURALIDHARAN-CHARI, 2010) e ainda no caso de ensaios *in vitro*, depende das condições de cultivo das células (CHOI DS et al., 2015). Como já descrito, as EV podem transferir seus conteúdos para uma célula alvo. A célula receptora pode apresentar novas funções após receber o conteúdo das EV (D'ASTI et al., 2016)

Atualmente, se sabe que as EV possuem um papel fisiopatológico já descrito em relação à capacidade moduladora nas células, especialmente por células tumorais, como a transferência horizontal de ácidos nucleicos (SKOG J et al., 2008), a liberação de citocinas e metaloproteinasas (O'DRISCOLL L, 2015), receptores de fatores de crescimento (AL-NEDAWI et al., 2008; AL-NEDAWI et al., 2009), a transferência de receptores entre as células e o desempenho de funções específicas no processo de angiogênese (CAMUSSI G et al., 2010; MITTELBRUNN M et al., 2011), entre outras moléculas bioativas (ANTONYAK et al., 2011).

Também foi observado o ganho de fenótipo transformado por outros tipos celulares normais quando em presença de EV tumorais. Antonyak et al., 2011 demonstraram que

microvesículas derivadas de células tumorais induzem a transformação por meio da transferência de transglutaminase e de fibronectina tecidual para células receptoras. Outros estudos avaliaram o sobrenadante de culturas celulares e mostraram um aumento significativo de EV provenientes de glioblastoma multiforme, tumores mamários e melanomas (SKOG J et al., 2008; PEINADO H et al., 2012; SUETSUGU A et al., 2013).

Compreende-se que o mRNA e miRNA carregados pelas EV auxiliam na comunicação entre as células e agem, especialmente, no microambiente tumoral (KASTELOWITZ N, YIN H, 2014). O desempenho dessa sinalização é muito importante para a regulação das funções biológicas de células distantes (IPAS H, GUTTIN A, ISSARTEL JP, 2015). Estudos diversos relataram que linhagens tumorais de câncer de mama apresentam EV que carregam muitos tipos de miRNA comparados a células normais (PALMA J, YADDANAPUDI SC, PIGATI L, et al., 2012; MELO et al., 2014).

Em conjunto, esses resultados indicam uma significativa implicação das EV e seus componentes na capacidade de agressividade entre as diferentes populações de células. Assim, é possível questionar que os componentes da maquinaria de processamento de miRNA poderiam estar fortemente associados às EV tumorais de fenótipo mais agressivo. A fim de examinar essa questão, avaliamos os componentes proteicos presentes nas EV provenientes de duas linhagens celulares, a MDA-MB231 – que é uma linhagem agressiva de câncer de mama -, e a Fibroblasto humano - que é uma linhagem não tumoral, proveniente de células derivadas da pele de doadores saudáveis-.

Nossos resultados demonstraram que as linhagens celulares cultivadas MDA-MB231 e fibroblasto humano apresentaram-se viáveis e com boa morfologia ao longo do tempo compreendido entre 0h até o tempo final de coleta de 72h. Em concordância com a literatura, a quantidade de células presentes corrobora com a quantidade de diversos outros grupos, que trabalharam a partir de 15-30 milhões de células (CONDEVANCELLS et al, 2008). Théry C et al., 2006 citou que a quantidade é baixa de exossomos obtida da maioria das células cultivadas. Coppieters et al., 2009 e Segura et al., 2005 apresentaram que em até 24 horas foi possível obter 0,3 a 0,5 µg de exossomos por 10⁶ células dendríticas. Théry et al., 2006 cita que em linhagens celulares de murino a quantidade obtida é similar. Contudo, eles também demonstraram que a quantidade de exossomos produzida e secretada pelas células provenientes de linhagens de mastocitoma de murino é muito pouca. Van Niel et al., 2003 conseguiu menos quantidade ainda trabalhando com EV de linhagem celular de adenocarcinoma intestinal. Considera-se

como estimativa geral o valor de $\sim 0,1 \mu\text{g}$ por 10^6 células, como sendo a quantidade aproximada de exossomos produzido por células (THÉRY et al., 2006).

Quanto a quantidade ou volume necessário para extrair vesículas extracelulares de cultura celular, Gardiner et al., 2016 realizou um levantamento detalhado das atuais práticas mundiais utilizadas para identificar qual o material biológico, quantidade, qualidade e métodos utilizados pelos diversos grupos que são membros do ISEV (International Society for Extracellular Vesicles). Eles mostraram que para cultura celular, 96% dos que responderam ao questionário, utilizam volume inicial maior que 100 ml. Vallabhaneni et al., 2015 sugere trabalhar com o volume de coleta superior a 100 ml por linhagem celular a ser investigada. Seguindo as recomendações dos diversos trabalhos publicados, partiu-se de um volume de 500ml de sobrenadante de cultura celular para realizar as purificações das EV dos sobrenadantes das linhagens celulares, utilizando, para tanto, apenas o método de ultracentrifugação diferencial. Isto porquê não houve recursos financeiros para a realização de outros métodos combinados.

É de bom grado suscitar que na literatura ainda não está totalmente estabelecido um protocolo para isolar as EV. A centrifugação diferencial ainda é um método difícil, devido as distribuições de tamanho e as diferenças de populações das EV. Entretanto, apesar de não ter sido feito aqui, a utilização de outros métodos combinados com a centrifugação diferencial é altamente recomendada por diversos grupos (RAPOSO G, NIJMAN HW, STOORVOGEL W. et al., 1996; THÉRY et al., 2006; GARDINER et al., 2016; NAKASE I, NOGUCHI K, FUJII I, 2016).

Em geral, os métodos de isolamento e análise são centrifugação diferencial, seguido de ultracentrifugação em gradiente de densidade utilizando sacarose, com até 100.000g (RAPOSO G, STOORVOGEL W, 2012; KRUGER S et al., 2014; THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G et al., 2006) ou reagentes comerciais, como ExoQuick™ (Biosystems). Existem contradições quanto ao uso da centrifugação em relação ao tempo, a força, o número de ciclos e outros. Outro indicador é a vasta distribuição do tamanho das EV. Alguns protocolos indicam e sugerem fazer a filtração da amostra usando membrana de poro de $0,2\mu\text{m}$ no caso de sobrenadantes celulares, para a remoção de células e debris (COCUCCI e MELDOLESI, 2015; GYÖRGY B et al., 2011; THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, 2006). No entanto, uma rápida filtração pode levar a fragmentação das vesículas, e para evitar este problema, recomenda-se a filtração por gravidade sugerido por GYÖRGY B et al., 2011. Alguns tipos de centrifugações aplicam 200 a 1500g para remover restos celulares, 10.000 a 20.000g para sedimentar e isolar

vesículas maiores que 100nm; e 100.000 a 200.000g para isolar vesículas menores que 100nm sem passar pela etapa de filtração (VAN DER POL et al., 2012).

Muitos grupos relatam a dificuldade tida quanto ao processamento inicial para se obter purificações das EV eficientemente. Por exemplo, o grupo de Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C (2014), realizaram uma análise proteômica, cujo fluxo de trabalho para a purificação e análise das EV foram feitas em somente uma única etapa, sem processo de congelamento e descongelamento, a fim de evitar comprometer a estrutura das proteínas das EV. Outros grupos também relatam o uso combinado de técnicas para adquirir partículas de boa qualidade (b. CVJETKOVIC A, 2014; c. GREENING DW et al., 2015; LANE RE et al., 2015; LOBB RJ, BECKER M, SHU WEN, 2015; TAYLOR DD, SHAH S 2015; ZAROVNI N et al., 2015).

Recentemente, a tese de Jojoa DEJ (2017), com dados ainda não publicados, comparou os métodos de purificação de microvesículas. Dentre eles, estão ExoQuick™, kit Total Isolation, Ultrafiltração, Ultracentrifugação e Cromatografia de exclusão pelo tamanho. Os experimentos da autora partiram de amostras de 5ml de soro purificado de sangue humano, o qual é rico em vesículas extracelulares, diferentemente do que se sabe sobre quantidade de EV em sobrenadantes de cultivo celular. Os resultados obtidos pela autora revelaram que a ultracentrifugação foi entre os métodos comparados, o que apresentou menor integridade das EV, bem como menor quantidade lida de partículas no sistema qNANO. A autora relata que a utilização do ExoQuick™ e a ultrafiltração são, entretanto, as melhores opções pois apresentaram melhor qualidade e integridade do material, além de maior contagem de partículas utilizando o sistema qNANO. Portanto, infere-se que a escolha pela ultracentrifugação como método de obtenção de EV de sobrenadantes celulares pode ter causado perda na qualidade e integridade das partículas, consequentemente interferindo no restante das análises realizadas neste presente trabalho.

De qualquer modo, após a purificação por ultracentrifugação, investigamos se as partículas isoladas por esta técnica apresentavam tamanho e concentração de exossomos e microvesículas, ou seja, de vesículas extracelulares. Para tanto, em relação a análise das partículas purificadas, quanto a distribuição do tamanho e a concentração das vesículas presentes em determinado fluido biológico, muitos estudos utilizam o rastreamento de nanopartículas pelo instrumento NanoSight, o qual utiliza propriedades de espalhamento de luz das partículas em um meio fluido. Contudo, aqui neste trabalho foi utilizado a técnica de resistência de pulso elétrico pela sistema qNANO.

Maas, Vrij e Broekman (2014), descreveram um protocolo padrão utilizando a técnica de resistência de pulso elétrico (sistema qNANO). A técnica é relativamente rápida e utiliza pequenos volumes de amostra. Os critérios para classificar e identificar as partículas extracelulares foram observados na distribuição do tamanho das partículas lidas, cujo tamanho lido variou entre 103 e 121nm. Este dado caracteriza as partículas extracelulares do tamanho compreendido por exossomos e microvesículas. Depreende-se que as EV provenientes do sobrenadante das culturas celulares foram adequadamente purificadas utilizando o método de ultracentrifugação diferencial como realizado por Théry et al, 2006 e Melo et al., 2014, e adaptado aqui no nosso estudo.

Interessantemente, as EV provenientes da linhagem celular tumoral apresentaram maior rapidez na contagem de partículas e maior concentração do que a linhagem celular não-tumoral. Este fato pode ser relacionado com os achados referentes a maior quantidade de EV secretada pelas células tumorais, especialmente as mais agressivas, em comparação com as menos agressivas ou não tumorais (THÉRY et al., 2006).

Corroborando com estes achados, estudos recentes indicam um aumento no nível de EV no plasma de pacientes com adenocarcinoma de pulmão e melanoma quando comparados a normais (BRYANT et al., 2012). Lima (2012) demonstrou uma maior quantidade de microvesículas trabalhando com linhagem de melanoma. Tal constatação também tem sido sugerida por outros pesquisadores em diferentes modelos tumorais (LIMA, 2012; GINESTRA et al., 1998; TAYLOR DD, TAYLOR CG, JIANG CG et al., 1988). De fato, estudos recentes avaliaram a presença de oncogenes mutantes, como o K-Ras (YU JL, MAY L, LHOTAK V et al., 2005) e EGFRvIII (AL-NEDAWI et al., 2008), e supressores de tumor, como o p53 (YU JL, MAY L, LHOTAK V et al., 2005), os quais são capazes de estimular a secreção de EV pelas células (LEE TH, CHENNAKRISHNAIAH S, RAK J, 2015).

Após a caracterização das partículas extracelulares pelo sistema qNANO, foi realizado a extração de proteínas totais por meio de sonicação, utilizando um coquetel de inibidores de proteases (PIC) para proteger o material de degradação proteica. Para quantificar as proteínas totais obtidas foi usado o método de Bradford. O método de Bradford apresentou uma concentração de proteína total de 5,7 e 9,82 mg/ml provenientes de 400µl de amostra purificada de fibroblasto humano e MDA-MB231, respectivamente, e de 15,59 e 18,42 mg/ml provenientes de 500µl de amostra purificada de fibroblasto humano e MDA-MB231, respectivamente. A quantificação das proteínas totais mostrou que a linhagem celular MDA-MB231, que é invasiva e metastática, apresentou maior

quantidade de proteínas totais mensurada, do que a linhagem não tumoral de Fibroblasto humano, que apresentou o menor valor mensurado.

Estes dados correlacionados com o SDS-PAGE unidimensional confirmaram a presença de proteínas totais provenientes de 400 e 500µl de EV purificadas a partir de um volume de 500mL de sobrenadante de cultura celular das linhagens celulares MDA-MB231 e de Fibroblasto humano. A partir da confirmação da presença das proteínas totais das EV nas linhagens celulares, foram então iniciadas as verificações dos anticorpos de interesse nestas amostras utilizando a técnica de western blot. A literatura em geral não informa a quantidade de proteína total obtida nas amostras de EV de acordo com o volume de sobrenadante purificado. Para realizar a técnica de western blot, alguns autores citam utilizar de 20-30µg de proteína total por poço (THÉRY et al., 2006; FISKAA T et al., 2016).

Das amostras analisadas, foi possível identificar as proteínas de vesículas extracelulares, como a TSG-101, Alix e uma entre as tetraspaninas. Devido a não se ter marcadores específicos para as EV, estudos que avaliam a presença de exossomos e microvesículas, utilizam proteínas conhecidas por estarem presentes nestas partículas em abundância. A ISEV sugere que se demonstre a presença de pelo menos alguns tipos de proteínas. Entre elas estão: as tetraspaninas (em exemplo, CD9 e CD63), proteínas associadas ao citoesqueleto (em exemplo, ezrina), proteínas envolvidas na biogênese dos MVB (em exemplo, Alix), e pelo menos uma proteína citosólica ou uma proteína de ligação a membrana (em exemplo, TSG-101), pois estão enriquecidas ou presentes nos exossomas/microvesículas. Por outros compartimentos celulares poderem produzir vesículas extracelulares, é recomendado determinar a presença/ausência de proteínas destes compartimentos, como é o caso do retículo endoplasmático (em exemplo a Calnexina e Grp78), e do aparelho de Golgi (em exemplo o GM130). Portanto, a ausência dessas proteínas nas amostras provenientes de EV indicam nenhuma ou pouca contaminação celular. Neste trabalho foi possível confirmar a proteína Calnexina presente apenas no controle positivo.

Em relação as outras 3 proteínas testadas (ApoA-IV, Il-6 e AQP2), basicamente os testes foram realizados para observar a presença destas proteínas no material das EV purificadas a fim de se constatar a qualidade de proteína total obtida e também para confirmar a presença desses anticorpos utilizando o método de western blot descrito. De modo sucinto, essas 3 proteínas têm funções distintas e pouco se sabe delas em relação a

sua presença em EV em sobrenadantes de linhagens celulares, especialmente em linhagens tumorais.

A maquinaria de processamento de um miRNA das EV parece estar particularmente associada a quantidade de EV secretada pelas células e o tipo celular. No que concerne a este assunto, Papachristou DJ et al., 2011 identificou a presença de Dicer, Drosha e Ago2 nas linhagens celulares de DLD-1, HT-29, e Caco-2, que são células de câncer de cólon, e em pacientes com câncer de cólon utilizando sonda *SYBER green 1* por meio da técnica de PCR em tempo real, imunofluorescência e western blot. Contudo, os autores relataram que apesar da proteína Drosha ter sido detectada por imunofluorescência, eles não conseguiram detectar esta proteína via western blot. Além disso, os autores ainda relataram que os níveis celulares de Dicer e Ago2, conforme definido pelo western blot apresentou tamanho da banda desproporcional com seus níveis de mRNA. Eles descreveram que mesmo que os níveis de proteína de Dicer nas linhagens celulares de Caco2 e DLD-1 terem sido semelhantes, o nível de expressão do mRNA de Dicer foi menor na DLD-1, em comparação com o Caco2. Com relação a Ago2, sua proteína apresentou níveis menores na DLD-1 em comparação com o Caco2 e HT-29 (PAPACHRISTOU DJ et al., 2011). Estes dados reforçam a dificuldade vista em obter bons resultados nos western blot como foi proposto por este trabalho.

Nos anos seguintes, o grupo de Melo et al., 2014 publicou que avaliou alguns componentes específicos da maquinaria de processamento de miRNA em diversas linhagens celulares tumorais comparadas a linhagens não-tumorais. Para tanto, o grupo caracterizou as partículas utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica (*Light scattering spectroscopy*), além do NanoSight e citometria de fluxo. Para avaliar os miRNA presentes nas amostras e quantificar os principais, eles utilizaram da técnica de miRNA array e PCR em tempo real. A partir da análise dos miRNA, eles avaliaram os componentes da biogênese de um miRNA, incluindo a Dicer, Ago2 e TRBP, por western blot e por microscopia eletrônica de transmissão com marcação de ouro (imuno-ouro). O estudo indicou que a proteína Dicer foi detectada nos exossomos extraídos das linhagens tumorais MCF7, MDA-MB231, 67NR e 4T1. Contudo, ela não foi detectada nas linhagens normais (ausência tumoral). As proteínas Ago2 e TRBP também foram evidenciadas nas linhagens tumorais, mas não nas normais. A proteína Drosha não foi discutida (MELO et al., 2014).

Em paralelo, o grupo de SQUADRITO et al., 2014 evidenciou a presença de proteínas de processamento de miRNA provenientes de EV estudando as células

endoteliais e macrófagos. Eles utilizaram do kit ExoQuick-TC™ (System Biosciences, CA, EUA) e da ultracentrifugação para obter as EV, e realizaram uma avaliação do transcriptoma de miRNA por meio de sequenciamento do RNA (RNAseq), análise computacional, dentre outras técnicas específicas para avaliar os componentes em EV dessas células e de células modificadas, como as células deficientes em (“*Dicer-deficient cells*”) e em vetores de vírus repórter-lentiviral (“*reporter lentiviral vectors*”). Este estudo procurou compreender os mecanismos pelos quais os miRNA são selecionados para dentro de exossomos e o significado da transferência de miRNA para as células receptoras.

Em 2016, McKENZIE e colaboradores demonstraram que a ativação dependente de KRAS da via de sinalização MEK-ERK inibe a escolha/seleção de Ago2 e Ago2-dependentes de miRNA em exossomos. Esses dados indicaram um mecanismo molecular para a regulação da seleção de Ago2 e o carregamento de miRNA dentro dos exossomos. Ou seja, eles conseguiram observar que a Ago2 está presente dentro das EV de linhagens celulares tumorais. A proteína Argonauta (Ago) 2 é uma endonuclease, que se comporta como um componente-chave para o complexo RISC e pode degradar o mRNA diretamente por *slicing* (MEISTER, 2013). Recentemente, a literatura tem demonstrado que Ago2 se liga ao miRNA e geram um tipo de complexo Ago2-miRNA que estão sendo encontrados no meio extracelular, como uma proteína livre (ARROYO et al., 2011; RUSSO et al., 2012; TURCHINOVICH et al., 2011), entretanto, outros trabalhos identificaram a Ago2 e outros componentes do processamento de RNA em exossomos que foram secretados, como visto acima por Melo et al., 2014 e Squadrito et al., 2014.

Retomando ao trabalho de McKENZIE et al., 2016, eles utilizaram células tumorais de cólon modificadas para a expressão de KRAS (tipo selvagem - *wild-type*, WT^{DKs-8}, e, tipo mutante - Mut^{DKO-1}), estas células foram derivadas das células DLD1 – células tumorais de cólon. Este grupo utilizou da técnica de ultracentrifugação proposto por THÉRY et al., 2006 além de sedimentar as partículas por gradiente de densidade (5%-40% de iodixanol) e averiguaram pelo sistema do NanoSight e MET. Interessantemente, a linhagem mutante Mut^{DKO-1} apresentou maior contagem de partículas do que a linhagem selvagem WT^{DKs-8}. Além disso, o grupo estudou por western blot os exossomos provenientes da ultracentrifugação, e relatou que Ago2 e GW182 nos exossomos de Mut^{DKO-1} estão diminuídos em relação aos exossomos WT^{DKs-8}; e, que o mesmo se observou nos isolados celulares de Mut^{HCT-116} que estavam com baixos níveis de Ago2, comparados aos exossomos isolados da linhagem celular isogênica WT^{HKe-3}. O trabalho

não observou diferenças nos níveis de Dicer entre os exossomos provenientes das linhagens WT^{DKs-8} e Mut^{DKO-1}.

Em conformidade com a literatura apresentada, este trabalho conseguiu identificar a presença de Dicer, Ago2 e TRBP2 na linhagem celular tumoral MDA-MB231. Este dado reforça a presença de uma maquinaria de processamento de miRNA dentro das EV que foram liberadas no meio extracelular e estão presentes no sobrenadante celular da linhagem tumoral de câncer de mama. Infere-se que o volume de sobrenadante processado influenciou a obtenção desta constatação, uma vez que volumes menores não permitiram a identificação destas proteínas em testes realizados a priori, inclusive em linhagens celulares com características mais agressivas. Apesar dos resultados obtidos aqui não serem totalmente satisfatórios, mesmo utilizando materiais e equipamentos inferiores e de baixa resolubilidade, acredita-se que foi um imenso passo factível em resultados positivos, pois identificou-se as bandas das proteínas da maquinaria de processamento de um miRNA, entre outras proteínas.

É interessante discutir sobre a presença desses componentes dentro dessas partículas extracelulares. Em 2009, como citado anteriormente, Gibbins et al., identificou a presença de Ago2 apenas em baixas quantidades de isolados de exossomos derivados de monócitos. Alguns trabalhos apontaram identificar Ago2 no plasma, de forma associada a complexos de RNA e proteína que não são vesículas (ARROYO et al., 2011; TURCHINOVICH et al., 2011). O grupo de Melo et al. (2014), identificou a Ago2 em exossomos, mas não discutiu sobre os níveis da mesma. Já o grupo de McKenzie et al., 2016 como visto acima, conseguiu identificar a Ago2, contudo relata que os níveis detectáveis foram muito baixos, e eles justificam este fato pela regulação da sinalização estudada de MEK-ERK.

Por fim, COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C. (2014) sustentam que é complicado determinar os componentes ou marcadores moleculares específicos de diferentes tipos de EV. Eles citam a possibilidade de analisar e caracterizar as proteínas das EV via espectrometria de massa, isso porque os componentes são dependentes do tipo de vesícula que está sendo analisada, o tipo celular de origem e o tipo de centrifugação utilizada para purificar estas partículas.

Para tal, visando buscar e identificar os componentes da maquinaria de processamento de um miRNA e os componentes das vesículas extracelulares, foi realizada a técnica de espectrometria de massa acoplada (MS/MS) utilizando o equipamento AutoFlex Speed. O objetivo específico proposto era sequenciar pequenas

regiões de peptídeos por MS/MS. E daí, a partir do uso das pequenas sequências obtidas em conjunto com as informações de massas moleculares iríamos identificar as proteínas.

Para realizar a espectrometria de massa, foi realizado uma eletroforese com gel de poliacrilamida a 8%. Neste gel foi possível observar algumas amostras com bandas visíveis e maiores que 160 kDa. A partir deste, foi possível realizar pequenos cortes no gel, especificamente nas bandas visíveis com peso moleculares aproximados aos das proteínas de interesse avaliadas. Ao total, 10 amostras foram preparadas e analisadas. Contudo, não foi possível realizar a identificação das massas moleculares das proteínas das amostras processadas por MS/MS.

Observa-se que para a obtenção de bons resultados por meio de espectrometria de massa é necessário realizar uma boa preparação da sua amostra. Pré-tratamentos por meio de técnicas como Cromatografia Líquida (CL) de fase reversa e com a utilização de Amicon podem contribuir para melhores obtenções de espectros no MS. Portanto, sugere-se novos estudos a fim de se investigar essas partículas utilizando a tecnologia de espectrometria de massa com a técnica de CL que seja específica para o estudo de peptídeos provenientes de EV em sobrenadantes de células, bem como outros métodos mais sensíveis como um PCR quantitativo absoluto (plataforma digital PCR).

7. CONCLUSÕES

As vesículas extracelulares transportam diversas moléculas que estão associadas a regulação de células distantes. Os miRNA estão contidos nessas vesículas e tem papel importante na expressão gênica. No caso de células tumorais, a maquinaria de processamento de um miRNA presentes nas EV, aparentemente está relacionada com o grau de agressividade da célula.

De forma geral, os dados observados apresentaram a purificação de vesículas extracelulares a partir de um volume relativamente alto de sobrenadante de cultivo celular, e foi possível detectar a presença de proteínas relacionadas com a maquinaria de processamento de miRNA e também com componentes presentes na membrana dessas partículas extracelulares. Os achados quanto a detecção de proteínas relacionadas a maquinaria de processamento de miRNA em amostra tumoral de mama reforça que possivelmente tumores, e provavelmente os mais agressivos (outros estudos são necessários para verificar este fato), apresentam um sistema independente da célula para produzir seus miRNA. Além disso, foi possível identificar outras proteínas (ApoA-IV, IL-6 e AQP2) relacionadas ao processo tumoral, as quais ainda não foram descritas dentro das vesículas extracelulares de linhagens celulares anteriormente estudadas.

São sugeridos outros métodos, como PCR em tempo real, digital PCR ou uma nova abordagem por espectrometria de massa, para averiguar esses componentes proteicos e respaldar os achados demonstrados aqui neste trabalho. Contudo, vale ressaltar que a relevância fisiológica das EV tem sido difícil de se avaliar, pois sua origem, biogênese e mecanismos de secreção permanecem em parte desconhecidos. Os novos conceitos baseiam-se principalmente em dados moleculares e celulares *in vitro*, contudo há pouca evidência direta do papel das EV *in vivo*. Assim, são também necessários outros estudos para apurar as informações adquiridas em modelos *in vitro* e compará-las aos modelos *ex vivos*.

Conclui-se que a linhagem celular tumoral de mama MDA-MB231 apresenta proteínas da maquinaria de processamento de miRNA quando comparada à linhagem celular não tumoral de fibroblasto humano. Este resultado fornece indícios de que quanto mais agressivo for o tumor, melhor provavelmente será a sua capacidade de regular a cascata de sinalização via miRNA por vesículas extracelulares, para o complexo processo de microambiente tumoral, de crescimento e expansão tumoral.

8. REFERÊNCIAS

- AHARON A, REBIBO-SABBAH A, TZORAN I, LEVIN C. Extracellular Vesicles in Hematological Disorders. Brenner B, ed. Rambam Maimonides Medical Journal. 2014;5(4): e0032
- AL-MAYAH A, BRIGHT S, CHAPMAN K, IRONS S, LUO P, CARTER D, GOODWIN E, KADHIM M. The non-targeted effects of radiation are perpetuated by exosomes. *Mutat Res.* 2015; 772:38-45.
- AL-NEDAWI K, MEEHAN B, MICALLEF J, LHOTAK V, MAY L, GUHA A, RAK J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:619-624.
- AL-NEDAWI K, MEEHAN B, KERBEL RS, ALLISON AC, RAK J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:3794-3799.
- ANTONYAK MA, LI B, BOROUGHS LK, JOHNSON JL, DRUSO JE, BRYANT KL, HOLOWKA DA, CERIONE RA. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(12):4852-7
- ARROYO JD, CHEVILLET JR, KROH EM, RUF IK et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 22;108(12):5003-8
- ATCC. Disponível em www.atcc.org. Acesso em 02 dez 2016.
- BELLA E, TAYLOR MA. Functional Roles for Exosomal MicroRNAs in the Tumour Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J.* 2017; 15:8–13.
- BENNETT PE, BEMIS L, NORRIS DA, SHELLMAN YG. miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma. *Physiol Genomics.* 2013;15;45(22):1049-59.
- BLONDAL S, JENSBY NIELSEN S, BAKER A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods.* 2012;59: S1–6.
- BOYERINAS B, PARK SM, HAU A, MURMANN AE, PETER ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1): F19-36.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54

BRYANT RJ, PAWLOWSKI T, CATTO JW, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012; 14; 106(4):768-74.

CAMUSSI G, DEREGIBUS MC, BRUNO S, CANTALUPPI V, BIANCONE L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78(9):838-48.

CHENDRIMADA TP, GREGORY RI, KUMARASWAMY E, NORMAN J, COOCH N, NISHIKURA K, SHIEKHATTAR R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-4

CHERRADI N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6: 195.

CHEVILLET JR, KANG Q, RUF IK, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:14888-93.

CHIABOTTO G, BRUNO S, COLLINO F, CAMUSSI G. Mesenchymal Stromal Cells Epithelial Transition Induced by Renal Tubular Cells-Derived Extracellular Vesicles. Bussolati B, ed. *PLoS ONE*. 2016;11(7): e0159163.

CHIN AR, WANG SE. Cancer-derived extracellular vesicles: the 'soil conditioner' in breast cancer metastasis? *Cancer Metastasis Rev*. 2016; 35(4):669-676.

CHOI DS, KIM DK, KIM YK, GHO YS. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev*. 2015; 34(4):474-90.

CHOWDHURY R, WEBBER JP, GURNEY M, MASON MD, TABI Z, CLAYTON A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 2015; 6(2):715-31.

COCUCCI E, MELDOLESI J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(6):364-72.

COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2014; 30, 255–289.

CONDE-VANCELLS J, RODRIGUEZ-SUAREZ E, EMBADE N, GIL D, MATTHIESEN R, VALLE M, ELORTZA F, LU SC, MATO JM, FALCON-PEREZ JM. Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes *J Proteome Res*. 2008; 7(12): 5157–5166.

COPPIETERS K, BARRAL AM, JUEDES A, WOLFE T, RODRIGO E, THÉRY C, AMIGORENA S, VON HERRATH MG. No significant CTL cross-priming by

- dendritic cell-derived exosomes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol.* 2009; 15;182(4):2213-20.
- COSTA-SILVA B, AIELLO NM, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015; 17(6):816-26.
- CRESCITELLI R, LÄSSER C, SZABÓ TG, KITTEL A, ELDH M, et al. Distinct RNA profiles in sub-populations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2013;2
- a. CVJETKOVIC A, JANG SC, KONEČNÁ B, et al. Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles—Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Scientific Reports.* 2016; 6:36338.
- b. CVJETKOVIC A, LÖTVALL J, LÄSSER C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Extracell Vesicles.* 2014;3.
- D'ASTI E, CHENNAKRISHNAIAH S, LEE TH, RAK J. Extracellular Vesicles in Brain Tumor Progression. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(3):383-407.
- D'SOUZA-SCHOREY C, CLANCY JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 2012; 26(12):1287-99.
- DI VIZIO D, KIM J, HAGER MH, MORELLO M, et al. Oncosome formation in prostate cancer: association with a region of frequent chromosomal deletion in metastatic disease. *Cancer Res.* 2009; 1;69(13):5601-9
- ELDH M, LOTVALL J, MALMHALL C, et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA:evaluation of different methods. *Mol Immunol.* 2012; 50:278–86.
- FALCONE G, FELSANI A, D'AGNANO I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015; 34:32
- FISKAA T, KNUTSEN E, NIKOLAISEN MA, et al. Distinct Small RNA Signatures in Extracellular Vesicles Derived from Breast Cancer Cell Lines. Carter DRF, ed. *PLoS ONE.* 2016;11(8):e0161824
- FOSTER BP, BALASSA T, BENEN TD, et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016; 53(6):379-95.
- FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19:92–105.

GARDINER C, DI VIZIO D, SAHOO S, THÉRY C, WITWER KW, WAUBEN M, HILL AF. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2016; 31; 5:32945

GIBBINGS DJ, CIAUDO C, ERHARDT M, VOINNET O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1143-9

GINESTRA A, LA PLACA MD, SALADINO F, CASSARA D, NAGASE H, VITTORELLI ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* 1998; 18:3433-3437.

GOH JN, LOO SY, DATTA A, et al. microRNAs in breast cancer: regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016; 91(2):409-28.

a.GREENING DW, GOPAL SK, XU R, SIMPSON RJ, CHEN W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 40:72-81.

b.GREENING DW, GOPAL SK, MATHIAS RA, LIU L, SHENG J, ZHU HJ, SIMPSON RJ. Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 40:60-71.

c.GREENING DW, XU R, JI H, TAURO BJ, SIMPSON RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol*. 2015; 1295: 179-209.

GYÖRGY B, SZABÓ TG, PÁSZTÓI M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(16):2667-88

HA M, KIM N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(8):509-24.

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 4;144(5):646-74.

HANNAFON BN, DING WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(7):14240-69.

HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983; 97:329–339

HEEDOO L, DUO Z, JASLEEN M, YANG J. Extracellular Vesicles Facilitate the Intercellular Communications in the Pathogenesis of Lung Injury. *Cell Dev Biol*. 2016; 5(2): 175.

- HENNE WM, STENMARK H, EMR SD. Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(9): a016766.
- HOU X, WAN W, WANG J, LI M, WANG Y, YAO Y, FENG L, JING L, LU H, JIA Y, PENG T. Let-7a inhibits migration of melanoma cells via down-regulation of HMGA2 expression. *Am J Transl Res*. 2016; 15;8(9):3656-3665.
- HUNTER MP, ISMAIL N, ZHANG X, AGUDA BD, LEE EJ, YU L, XIAO T, SCHAFER J, LEE ML, SCHMITTGEN TD, NANA-SINKAM SP, JARJOURA D, MARSH CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3694.
- ISEV. International Society for Extracellular Vesicles. Disponível em <http://isev.site-ym.com/>. Acesso em 20 nov 2016.
- IPAS H, GUTTIN A, ISSARTEL JP. Exosomal MicroRNAs in tumoral U87 MG versus normal astrocyte cells. *Microna*. 2015; 4(2):131-45
- JOJOA DEJ. Dianny Elizabeth Jimenez Jojoa. Heterogeneidade em população de exossomas séricos em função de diferentes técnicas de purificação. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília. Brasília. 80p. 2017.
- KASTELOWITZ N, YIN H. Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *Chembiochem*. 2014; 5;15(7):923-8
- KASTELOWITZ-LIEBERMAN N. Effects of membrane shape and lipid composition in extracellular vesicle and platelet biology written. 2016.
- KIM DK, LEE J, SIMPSON RJ, LÖTVALL J, GHO YS. EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 40:4-7.
- KIM HK, SONG KS, PARK YS, KANG YH, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer*. 2003; 39(2):184–191. Erratum in *Eur J Cancer* 2003, 39(17):2569
- KOSAKA N, IGUCHI H, YOSHIOKA Y, et al. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*. 2012; 287:1397–405
- KRUGER S, ABD ELMAGEED ZY, HAWKE DH, et al. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014; 14:44.

- LANE RE, KORBIE D, ANDERSON W, VAIDYANATHAN R, TRAU M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep.* 2015; 5:7639.
- LÄSSER C, ELDH M, LÖTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp.* 2012; 59: e3037.
- LEE TH, CHENNAKRISHNAIAH S, RAK J. Oncogene-dependent survival of highly transformed cancer cells under conditions of extreme centrifugal force - implications for studies on extracellular vesicles. *Cell Mol Biol Lett.* 2015; 20(1):117-29
- LEVENTIS PA, GRINSTEIN S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* 2010; 39:407-27
- LI Y, ZHANG Y, QIU F, QIU Z. Proteomic identification of exosomal LRG1: a potential urinary biomarker for detecting NSCLC. *Electrophoresis* 2011; 32:1976–83.
- LIMA, Luize Gonçalves. Envolvimento de microvesículas contendo fator tecidual em diferentes aspectos da biologia tumoral / Luize Gonçalves Lima. – Tese de Doutorado - Rio de Janeiro: UFRJ / IBqM, 2012.
- LING ZL, COMBES V, GRAU GE, KING NJ. Microparticles as immune regulators in infectious disease - an opinion. *Front Immunol.* 2011; 2:67.
- LOBB RJ, BECKER M, SHU WEN, et al. Technical report optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: 10.3402/jev.v4.27031.
- LÖTVALL J, HILL AF, HOCHBERG F, BUZÁS EI et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014; 3:26913.
- LUGA V, ZHANG L, VILORIA-PETIT AM, OGUNJIMI AA, INANLOU MR, CHIU E, BUCHANAN M, HOSEIN AN, BASIK M, WRANA JL. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* 2012; 151(7):1542-56.
- MAAS SL, DE VRIJ J, BROEKMAN ML. Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Vis Exp.* 2014; 19;(92): e51623.
- MACHIDA T, TOMOFUJI T, MARUYAMA T, et al. miR-1246 and miR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep.* 2016;36(4):2375-81.

MADISON MN, OKEOMA CM. Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. *Viruses*. 2015; 20;7(7):4093-118.

MANTEL PY, MARTI M. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. *Cellular microbiology*. 2014;16(3):344-354.

McKENZIE AJ, HOSHINO D, HONG NH, CHA DJ, FRANKLIN JL, COFFEY RJ, PATTON JG, WEAVER AM. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep*. 2016;3;15(5): 978–987.

MECKES DG Jr. Exosomal communication goes viral. *J Virol*. 2015; 89(10):5200-3.

MECKES DG Jr, RAAB-TRAUB N. Microvesicles and viral infection. *J. Virol*. 2011; 85(24):12844-12854.

MEISTER G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet*. 2013; 14; pp. 447-459

MELO SA, LUECKE LB, KAHLERT C et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523: 177–82.

MELO SA, SUGIMOTO H, O'CONNELL JT, KATO N, VILLANUEVA A, VIDAL A, QIU L, VITKIN E, PERELMAN LT, MELO CA, LUCCI A, IVAN C, CALIN GA, KALLURI R. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2014;26(5):707-21.

MISSOTTEN M, NICHOLS A, RIEGER K, SADOUL R. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ*. 1999; 6(2):124-9.

MITTELBRUNN M, GUTIERREZ-VAZQUEZ C, VILLARROYA-BELTRI C, GONZALEZ S, SANCHEZ-CABO F, GONZALEZ MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011; 2:282.

MORELLO M, MINCIACCHI VR, DE CANDIA P, YANG J, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle*. 2013; 15;12(22):3526-36.

MURALIDHARAN-CHARI V, CLANCY JW, SEDGWICK A, D'SOUZA-SCHOREY C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123: 1603–11.

NAITO, Y., YOSHIOKA, Y., YAMAMOTO, Y. et al. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016; doi:10.1007/s00018-016-2346-3.

- NAKASE I, NOGUCHI K, FUJII I, FUTAKI S. Vectorization of biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis. *Scientific Reports*. 2016;6.
- O'DRISCOLL L. Expanding on Exosomes and Ectosomes in Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372(24):2359-62.
- OHSHIMA K, INOUE K, FUJIWARA A, et al. Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. Wöfl S. *PLoS ONE*. 2010;5(10): e13247.
- OLENA AF, PATTON JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222(3):540-5.
- OSTROWSKI M, CARMO NB, KRUMEICH S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13
- PAGGETTI J, HADERK F, SEIFFERT M, JANJI B, ET AL. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*. 2015; 126(9):1106-17.
- PALMA J, YADDANAPUDI SC, PIGATI L, et al. MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40:9125–38
- PAN BT, BLOSTEIN R, JOHNSTONE RM. Loss of the transferrin receptor during the maturation of sheep reticulocytes in vitro. An immunological approach. *Biochem J*. 1983; 210:37–47
- PAPACHRISTOU DJ, KORPETINO A, GIANNOPOULOU E, et al. Expression of the ribonucleases Droscha, Dicer, and Ago2 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch*. 2011 Oct;459(4):431-40. doi: 10.1007/s00428-011-1119-5.
- PEINADO H, ALEČKOVIĆ M, LAVOTSHKIN S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012;18(6):883-891.
- PENFORNIS P, VALLABHANENI KC, WHITT J, POCHAMPALLY R. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *Int J Cancer*. 2016; 138(1): 14–21.
- POSTE G, NICOLSON GL. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77:399-403

- RAIMONDO S, SAIIEVA L, CORRADO C, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. *Cell Communication and Signaling: CCS*. 2015; 13:8.
- RAPOSO G, NIJMAN HW, STOORVOGEL W, LIEJENDEKKER R, HARDING CV, MELIEF CJ, GEUZE HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996;183(3):1161–72.
- RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;(4):373-83.
- RATAJCZAK J, MIEKUS K, KUCIA M, ZHANG J, RECA R, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006; 20:847–856
- RUSSO F, DI BELLA S, NIGITA G, MACCA V, LAGANÀ A, GIUGNO R, PULVIRENTI A, FERRO A. miRandola: extracellular circulating microRNAs database. *PLoS One*. 2012;7(10): e47786
- SANTANGELO L, GIURATO G, CICCHINI C, MONTALDO C et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep*. 2016; 17(3):799-808
- SEGURA E, NICCO C, LOMBARD B, VÉRON P, RAPOSO G, BATTEUX F, AMIGORENA S, THÉRY C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*. 2005; 106(1):216-23
- SILVA, THAIOMARA ALVES. AHNAK regula a formação e troca de vesículas extracelulares entre células tumorais de mama e fibroblastos. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. USP. São Paulo, 2015. doi: 10.11606/T.42.2015.tde-08122015-182044
- SINGH R, POCHAMPALLY R, WATABE K, LU Z, MO YY. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Molecular Cancer*. 2014; 13:256.
- SKOG J, WÜRDINGER T, VAN RIJN S, MEIJER DH, GAINCHE L, SENA-ESTEVEZ M, CURRY WT JR, CARTER BS, KRICHEVSKY AM, BREAKFIELD XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12):1470-6.
- SOUNG YH, NGUYEN T, CAO H, LEE J, CHUNG J. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep* 2015; 3402

SQUADRITO ML, BAER C, BURDET F, MADERNA C, GILFILLAN GD, LYLE R, IBBERSON M, DE PALMA M. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep.* 2014;11;8(5):1432-46.

SUETSUGU A, HONMA K, SAJI S, MORIWAKI H, OCHIYA T, HOFFMAN RM. Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(3):383-90

SUN S, ZHOU X, CORVERA J, GALLICK GE, LIN SH, KUANG J. Erratum: ALG-2 activates the MVB sorting function of ALIX through relieving its intramolecular interaction. *Cell Discov.* 2016; 21; 2:16023.

TAYLOR DD, SHAH S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods.* 2015; 87:3-10

TAYLOR DD, TAYLOR CG, JIANG CG, BLACK PH. Characterization of plasma membrane shedding from murine melanoma cells. *Int J Cancer* 1988; 41:629-635.

THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.

TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, BURWINKEL B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011; 1;39(16):7223-33.

VADER P, BREAKFIELD XO, WOOD MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2014; 20(7):385-93.

VALLABHANENI KC, PENFORNIS P, DHULE S, GUILLONNEAU F, ADAMS KV, MO YY, XU R, LIU Y, WATABE K, VEMURI MC, POCHAMPALLY R. Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget.* 2015;10;6(7):4953.

VAN DER POL E, BÖING AN, HARRISON P, STURK A, NIEUWLAND R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; 64(3):676-705

VAN NIEL G, MALLEGOL J, BEVILACQUA C, CANDALH C, BRUGIERE S, TOMASKOVIC-CROOK E, HEATH JK, CERF-BENSUSSAN N, HEYMAN M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut.* 2003;1;52(12):1690-7.

VESICLOPEDIA. 2016. Disponível em < <http://microvesicles.org/#>>. Acesso em 04 dez 2016.

- VILLARROYA-BELTRI C, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, SÁNCHEZ-CABO F, et al.,
Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through
binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013; 4:2980.
- WEBBER JP, SPARY LK, SANDERS AJ, CHOWDHURY R, JIANG WG, STEADMAN
R, WYMANT J, JONES AT, KYNASTON H, MASON MD, TABI Z, CLAYTON A.
Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes.
*Oncogene.*2015;34(3):290–302
- WOLF P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*
1967; 13:269-288.
- WOLFERS J, LOZIER A, RAPOSO G, REGNAULT A, THÉRY C, MASURIER C,
FLAMENT C, POUZIEUX S, FAURE F, TURSZ T, ANGEVIN E, AMIGORENA S,
ZITVOGEL L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens
for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001;7(3):297-303.
- XIAO H, LI H, YU G, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4
and HOXD10 in human bladder cancer. *Oncology Reports.* 2014; 31,1832-1838.
- XU W, YANG Z, LU N. From pathogenesis to clinical application: insights into exosomes
as transfer vectors in cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 29;35(1):156.
- YAMASHITA T, KAMADA H, KANASAKI S et al. Epidermal growth factor receptor
localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis.
Pharmazie 2013; 68:969–73.
- YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PR, ANDREU Z et al. Biological properties of extracellular
vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 27066.
- YEH YY, OZER HG, LEHMAN AM, et al. Characterization of CLL exosomes reveals a
distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR
signaling. *Blood.* 2015;125(21):3297-3305.
- YOON YJ, KIM OY, GHO YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular
communicasomes. *BMB Rep.* 2014; 47(10):531-9.
- YOSHIOKA Y, KOSAKA N, KONISHI Y et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating
extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014; 5:3591
- YU JL, MAY L, LHOTAK V, SHAHRZAD S, SHIRASAWA S, WEITZ JI, COOMBER
BL, MACKMAN N, RAK JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in
colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*
2005; 105:1734-1741.

- ZAROVNI N, CORRADO A, GUAZZI P, ZOCCO D, LARI E, RADANO G, MUHHINA J, FONDELLI C, GAVRILOVA J, CHIESI A. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods*. 2015; 87:46-58
- ZHANG J, LI S, LI L, LI M, GUO C, YAO J, MI S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24
- ZHAO L, LIU W, XIAO J, CAO B. The role of exosomes and "exosomal shuttle microRNA" in tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Lett*. 2015; 356(2 Pt B):339-46.

9. APÊNDICE

9.1. Artigo publicado durante o Doutorado.

Do Carmo NG, Sakamoto LH, Pogue R, Do Couto Mascarenhas C, Passos SK, Felipe MS, Andrade RV. Altered Expression of PRKX, WNT3 and WNT16 in Human Nodular Basal Cell Carcinoma. *Anticancer Research*. 2016 Sep;36(9):4545-51

Citado por: Huang S, Li Q, Alberts I, Li X. PRKX, a Novel cAMP-Dependent Protein Kinase Member, Plays an Important Role in Development. *J Cell Biochem*. 2016 Mar;117(3):566-73. doi: 10.1002/jcb.25304.

9.2. Submetido na revista *Cancer Biology & Medicine* em março 2016:

MicroRNAs associated to Hedgehog signaling pathway in human cancers.

Mayara Simonelly Costa dos Santos, Lana Ribeiro Aguiar, Mateus Candeia Gianizele, Natalia Gurgel do Carmo