

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA BIOGÊNESE DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES EM MELANOMAS HUMANOS**

JULIANA ROCHA BELMIRO BATISTA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Batista, Juliana Rocha Belmiro

Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na biogênese de vesículas extracelulares em melanomas humanos / Juliana

Rocha Belmiro Batista – São Paulo; 2016.

56p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. MELANOMA. 2. BIOGÊNESE 3. VESÍCULAS
EXTRACELULARES.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr.^a Vilma Regina Martins, pela orientação durante esses dois anos, e pela oportunidade de trabalhar em um projeto multidisciplinar com tantos desafios.

A Dra Maria Dirlei Begnami pelo apoio na avaliação e interpretação dos resultados relacionados as imunohistoquímicas nos tecidos humanos.

A Enfermeira Luciana Facure Moredó pelo excelente trabalho no recrutamento e encaminhamento dos pacientes e na manutenção do banco de dados clínicos.

Ao Dr. João Duprat Neto e toda a equipe do Núcleo de câncer de pele pelo apoio na realização deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório, que em muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À FAPESP (2013/26294-0) pela oportunidade de prover a bolsa de estudo, sem a qual não teria sido possível realizar esse trabalho.

RESUMO

Batista JRB. **Avaliação da expressão de proteínas envolvidas na biogênese de vesículas extracelulares em melanomas humanos.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os tumores de pele são os tipos de cânceres mais comuns, sendo que os melanomas são a principal causa de morte entre eles. A progressão do câncer envolve a capacidade das células tumorais de comunicarem-se com seu microambiente. Esta comunicação pode ocorrer através de vesículas extracelulares (EVs), capazes de participar na transferência horizontal de proteínas de sinalização, RNAs (mRNAs, microRNAs e outros non-coding RNAs) e outras moléculas entre as células tumorais e as células do microambiente tumoral contribuindo para o processo de progressão tumoral. É sabido que tumores primários secretam EVs que atuam sobre progenitores hematopoiéticos da medula óssea. Sob a ação dessas EVs, populações específicas da medula óssea são dirigidas aos futuros sítios de formação de metástases (sítio pré-metastático). Entre os tipos mais importantes de EVs secretadas pelas células estão os exossomos. Diversas proteínas da via endocítica estão envolvidas no processo de formação, composição e secreção das EVs (dos exossomos em particular) e podem estar correlacionadas às características patológicas e clínicas dos tumores. O presente projeto teve como objetivo avaliar proteínas associadas à formação e secreção de exossomos, TRP2, Rab27a e Rab27b em tecidos de melanomas humanos, quantificar EVs no plasma destes pacientes e determinar os níveis da co-chaperona STI1/HOP nestas EVs. Estas variáveis experimentais foram comparadas entre si e sua correlação com a progressão tumoral foi avaliada. Os resultados apontaram que as proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 apresentam uma maior expressão em melanomas metastáticos (estádios III e IV) quando comparados a não metastáticos (estádios *in situ*, I e II). A quantificação das EVs, bem como seu conteúdo

proteico total, não mostrou diferenças entre os diversos estadios tumorais. Desta forma, não foi encontrada correlação entre a expressão das 3 proteínas (Rab27a, Rab27b e TRP2) e a concentração de EVs do plasma. As EVs circulantes no plasma dos pacientes com melanoma em estadios mais avançados apresentaram um aumento na concentração de STI1/HOP quando comparadas aquelas provenientes do plasma de pacientes portadores de melanomas em estádios mais precoces. Juntos estes resultados sugerem um papel para as proteínas relacionadas as vias de biogênese e secreção de exosomos na progressão do melanoma e que a STI1/HOP contida nas EVs circulantes no plasma pode ter um papel no microambiente e na progressão tumoral. Metodologias mais adequadas devem ser desenvolvidas para isolamento de EVs tumorais do pool de EVs do plasma, uma vez que a presença de marcadores específicos presentes nas EVs derivadas das células tumorais podem estar mascarados.

SUMMARY

Batista JRB. **[Evaluation of the expression of proteins involved in the biogenesis of extracellular vesicles in human melanoma]**. São Paulo 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Skin cancers are the most common type of cancer, and among them melanoma is the major cause of death. Tumor progression involves the ability of tumor cells to communicate with the microenvironment. This communication can occur through extracellular vesicles (EVs) which are able to participate in the horizontal transfer of proteins, RNAs (mRNAs, microRNAs and other non-coding RNAs) and other molecules between tumor cells and cells from the microenvironment, thus interfering with the tumor progression. It is well known that primary tumors secrete EVs that act over hematopoietic progenitors from bone marrow. Under the effect of these EVs, specific cell populations from the bone marrow are sent to the future metastasis site (pre-metastatic niche). Exosomes are among the most important types of EVs.. Several proteins from endocytic pathway are involved in the process of formation, packing and secretion of the exosomes) and can be correlated to the pathological and clinical characteristics of the tumors. The aim of this project was evaluate the proteins associated with the formation and secretion of exosomes, TRP2, Rab27a and Rab27b in tumor tissues from patients with melanoma, to quantify the EVs at the plasma of these patients and to determine the protein levels of the co-chaperonin STI1/HOP within these EVs. These experimental variables were compared and their correlation with the tumor progression was evaluated. Results showed that Rab27a, Rab27b and TRP2 presented higher expression in metastatic melanoma (stage III and IV) when compared to the non-metastatic melanomas (stage *in situ*, I and II). The quantification of the EVs, as well as their total protein content did not point differences between tumor stages. Moreover, no correlation was found between the expression of the 3 proteins

(Rab27a, Rab27b and TRP2) and the concentration of EVs in the plasma. On the other hand, EVs isolated from the plasma of patients with more advanced stages of melanoma contain higher concentrations of STI1/HOP when compared to ones from the plasma of patients with early stages of the disease. Together, these data suggest that tumor expression of proteins related to biogenesis and secretion of exosomes may participate in melanoma progression. In addition, STI1/HOP within EVs can have a role in tumor microenvironment and melanoma progression. Methodologies that are more adequate must be developed to allow the isolation of tumor-derived exosomes from the pool of plasma EVs, since specific markers present in the former EVs may be masked.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sítio Pré-metastático.....	4
Figura 2	Biogênese e Secreção de Vesículas Extracelulares....	8
Figura 3	Perfil de marcação imunohistoquímica para as proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 em cortes de melanoma.....	28
Figura 4	Níveis de marcação de Rab27a em cortes de melanoma.....	29
Figura 5	Níveis de marcação de Rab27b em cortes de melanoma.....	30
Figura 6	Níveis de marcação de TRP2 em cortes de melanoma.....	31
Figura 7	Correlação do nível de marcação das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 com o estadiamento dos melanomas.....	32
Figura 8	Perfil do tamanho das Vesículas Extracelulares Provenientes do Plasma de Pacientes com Melanoma.....	33
Figura 9	Concentração de EVs no plasma de pacientes portadores de melanoma de acordo com o estadio tumoral.....	34

Figura 10	Correlação da intensidade de marcação das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 com relação a concentração de vesículas extracelulares circulantes no plasma.....	35
Figura 11	Total de Proteínas Carregadas pelas EVs circulantes no plasma de pacientes portadores de melanoma.....	36
Figura 12	Análise Quantitativa da Expressão de STI1/HOP em EVs de plasma de pacientes portadores de melanoma.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	microlitro
dH₂O	Água destilada
EDTA	do inglês, Ethylenediaminetetraacetic acid
EVs	do inglês, extracellular vesicle
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	kilodalton
miRNA	microRNA
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MVB	do inglês, multivesicular body
NaCl	Cloreto de sódio
nM	nanomolar
°C	graus Celcius
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	do inglês, Sodium dodecyl sulfate
STI1/HOP	do inglês, stress inducible protein 1/Hsp70-Hsp90 organizing protein
Tris-HCl	tris-hidrocloreto

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Pele e Melanoma	1
1.2	Metástase	3
1.3	Vesículas Extracelulares: Origem e Função.....	5
1.4	Vesículas Extracelulares e Câncer.....	11
1.5	As Rab27a e Rab27b e sua Influência sobre Secreção e Progressão Tumoral	13
1.6	TRP2: Tyrosinase Related Protein-2	15
1.7	STI1/HOP: Stress Inducible Protein 1/ Hsp70/Hsp90 Organizing protein.....	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Amostras de tecido tumoral (melanoma).....	21
3.2	Reações de Imunoistoquímica	22
3.3	Amostras de Plasma	22
3.4	Isolamento de Vesículas Extracelulares de Plasma de Pacientes	23
3.5	Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	24
3.6	SDS-PAGE e Ensaio de “immunoblotting”	25
3.7	Coloração de proteínas por nitrato de prata	26
3.8	Análises estatísticas	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Análise das Amostras de Tecido Tumoral Provenientes dos Pacientes com Melanoma	27

4.2	Análise das Amostras de Plasma Provenientes dos Pacientes com Melanoma.....	33
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Tabela dos dados clínicos dos pacientes com melanoma utilizados no estudo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PELE E MELANOMA

Os cânceres de pele estão entre os tipos mais comuns de tumores (American Cancer Society-ACS 2015), e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 175.760 novos casos destes tumores em 2016, sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres (Ministério da Saúde 2016). Em caucasianos, a incidência dos cânceres de pele é inversamente proporcional à distância da linha do Equador, sendo assim, Nova Zelândia e Austrália lideram em incidência mundial. Apesar dos avanços terapêuticos, 80% das mortes associadas a cânceres de pele estão relacionadas ao melanoma (World Health Organization-WHO 2013), um tipo de câncer de pele que representa menos de 5% desse grupo de tumores.

Os melanomas acometem principalmente adultos, sendo mais comuns entre os homens do que entre as mulheres. Nesse contexto, a idade torna-se um fator importante, pois a sobrevida em pessoas mais jovens é maior do que entre os idosos. Quando consideradas diferentes populações ao redor do mundo, os caucasianos são mais afetados que afrodescendentes e hispânicos, porém a morbidade dentro do grupo de não-caucasianos é maior, pois a doença em geral é descoberta em estádios mais avançados nesta população (GLOSTER e NEAL 2006; AZOURY e LANGE 2014). Quando detectados em seus estádios iniciais, os casos de

melanoma apresentam uma sobrevida global de 98% (American Cancer Society - ACS 2015). Entretanto, em melanomas de estadiamentos mais avançados, a mortalidade é alta, principalmente devido à resistência terapêutica apresentada pelas metástases (CHAPMAN e YANG 2009). Dessa forma, o crescimento em um ritmo acelerado do número de indivíduos com cânceres de pele do tipo melanoma associado à sua agressividade e ameaça à saúde pública devem ser considerados de extrema relevância (NARAYANAN et al. 2010).

O principal fator de risco associado à origem e ao desenvolvimento de melanomas é a exposição crônica e intermitente à radiação ultravioleta (DIEPGEN e MAHLER 2002; SCHADENDORF et al. 2015). Adicionalmente, histórico anterior de câncer de pele ou outros tipos de câncer (e.g. mama, próstata etc), pré-disposição a lesões na pele, história familiar e genética (aproximadamente 10% dos pacientes) e mutações (MITIF, melanoma esporádico e familiar, CDKN2 e CDK4 em melanoma familiar) são também fatores de risco relacionados a estes tumores.

Os melanomas são estadiados com base na sétima edição do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) Melanoma Staging Database, e estão divididos em estádios I e II, melanomas locais que não apresentam metástase; estágio III, melanomas que apresentam metástases regionais em linfonodos e estágio IV, melanomas que estabelecem metástases em órgãos à distância (BALCH et al. 2009).

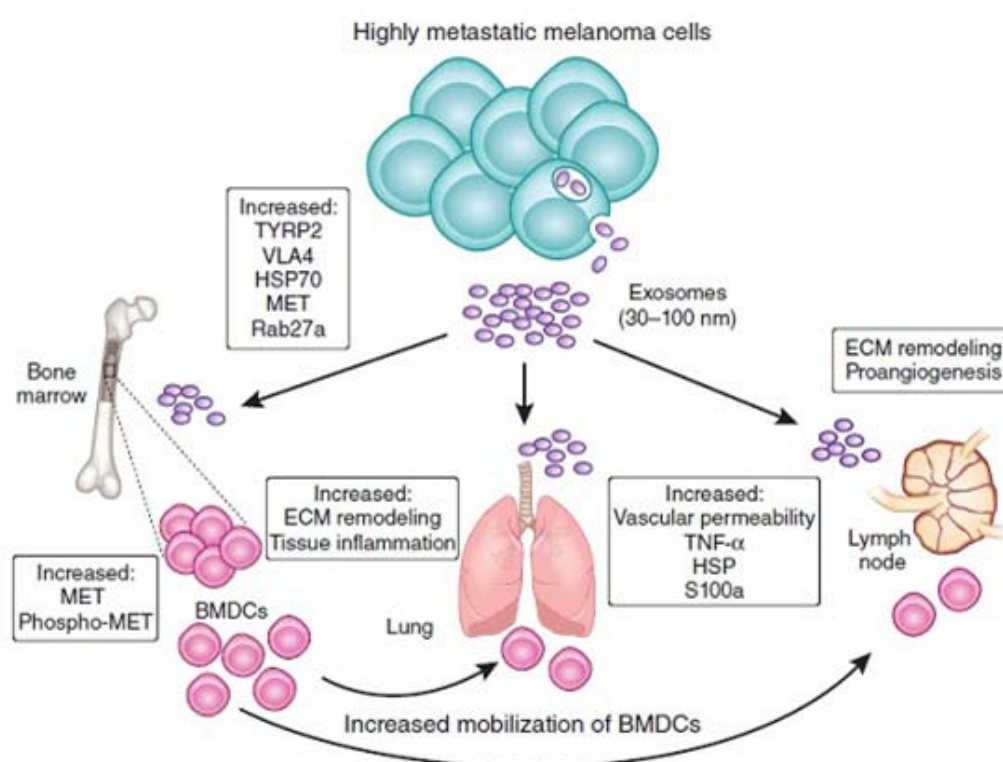
1.2 METÁSTASE

A formação de metástases, tanto locais como à distância, é um dos aspectos importantes relacionados à sobrevida dos pacientes com melanoma. Desta forma, o estudo dos mecanismos que possibilitam a disseminação das células tumorais é de grande relevância (ZHANG e WANG 2015). Parte da literatura científica tem dado destaque predominantemente ao desenvolvimento e progressão do tumor em seu sítio primário. Entretanto, recentemente, um número crescente de estudos aponta para os processos envolvidos na formação de metástases tumorais, o que tem resultado no surgimento de novos conceitos (COGHLIN e MURRAY 2010).

Dentre estes, destaca-se o conceito de sítio pré-metastático (Figura 1), introduzido em 2005 pelo trabalho de KAPLAN et al. Neste trabalho demonstrou-se que melanomas murinos primários secretam fatores solúveis que atuam sobre progenitores hematopoiéticos da medula óssea. Sob a ação destes fatores solúveis, populações específicas da medula óssea são selecionadas e dirigidas aos futuros sítios de metástase e dessa forma, promovem a formação das metástases (revisado por JOYCE e POLLARD 2009).

Tal hipótese foi sustentada por experimentos que evidenciaram que o tratamento de animais com meio condicionado de uma linhagem celular de melanoma murino altamente metastática, B16F10, é suficiente para remodelar o perfil de disseminação de linhagens pouco metastáticas, como

as células de tumor de Lewis (KAPLAN et al. 2005). Uma vez nestes tecidos alvo das metástases, estas células provenientes da medula óssea são capazes de remodelar componentes da matriz extracelular, secretar fatores solúveis, contribuir para a modificação de células do estroma e para formação de novas redes vasculares, favorecendo o desenvolvimento de um novo sítio tumoral (PSAILA e LYDEN 2009, PEINADO et al. 2012) (Figura 1).



Fonte: SOMASUNDARAM e HERLYN (2012).

Figura 1 - Sítio Pré-metastático: Fatores provenientes do tumor primário recrutam progenitores da medula óssea, remodelam a matriz extracelular, atuam promovendo angiogênese e resposta inflamatória no tecido em órgãos específicos que receberão células provenientes do tumor primário e dessa forma favorecem o processo de metástase.

1.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES: ORIGEM E FUNÇÃO

Muitas proteínas que exercem função no espaço extracelular são secretadas em associação com vesículas lipídicas, que podem ser derivadas de corpos apoptóticos, microvesículas geradas por *shedding* da membrana plasmática e exossomos (MATHIVANAN et al. 2010). Essas vesículas extracelulares (do inglês extracellular vesicles; EVs) estão envolvidas no transporte de proteínas e material genético (mRNA e micro-RNA entre outros), na transferência de receptores e indução de sinalização celular, além de participarem em processos fisiológicos importantes como trombose, inflamação, resposta imune e angiogênese. As EVs podem ainda desempenhar um papel importante em vários processos patológicos incluindo aterosclerose, pré-eclampsia, diabetes e câncer (DRAGOVIC et al. 2011).

A maioria das proteínas secretadas pelas células eucarióticas contém peptídeos sinais que as direcionam para o retículo endoplasmático (RE). A partir do RE as proteínas podem ser transportadas para o espaço extracelular ou para a membrana plasmática através de EVs passando pelo complexo de Golgi. Contudo, existem muitas proteínas secretadas que podem ganhar acesso ao espaço extracelular por mecanismos de secreção não clássicos. Entretanto, proteínas que contêm o peptídeo sinal de translocação no RE podem ainda seguir a via não convencional de secreção e podem atingir a superfície celular através de carreadores derivados do RE (cobertos por COPII ou não) e que se fusionam diretamente com a

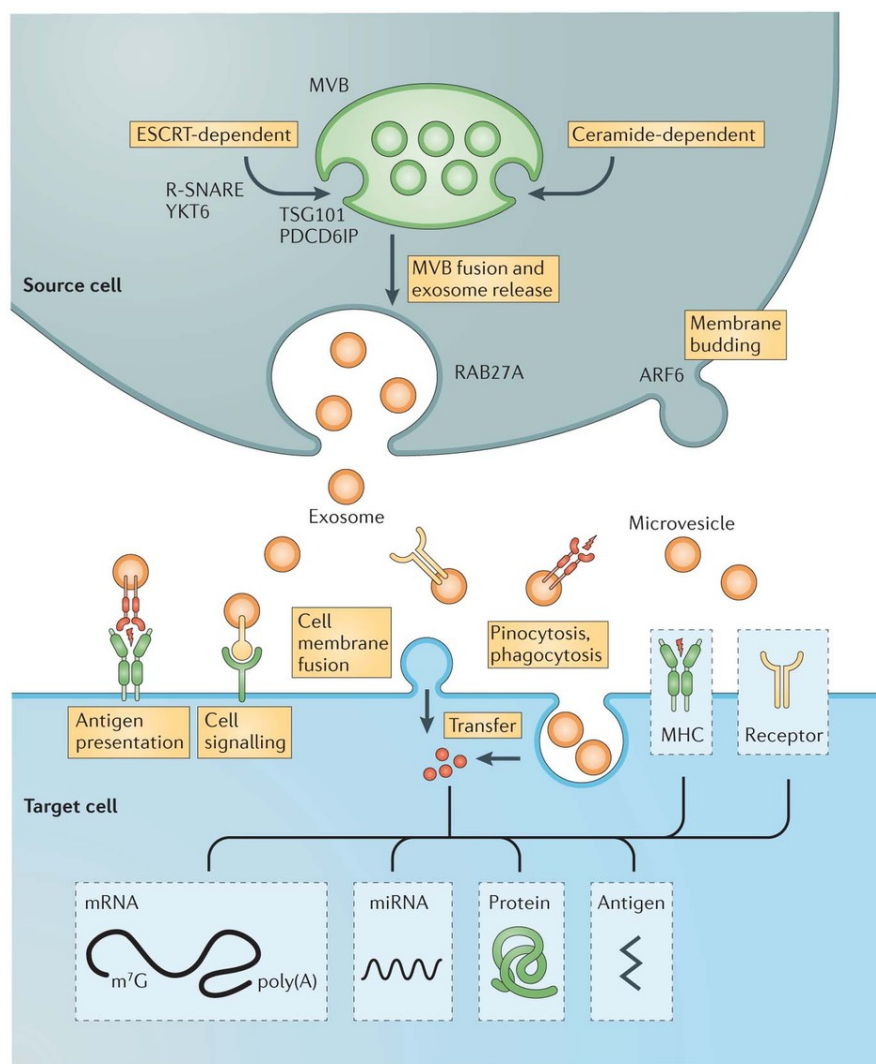
membrana plasmática ou com endossomos tardios que são então transportados à membrana plasmática (NICKEL e RABOUILLE 2009).

Contudo a maioria das proteínas secretadas por vias não clássicas não possuem peptídeo sinal e independem da rota RE/Golgi para sua secreção. Entre os mecanismos já descritos podemos destacar a translocação direta na membrana plasmática, lisossomos secretórios, através de microvesículas geradas por *shedding* da membrana plasmática ou pela liberação de exossomos presentes nos corpos multivesiculares (do inglês multivesicular bodies; MVBs) (NICKEL e RABOUILLE 2009).

As EVs são classificadas de acordo com tamanho, origem, composição e função. Os corpos apoptóticos, são EVs maiores, com seu tamanho variando entre 500 a 2000 nm, compostos em sua maioria por fosfatidilserina, sendo capazes de carregar organelas e frações nucleares. Outra classe de EVs são as microvesículas, originárias de brotamentos da membrana plasmática das células, com tamanhos que variam de 50 a 1000 nm. As microvesículas são ricas em integrinas e podem carregar mRNA, miRNA, non-coding RNAs, proteínas citoplasmáticas e de membrana (incluindo receptores). A última e mais bem estudada classe de EVs são os exossomos, com tamanho variando entre 40 a 120 nm, e formadas através da via endolisossomal em estruturas definidas como MVBs (EL ANDALOUSSI et al. 2013).

Os MVBs são organelas limitadas por membrana contendo em seu interior grande quantidade de vesículas intraluminais. Estas têm, portanto, origem endocítica, sendo secretadas pelo sistema endossomal. As vesículas

endocíticas formam-se a partir de invaginações da membrana plasmática podendo ou não ser revestidas por clatrina e são transportadas para os endossomos iniciais localizados no córtex celular. Os endossomos tardios, localizados na região perinuclear, derivam-se dos endossomos iniciais por acidificação, mudanças no conteúdo proteico e fusão com a outras vesículas ou membranas. A membrana limitante dos endossomos tardios brota no seu lúmen resultando no enriquecimento de vesículas luminais internas e dando origem aos MVBs (KELLER et al. 2006; RECORD et al. 2014) (Figura 2).



Fonte: EL ANDALOUSSI et al. (2013).

Figura 2 - Biogênese e Secreção de Vesículas Extracelulares: Os exossomos são uma população homogênea de vesículas extracelulares de origem endocítica, formadas a partir do brotamento de membrana dentro dos corpos multivesiculares (MVB) e o direcionamento proteico para os exossomos é realizado pelo *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT). O mecanismo de direcionamento e fusão dos MVB com a membrana da célula é, em geral, dependente de pequenas GTPases tais como Rab27A e Rab27B. As microvesículas, por sua vez, representam uma população heterogênea de vesículas extracelulares formadas por um brotamento externo e fissão da membrana celular. As vesículas extracelulares são capazes de transferir informação de um tipo celular a outro, como proteínas, RNA mensageiro, e RNAs regulatórios não-codificantes.

Os MVBs podem fundir-se a lisossomos e entregar suas vesículas para degradação, ou então fusionar-se com a membrana plasmática liberando suas vesículas no ambiente extracelular, estas podem atuar em vários processos de sinalização intercelular. Assim, os MVBs constituem um sistema altamente dinâmico que atua tanto como um reservatório de moléculas, quanto como estação intermediária para componentes que serão degradados, reciclados ou secretados (GASSART et al. 2004) (Figura 2).

Os exossomos são secretados por diferentes tipos celulares e contêm uma composição lipídica similar às plataformas lipídicas “lipid rafts”, ricos em colesterol, esfingomielina e gangliosídeo GM3, resistentes a detergentes não iônicos como o Triton X-100 e com sensibilidade à saponina. Os exossomos contêm algumas proteínas que podem atuar como marcadores como Alix e Tsg101 que são envolvidas no direcionamento endossomal-lisossomal e ainda contêm uma série de proteínas de superfície incluindo integrinas, tetraspaninas, como CD63, e antígenos MHC classe I e II. Além disso, os exossomos contêm proteínas de citoesqueleto, flotilina, receptor de transferrina, clatrina e proteínas/enzimas ancoradas à GPI como acetilcolinesterase (SMALHEISER 2007; RECORD et al. 2014).

Originalmente observado como um mecanismo para remover os receptores como o de transferrina durante a maturação de reticulócitos (JOHNSTONE et al. 1987), o envolvimento dos exossomos no carregamento de proteínas e RNAs que participam da comunicação intercelular em processos fisiológicos e patológicos tem sido amplamente discutido (MARTINS et al. 2013). Outro ponto importante é o papel dos exossomos

secretados por células apresentadoras de antígenos (APCs) e sua capacidade de estimular células T CD4⁺ (RAPOSO et al. 1996) e induzir uma resposta imune anti-tumoral *in vivo* (ZITVOGEL et al. 1998).

Em contrapartida ao seu papel de apresentação de antígenos, as EVs têm sido implicadas na supressão da resposta imune em transplantes, nos quais a injeção de vesículas derivadas de células da medula óssea do doador antes do transplante levou ao aumento da sobrevida e à diminuição de células T CD4⁺ no receptor, sugerindo a ativação de um efeito de imunotolerância (PÊCHE et al. 2003). VALADI et al. (2007) mostraram que exossomos derivados de uma linhagem de mastócitos humanos transportavam moléculas de mRNA para os mastócitos vizinhos, e estes mRNA eram então traduzidas e podiam conferir novas funções na célula receptora. Proteínas associadas com doenças renais podem ser detectadas em exossomos isolados de amostras de urina indicando um possível uso de exossomos como biomarcadores (PISITKUN et al. 2006).

Análises de proteômica de exossomos de urina têm gerado uma longa lista de assinaturas moleculares que podem servir no prognóstico e diagnóstico de doenças renais (HOORN et al. 2005). Exossomos também têm sido implicados na disseminação de vírus e príons. A proteína príon celular (PrP^C), bem como sua forma infectante (PrP^{Sc}), podem ser encontradas em exossomos levando à sugestão de que secreção de exossomos de células infectadas pode servir como veículo para propagação dos príons (PORTO-CARREIRO et al. 2005). O vírus HIV também utiliza os MVBs como seu principal sítio de acumulação em macrófagos humanos e os

vírus liberados possuem marcadores comumente associados à exossomos (NGUYEN et al. 2003).

Contudo os mecanismos moleculares da secreção dos exossomos não são completamente entendidos. A identificação de moléculas que controlam o tráfego intracelular de vesículas e sua fusão com a membrana plasmática, bem como das maquinarias responsáveis pela seleção das proteínas intraluminais que estarão presentes em EVs pode ajudar no entendimento dos mecanismos de secreção. Sabe-se, por exemplo, que a liberação de exossomos é um processo regulado, podendo estar aumentado em condições de estresse que induzam a resposta da proteína p53 (YU et al. 2006).

1.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES E CÂNCER

As EVs liberadas pelas células tumorais podem atuar na ativação de plaquetas, degranulação de mastócitos, indução de apoptose em células T ativadas levando à resposta de tolerância imunológica (TAYLOR et al. 2007). Em linfomas, o transporte da proteína ABCA3 pelos exossomos leva a resistência a terapia com o anticorpo rituximab (AUNG et al. 2011).

As EVs derivadas de tumores expressam moléculas envolvidas em promoção da angiogênese, remodelamento do estroma, ativação de vias de sinalização através da transferência de fatores/receptores de crescimento e quimioresistência. Além disso, essas vesículas podem induzir um microambiente pró-inflamatório para macrófagos através da expressão de

fibronectina. Como resultado de todos esses efeitos, as EVs tumorais podem representar mediadores centrais do microambiente tumoral (MARTINS et al. 2013).

Células de glioblastoma multiforme (GBM) secretam exossomos carregando diferentes classes de moléculas (mRNA, miRNA e proteínas angiogênicas) que podem ser captados por células endoteliais normais, estimulando a formação de vasos capilares e também podem ter um efeito autócrino, promovendo a proliferação celular. Interessantemente, exossomos podem ser detectados no sangue de pacientes com GBMs podendo fornecer informações diagnósticas e auxiliar em decisões terapêuticas para pacientes com câncer através de um teste sanguíneo (SKOG et al. 2008).

Adicionalmente, um estudo conseguiu identificar que exossomos de pacientes com GBM apresentam níveis reduzidos de RNAs ribossomais em amostras congeladas de biobancos de sangue. O RNA proveniente desses exossomos regulam os níveis de RNA codificadores para a produção de ribossomos quando comparados aos controles (NOERHOLM et al. 2012).

PEINADO et al. em 2012, identificaram que exossomos liberados por linhagens celulares de melanoma recrutam células progenitoras na medula óssea através da expressão da onco-proteína MET, criando respostas pró-vasculogênicas e pró-metastáticas que influenciam dramaticamente a formação de um sítio pré-metástático, retomando o conceito apresentado acima.

Dados recentes apontam que exossomos provenientes de células de adenocarcinoma ductal pancreático contém grandes quantidades de fator inibidor de migração (MIF), de forma que o seu bloqueio leva à diminuição na formação do sítio pré-metastático e metástases no fígado. Estes resultados evidenciam os exossomos como potenciais biomarcadores diagnósticos ou prognósticos (COSTA-SILVA et al. 2015).

1.5 AS RAB27A E RAB27B E SUA INFLUÊNCIA SOBRE SECREÇÃO E PROGRESSÃO TUMORAL

As proteínas Rab, integrantes da família das GTPases, foram amplamente associadas a secreção de EVs. OSTROWSKI et al. em 2010, descreveram a participação da Rab27a e da Rab27b no tráfego dos MVB e na secreção de exossomos em células HeLa, uma vez que o silenciamento das mesmas reduziu em mais de 50% a secreção dos exossomos. Em melanomas, a Rab27a está associada à pigmentação da pele por participar do transporte dos melanossomos ao longo da rede de actina do citoesqueleto celular (CHIAVERINI et al. 2008).

Em 2015, WANG et al. observaram que a expressão da proteína Rab27a estava associada ao estadiamento do adenocarcinoma ductal pancreático, sugerindo que esta sirva como um marcador prognóstico para estes tumores. Nas linhagens celulares de melanoma B16F10 e Sk-Mel-28, o silenciamento de Rab27a mostrou-se eficiente na redução do crescimento tumoral e formação de metástases pulmonares. A redução de Rab27a

afetou aproximadamente 40-50% das células tumorais circulantes e o recrutamento de células progenitoras da medula óssea (PEINADO et al. 2012). Adicionalmente, BOBRIE et al. também em 2012, descreveram a importância da Rab27a na progressão tumoral, não apenas nos mecanismos envolvidos diretamente na secreção de EVs pelo tumor, mas na modificação do microambiente tumoral, recrutando fatores e incitando a secreção de MMP9, uma metaloprotease pró-metastática, em células 4Ti de tumor de mama.

Trabalhos recentes descreveram que altos níveis de Rab27a garantem maior viabilidade às células, aumentam a proliferação, migração e atuam na supressão da apoptose em gliomas, levando os autores a sugerir que a supressão de Rab27a poderia ser benéfica no tratamento dos gliomas (WU et al. 2013), já que esta está presente em maiores quantidades nos gliomas do que em tecidos normais. Este dado foi confirmado por nosso grupo usando amostras de pacientes do A.C.Camargo Cancer Center (RODRIGUES 2014).

A Rab27b, por sua vez, foi descrita como um biomarcador de mau prognóstico em tumores estromais gastrointestinais (GIST), mostrando que casos com baixa expressão de Rab27b tinham maior sobrevida (WANG et al. 2014). O mesmo resultado foi observado em câncer colorretal quando a expressão da proteína nos tumores foi comparada ao tecido normal, não tumoral, reforçando a possível utilização deste marcador como preditor da progressão da doença (BAO et al. 2014). O uso de PCR em tempo real

mostrou que em linhagens humanas de melanoma Rab27b é menos expressa que Rab27a, (PEINADO et al. 2012).

Em conjunto, os dados apresentados na literatura evidenciam as Rab27a e a Rab27b como importantes ferramentas para o entendimento da biogênese de exossomos e também como biomarcadores promissores.

1.6 TRP2: TYROSINASE RELATED PROTEIN-2

Outro componente sabidamente presente em EVs e considerado um biomarcador promissor é o TRP2, também conhecido como dopacromo tautomerase. Uma enzima transmembrana, altamente conservada, envolvida em vias metabólicas, particularmente no metabolismo da tirosina, e na melanogênese. TRP2 é expresso em tecidos normais (retina, melanócitos), tecidos pré-melanossoma (nevus) e tumores (melanocítico, retinoblastomas e glioblastomas) (PAK et al. 2004).

Células de melanoma apresentam expressão de TRP2 mais elevada do que os melanócitos normais, e a função de TRP2 tem sido associada à resistência de células de melanoma aos tratamentos quimio e radioterápicos (PAK et al. 2004). Esse marcador foi descrito ainda como um inibidor da atividade pró-apoptótica de p53. Algumas linhagens celulares de melanoma resistentes a morte celular por apoptose após quimioterapia e radioterapia apresentaram expressão aumentada de TRP2 (PAK et al. 2004). O silenciamento de TRP2 levou ao aumento tanto na expressão de p53 quanto

dos níveis de apoptose induzida por cisplatina em melanoma (HOUBEN et al. 2014).

Em 2013, SIN et al. descreveram que a utilização, como forma de tratamento, de peptídeos TRP2 somada a CpG oligodeoxinucleotídeos, induzia a resposta imune e atividade antitumoral contra melanomas, sugerindo que esta poderia ser um alvo terapêutico nestes tumores.

TRP2 também já foi analisado em exossomos isolados a partir do plasma de pacientes com melanoma. Pacientes em estadio III e IV apresentaram tanto quantidades aumentadas de exossomos no plasma como maiores concentrações de TRP2 nos exossomos quando comparados aqueles pacientes em estadio mais inicial da doença. Outras proteínas como VL4 e HSP70 presentes em exossomos circulantes também estiveram associadas a melanomas de alto grau (PEINADO et al. 2012). Vale ressaltar que a HSP70 é um dos ligantes de STI1/HOP uma co-chaperona muito estudada por nosso grupo e que também está associada a exossomos (HAJJ et al. 2013).

1.7 STI1/HOP: STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1/ HSP70/HSP90 ORGANIZING PROTEIN

A co-chaperonina STI1 (Stress Inducible Protein 1) também conhecida como HOP (Hsp70/Hsp90 Organizing protein), é uma proteína descrita originalmente pela sua capacidade de se associar e modular a atividade das proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 (SONG e

MASISON 2005). O transcrito de STI1/HOP contém 2079 pares de bases que codificam para uma sequência de 543 aminoácidos, resultando em um peso molecular aparente de 66kDa (SCHEUFLER et al. 2000). A distribuição subcelular de STI1 é predominantemente citoplasmática, entretanto, uma pequena fração nuclear foi observada, apontando a existência de um processo de importação de STI1 para o núcleo (LASSLE et al. 1997; LONGSHAW et al. 2000).

Além de sua presença na membrana plasmática (MARTINS et al. 1997; ZANATA et al. 2002; ODUNUGA et al. 2004), experimentos envolvendo linhagens tumorais e culturas primárias de astrócitos mostraram que tanto em modelo murino (LIMA et al. 2007), como em modelo humano (EUSTACE e JAY 2004), STI1/HOP pode ser secretada para o meio extracelular.

Número crescente de estudos sugerem um papel relevante de STI1/HOP e seu ligante a proteína príon celular (PrP^C) na biologia de células tumorais. Como exemplo, pode-se mencionar o aumento da expressão de PrP^C em cânceres de estômago relacionados a alta proliferação destas células (LIANG et al. 2006a), a atividade anti-apoptóticos (LIANG et al. 2006b) e a promoção de invasão celular e formação de metástase (PAN et al. 2006). Por outro lado, ERLICH et al. (2007) demonstraram a participação de STI1/HOP na proliferação celular em linhagens derivadas de GBM humano. Nesse trabalho foi sugerido que STI1/HOP pode ser secretada pelas células tumorais e, de maneira autócrina, ligar-se a PrP^C na superfície destas células e aumentar a proliferação celular pela ativação das vias de

Erk1/2 e PI3K. Faz-se importante enfatizar que este efeito foi dependente da interação com PrP^C.

Dados da literatura têm descrito o aumento na expressão de PrP^C (ANTONACOPOULOU et al. 2008) e seu ligante STI1/HOP (MURRAY et al. 2006) em câncer de cólon. Foi demonstrado ainda que anticorpos anti-PrP^C são capazes não apenas de retardar o processo de proliferação celular, mas também de induzir apoptose em linhagens humanas provenientes destes tumores (MCEWAN et al. 2009). PrP^C é expresso em determinadas populações celulares do pâncreas normal (AMSELGRUBER et al. 2006) e uma forma alterada desta proteína que não sofre alteração pós-traducional foi detectada em linhagens de adenocarcinomas ductais pancreáticos humanos, esta apresentou atividade alterada levando à proliferação celular, invasão e ao crescimento tumoral (LI et al. 2009). Interessantemente, o papel de Hsp90, uma chaperona que interage com STI1/HOP e diversas proteínas de sinalização oncogênica (FLOM et al. 2007) tem sido descrito no crescimento, sobrevivência e metástase de carcinoma de pâncreas (ZHANG et al. 2008).

Dados recentes do grupo demonstraram que STI1/HOP é empacotada em MVB secretada em EVs por astrócitos e a proteína associada a essas vesículas lipídicas é capaz apresentar atividades neurotróficas quando associada a PrP^C em neurônios (HAJJ et al. 2013). Adicionalmente, o aumento da expressão de STI1/HOP foi correlacionado com processos de proliferação e baixa sobrevida em glioblastomas humanos (LOPES et al. 2015).

Apesar dos avanços nas descrições de mecanismos envolvidos com a secreção de exossomos e seu papel no processo tumoral, pouco foi explorado sobre a expressão tumoral de proteínas responsáveis por sua gênese intracelular e secreção. Além disso, a correlação entre a expressão destas proteínas e a presença de exossomos no plasma destes pacientes é desconhecida. Ressalta-se que, apesar do número crescente de estudos, a identificação de biomarcadores de prognóstico ou de alvos terapêuticos relevantes presentes em EVs ainda é limitada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivo avaliar proteínas associadas à biogênese e secreção de exossomos como TRP2, Rab27a e Rab27b em tecidos provenientes de melanomas humanos, quantificar EVs presentes no plasma destes pacientes e determinar a concentração de STI1/HOP nestas EVs. Estas variáveis serão correlacionadas entre si e também relacionadas à progressão tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a expressão das proteínas envolvidas na biogênese e secreção de vesículas extracelulares como TRP2, Rab27a e Rab27b em tecido de melanoma e avaliar sua correlação com o estadiamento;
- 2 Avaliar o perfil e o número de VEs bem como a quantidade total de proteínas presentes nesta VEs circulantes no plasma de indivíduos portadores de melanoma e sua correlação com o estadiamento;
- 3 Correlacionar a expressão das proteínas Rab27a, Rab27b, e TRP2 no tecido tumoral com a quantidade de EVs no plasma de pacientes com melanoma.
- 4 Avaliar a expressão de STI1/HOP em EVs isoladas do plasma de pacientes com melanoma e sua correlação com o estadiamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL (MELANOMA)

Os blocos e as lâminas com tecido tumoral fixado foram disponibilizados pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. O uso deste material foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa da Instituição (1867/14, Anexo 1) que levou em conta o não comprometimento do diagnóstico e a existência de tecido adicional caso fosse necessária à revisão do laudo anatomopatológico. Os dados clínicos e anatomopatológicos foram obtidos a partir de um banco de dados organizado pelo núcleo de Tumores de Pele a partir do prontuário eletrônico dos pacientes. A tabela apresentada no Anexo 2 relaciona os dados clínicos dos pacientes e anatomopatológicos dos respectivos tumores.

- critérios de inclusão: foram selecionados apenas os casos em que os pacientes tinham sido diagnosticados com melanoma no A.C.Camargo Cancer Center.
- critérios de exclusão: foram excluídas as amostras de pacientes que não possuíam representação adequada da neoplasia no bloco de parafina e aquelas provenientes de pacientes submetidos a tratamentos oncológicos prévios à retirada do tumor.

3.2 REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica (IHQ) foram realizadas em cortes histológicos de melanomas utilizando o protocolo de marcação automatizada em sistema Ventana. As reações de desparafinização e recuperação antigênica foram realizadas seguindo o protocolo do sistema. Durante a titulação do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Rab27b (Sigma - #HPA019849 - 1:250), anti-Rab27a (Abnova - #h00005873-m0 - 1:250) e anti-TRP2 (Abcam – policlonal - #ab103463 - 1:200) diluídos em solução comercial antibody diluent da dako (#S080981). Para a revelação da reação, foi utilizado o kit ultraview universal alkaline phosphatase red detection kit, Roche (#760-501) e a seguir as lâminas foram seladas com entellan® (Merk - #1079610100). As lâminas obtidas das reações de imunoistquímica foram escaneadas no equipamento Aperio – Leica Biosystems para montagem das imagens em alta resolução. Todas as análises das imagens foram efetuadas pela patologista Dra Maria Dirlei Begnami que determinou a intensidade relativa de marcação como ausente (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3).

3.3 AMOSTRAS DE PLASMA

Os plasmas foram separados a partir de 15ml de sangue periférico coletados na presença de anticoagulante (BD vacutainer® de citrato de sódio tamponado 0,109 mol/L e 0,105 mol/L (3,2%)). Os pacientes foram

acompanhados no núcleo de câncer de pele do A.C.Camargo Cancer Center e as amostras foram coletadas após a concordância e assinatura, pelos pacientes, do termo de consentimento livre e esclarecido relacionado ao projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (1867/14). Para os pacientes submetidos à cirurgia a amostra foi coletada no momento anterior ao procedimento anestésico e para aqueles seguidos no ambulatório, as amostras foram colhidas no momento da coleta de sangue para análises bioquímicas de rotina. 50 pacientes tiveram seu plasma recolhido para esta análise e seus dados clínicos encontram-se no ANEXO I. Dentre as amostras analisadas, para 14 pacientes, foi possível parear o resultado da marcação no tecido tumoral com as quantidades de EVs obtidas através do plasma do sangue.

3.4 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA DE PACIENTES

As amostras de sangue coletadas em citrato de sódio foram recebidas e processadas por 30 minutos a 2000xg pelo grupo do banco de macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center. Os plasmas levados ao centro de pesquisa foram centrifugados a 12.000xg por 45 minutos para remoção de artefatos celulares. A seguir, os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e centrifugados por 2 horas a 110.000xg a 4°C em Ultracentrífuga Beckman Coulter. Os pellets da ultracentrifugação foram ressuspensos em Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (ATCC®

30-2200™) e filtrados em filtro com poro de 0,45µm (Corning®). A seguir o material foi submetido a uma nova centrifugação de 70 minutos a 110.000xg a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Uma nova centrifugação de 70 minutos a 110.000xg a 4°C foi repetida. Para os experimentos de quantificação de vesículas, os pellets foram ressuspensos em 200µl de D-PBS, enquanto para experimentos de quantificação proteica estes foram ressuspensos em 20 a 50µl de D-PBS.

3.5 NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)

As EVs foram avaliadas quanto ao seu tamanho e quantidade no equipamento Nanosight LM10 (Nanosight Ltd., Amesbury, Reino Unido). O sistema utiliza um feixe de laser fino que passa através da amostra (EVs suspensas em PBS estéril). Partículas que se encontram dentro do feixe são visualizadas utilizando um microscópio óptico convencional, equipado com uma câmara de vídeo. Três vídeos de 30 segundos de duração foram obtidos para cada amostra, e o movimento browniano de partículas analisado por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) software (Nanosight Ltd.). O software é otimizado para que o NTA possa identificar e acompanhar cada partícula em uma base quadro a quadro, e seu movimento browniano é monitorado e medido. A velocidade do movimento de partículas é utilizada para calcular seu tamanho e o software acoplado ao equipamento permite calcular o tamanho e a concentração das vesículas dentro da amostra.

3.6 SDS-PAGE E ENSAIOS DE “IMMUNOBLOTTING”

A análise semi-quantitativa da STI1/HOP foi realizada em extratos proteicos de vesículas isoladas do plasma, lisadas em tampão RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer: 50nM Tris-HCl (pH 7,4) 150nM NaCl 1% NP40, 0,5% SDS e 1nM EDTA) e inibidor de protease (10x) (complete™, mini - Roche) e preparadas em tampão redutor de amostra 4x (Tris-HCl 0,25M, pH 8 10% SDS 20% de glicerol 1mM de EDTA, 5% de β -mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida 10% (3ml de dH₂O, 3ml de lower buffer [Tris-HCl 181,5g, SDS 4g, pH 8,8], 3ml de acrilamida 30%, 50 μ l de APS [ammonium persulfate - 5g APS em 50ml H₂O MiliQ], e 25 μ l de TEMED [N, N, N',N'-tetrametiletenodiamina - #T9281 - Sigma]). A eletroforese foi realizada por 20 min a 75V, seguidos de 120V (fonte Powerpac™ hc high-current power supply – bio-rad®). A transferência foi feita para membrana de nutricelulose 0,45 μ m (nitrocellulose blotting membrane, #10600016 – amersham™ protran™ – GE Healthcare, Life Science) utilizou a mesma fonte descrita acima por 1 hora a 100V. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% +TBS-T [Tris-Buffered Saline contendo tween 20]) por uma hora. A seguir as membranas foram incubadas com anticorpos anti- flotilina (Chemicon - #ab9292 – 1:500) ou anti-STI1/HOP (1:15.000) por 16 h a 4°C. Os anticorpos foram diluídos em leite (Molico®) 5% com TBS-T (Tris-Buffered Saline contendo Tween 20), e incubados *overnight* a 4°C.

Anticorpos secundários foram utilizados na diluição 1:3000 (ECL rabbit IGg HRP-linked #NA9340-1mL e ECL mouse IGg HRP-linked #NA931V - 1mL). As membranas foram incubadas com ECL (Western Blotting substrate - Thermo Scientific - #32209) e reveladas em câmara escura com o kit kodak (Carestream® Kodak® autoradiography RP X-Omat developer/replenisher # Z354104). A membrana foi digitalizada e as bandas quantificadas no software ImageJ.

3.7 COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS POR NITRATO DE PRATA

Para a análise semi-quantitativa das proteínas totais nas vesículas extracelulares, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida, conforme descrito acima. O gel foi então submetido ao protocolo de coloração por prata (Pierce™ Silver Stain kit #24612). O gel foi digitalizado e as bandas quantificadas no software ImageJ.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste utilizado para comparações múltiplas foi One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Enquanto para as comparações entre dois grupos foi utilizado o teste-T de student. Em todas as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 6. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL PROVENIENTES DOS PACIENTES COM MELANOMA

Uma vez que Rab27a e Rab27b possuem papel-chave na secreção dos exossomos, no direcionamento dos MVB para a periferia da célula e em sua ancoragem na membrana plasmática (OSTROWSKI et al. 2009), as duas isoformas foram selecionadas para análise nos tecidos tumorais.

A marcação da proteína Rab27a (Figura 3A) mostrou-se específica do tecido tumoral, a coloração rósea da fosfatase alcalina predominou no citoplasma das células neoplásicas, não havendo marcação no estroma do tecido. Pode-se observar que a marcação de Rab27a foi intensa em toda região basal da lesão, com poucas células pigmentadas no interior do epitélio (Figura 3A). Da mesma forma, a marcação de Rab27b mostrou-se predominantemente citoplasmática, específica do tecido tumoral e com pouca expressão nas células do estroma (Figura 3B).

O marcador TRP2 também foi avaliado por IHQ, e sua expressão foi específica na lesão tumoral (Figura 3C). Na padronização, pode-se observar uma marcação específica e moderada, sem expressão no estroma, com pigmentação citoplasmática e um leve reforço na membrana das células.

Portanto, estes resultados sugerem que a expressão das três proteínas está associada ao tecido tumoral possibilitando inclusive a

verificação de focos ascendentes de melanoma (Figs, 3B e 3C) para a camada mais apical do epitélio.

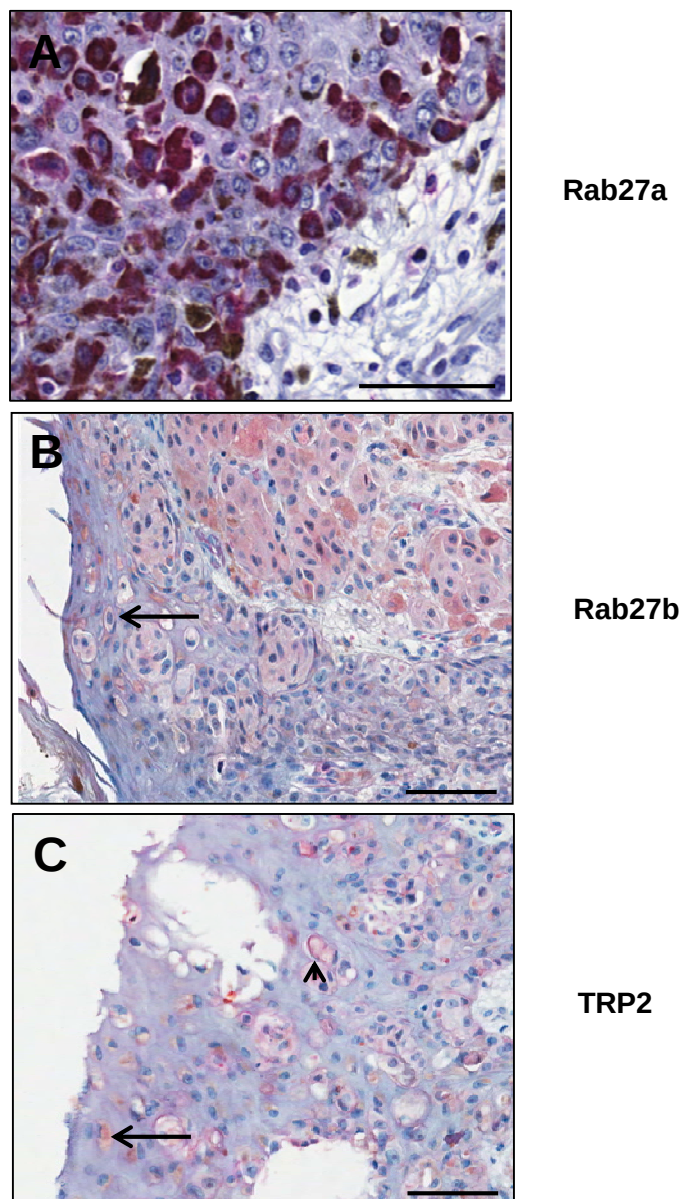


Figura 3 - Perfil de marcação imunohistoquímica para as proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 em cortes de melanoma. A imagem ilustra o perfil de marcação das proteínas de interesse, marcadas em coloração rósea (fosfatase alcalina). A contra-coloração com hematoxilina foi realizada para identificação dos núcleos celulares (coloração violeta). (A) marcação de Rab27a. (B) marcação de Rab27b. A seta representa crescimento ascendente do melanoma. (C) marcação de TRP2, a seta representa crescimento ascendente do melanoma, a cabeça de seta indica marcação mais acentuada de TRP2 na membrana. Barras de escala 50µm.

Após a padronização das reações, todas as amostras de melanoma incluídas no estudo foram avaliadas. Para as 3 proteínas de interesse, a análise da IHQ permitiu definir os níveis de marcação como ausente, fraco, moderado e forte. As Figuras 4, 5 e 6 apresentam fotomicrografias representativas dos diferentes níveis de marcação para as proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2, respectivamente.

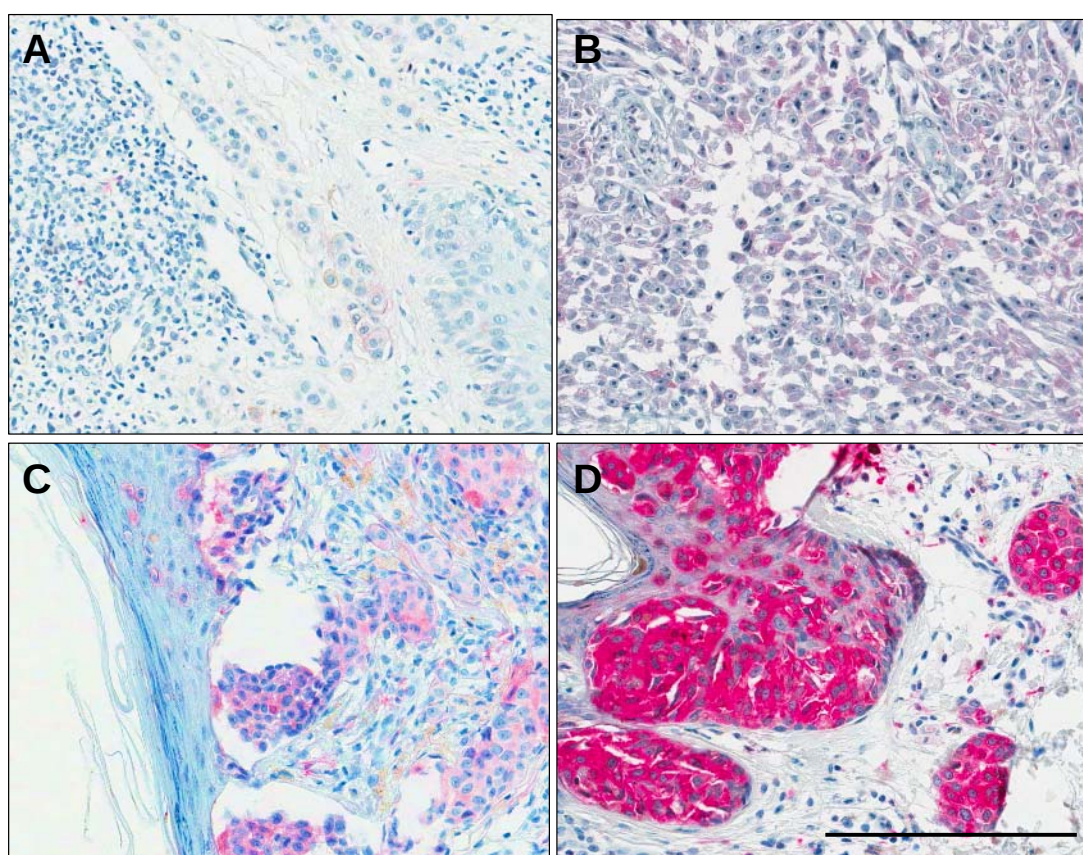


Figura 4 - Níveis de marcação de Rab27a em cortes de melanoma. A figura apresenta imagens representativas dos níveis de marcação de Rab27a considerados como ausente (A), fraco (B), moderado (C) e forte (D). Imagens obtidas no software ImageScope (aumento 10x – barra de escala 200µm).

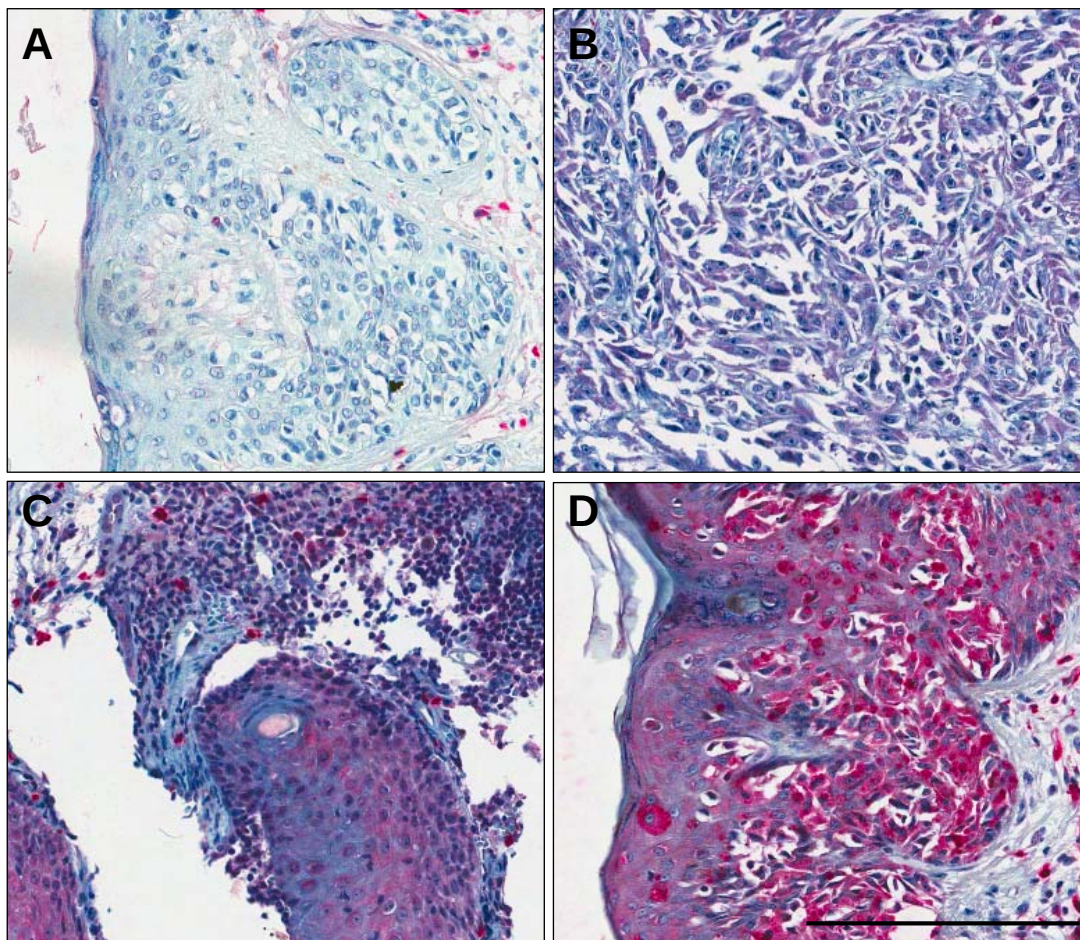


Figura 5 - Níveis de marcação de Rab27b em cortes de melanoma. A figura apresenta imagens representativas dos níveis de marcação de Rab27b considerados como ausente (A), fraco (B), moderado (C) e forte (D). Imagens obtidas no software ImageScope (aumento 10x – barra de escala 200 μ m).

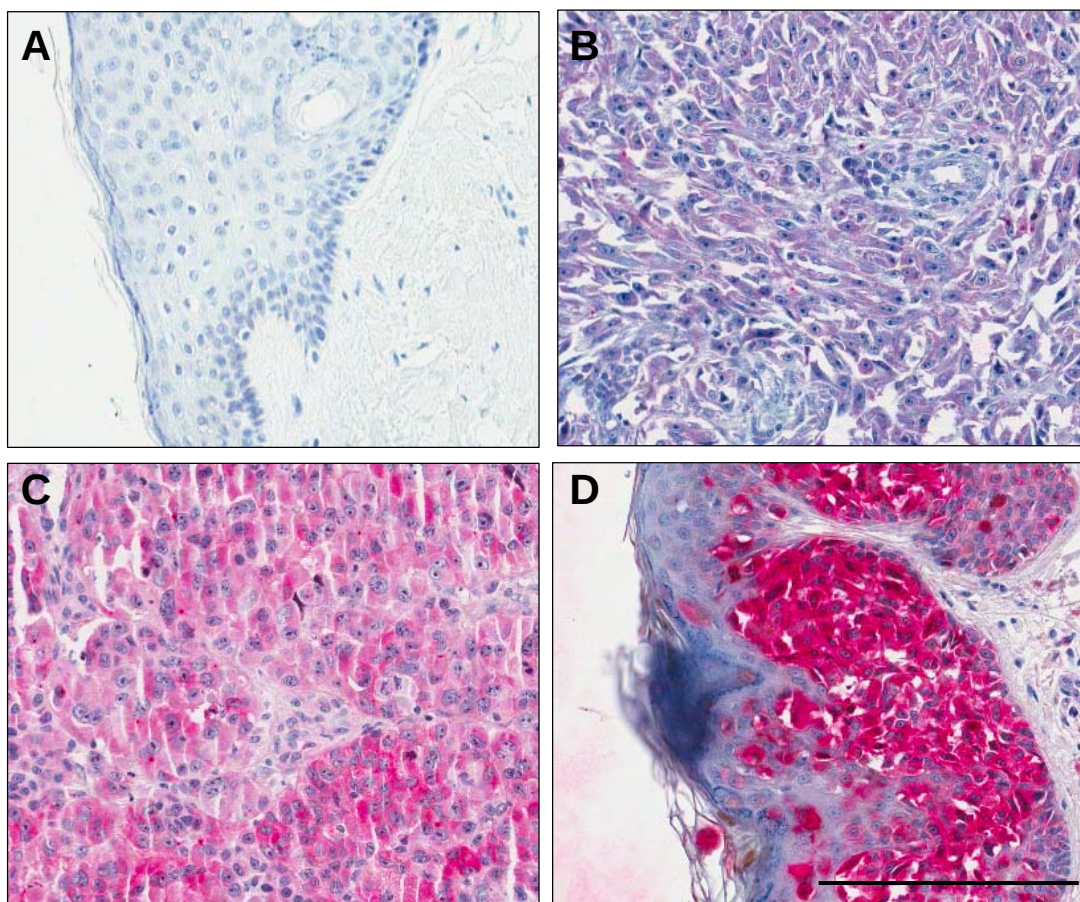


Figura 6 - Níveis de marcação de TRP2 em cortes de melanoma. A figura apresenta imagens representativas dos níveis de marcação de TRP2 considerados como ausente (A), fraco (B), moderado (C) e forte (D). Imagens obtidas no software ImageScope (aumento 10x – barra de escala 200µm).

Dentre todas as amostras do estudo, apenas 14 eram pareadas, ou seja, com disponibilidade de tecido e plasma do mesmo paciente. Para estas amostras, a intensidade de marcação (ausente/fraco ou moderado/forte) foi correlacionada ao estadiamento. Os resultados apresentados na Figura 7 sugerem que a expressão aumentada de Rab27a, Rab27b e TRP2 pode estar associada à progressão da doença.

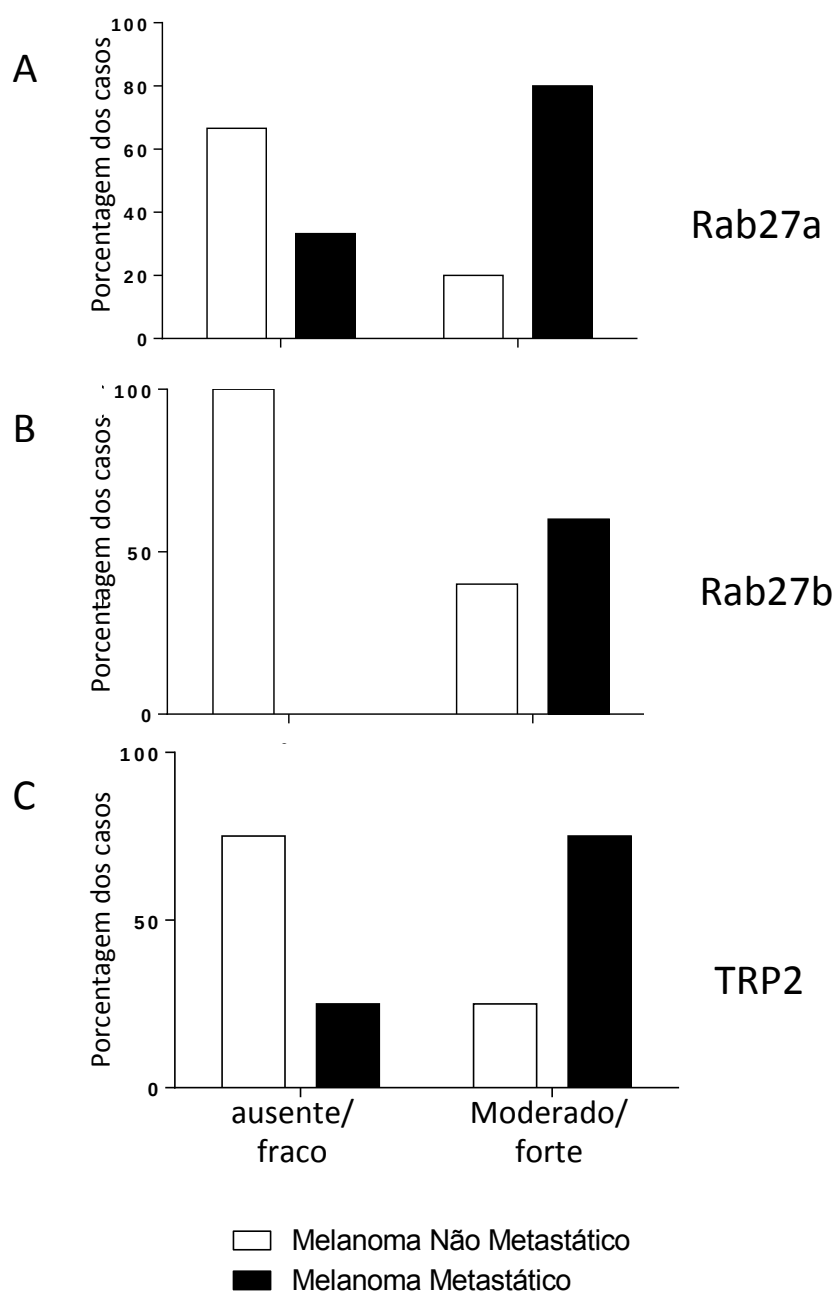


Figura 7 - Correlação do nível de marcação das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 com o estadiamento dos melanomas. Os gráficos ilustram a porcentagem de casos positivos para cada uma das proteínas nos escores ausente/fraco e moderado/forte em casos de melanoma metastáticos ou não. (A) Rab27a ausente/fraco (7 casos) e Rab27a moderado/forte (7 casos); (B) Rab27b ausente/fraco (11 casos) e Rab27b moderado/forte (3 casos); (C) TRP2 ausente/fraco (4 casos) e TRP2 moderado/forte (10 casos). Dentro dos grupos de escore patológico, a soma dos casos é igual a 100%.

4.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PLASMA PROVENIENTES DOS PACIENTES COM MELANOMA

O protocolo de ultracentrifugação foi escolhido para o isolamento de EVs, em particular exossomos, com a finalidade de reduzir contaminação da amostra com grandes quantidades de complexos proteicos e anticorpos do soro (THÉRY et al. 2006).

Após o isolamento das EVs do plasma proveniente de 50 pacientes, delineamos um perfil geral do seu tamanho (Figura 8). A maior concentração de EVs entre os tamanhos de 50 a 199nm, com um pico na faixa de 100 a 150 nm, sugere que uma fração importante das vesículas separadas estão na faixa de tamanho dos exossomos.

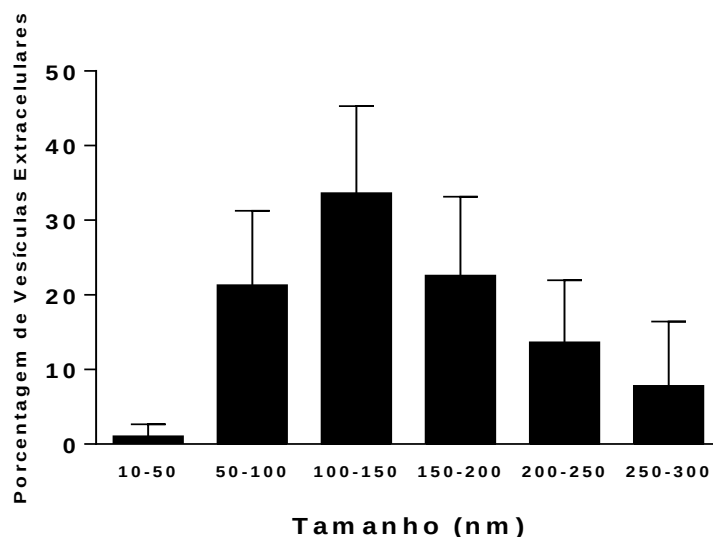


Figura 8 - Perfil do tamanho das Vesículas Extracelulares Provenientes do Plasma de Pacientes com Melanoma. Quantificação da porcentagem de vesículas extracelulares distribuídas em intervalos de tamanho (nanômetros). As vesículas extracelulares foram isoladas por protocolo de ultracentrifugação e a análise foi realizada pela técnica de Nanoparticle Tracking Analysis em microscópio NanoSight (n=50).

Concomitantemente com o perfil da EVs, a concentração/ml das mesmas no plasma foi calculada e representada de acordo com o estadiamento dos pacientes (Fig 9), com o objetivo de analisar se existe uma correlação entre a concentração das EVs no plasma e o estadiamento tumoral (Figura 9). Os resultados mostram que a variação maior aconteceu em três amostras do estadio I que continham entre 10^8 e 5×10^9 vesículas/ml de plasma. Mas que não existe variação consistente entre o número de EVs e o estadio da doença.

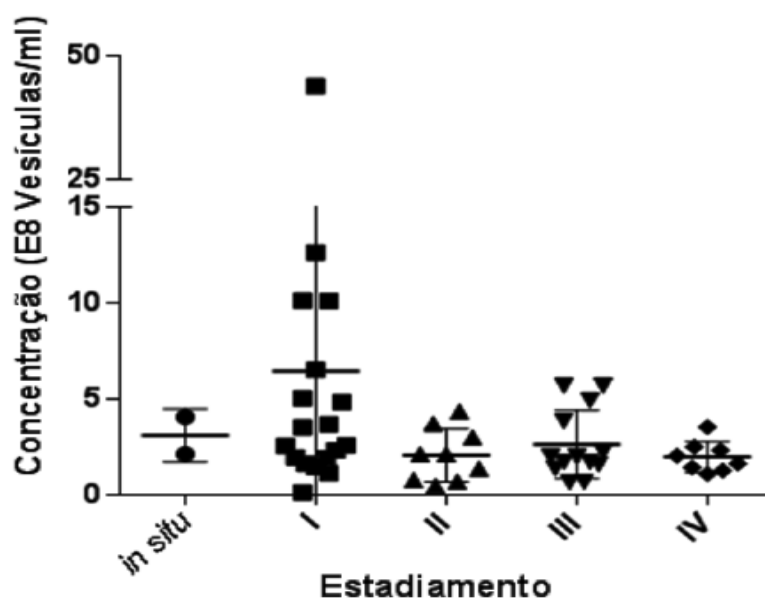


Figura 9 - Concentração de EVs no plasma de pacientes portadores de melanoma de acordo com o estadio tumoral. Representação da concentração das vesículas extracelulares (10^8 vesículas por mL de plasma) distribuídas de acordo com o estadiamento do tumor primário do paciente do qual a amostra de plasma foi obtida. As vesículas extracelulares do plasma foram isoladas pelo protocolo de ultracentrifugação e quantificadas pela técnica de Nanoparticle Tracking Analysis em microscópio NanoSight (n=50).

O próximo passo foi avaliar a correlação entre a expressão das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 no tecido tumoral e o número de EVs presentes no plasma destes pacientes (Figura 10). As amostras pareadas de cada paciente foram analisadas. A Figura 10 mostra que não foi possível observar uma correlação entre a concentração de vesículas no plasma e a expressão de Rab27a, Rab27b e TRP2 nos tumores.

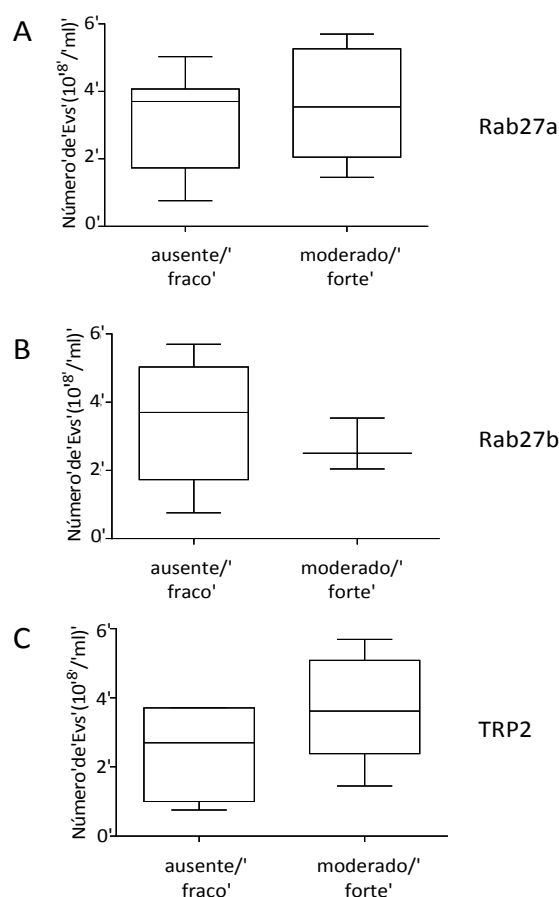


Figura 10 - Correlação da intensidade de marcação das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 com relação a concentração de vesículas extracelulares circulantes no plasma. A expressão das proteínas (A) Rab27a, (B) Rab27b e (C) TRP2 no tecido tumoral foi classificada como ausente/fraca ou moderada/forte e correlacionada com as concentrações de EVs presentes no plasma dos pacientes. Foram usadas amostras pareadas de tecido e plasma dos mesmos pacientes(n=14).

A partir destes resultados, foi formulada a hipótese de que o carregamento proteico das EVs poderia estar envolvido na progressão tumoral e formação de metástase, assim como previamente descrito (PEINADO et al. 2012). Dessa forma, as proteínas do extrato de 10^7 vesículas provenientes de 20 pacientes portadores de melanoma nos diferentes estadiamentos (*in situ*, I, II, III e IV) foram separadas por SDS-PAGE num total de 3 géis. Estas foram então coradas por nitrato de prata e quantificadas (Figura 11). Os resultados apontaram uma grande variação no conteúdo proteico total das EVs, o que não permitiu observar diferenças significativas desta variável entre diferentes estadios da doença.

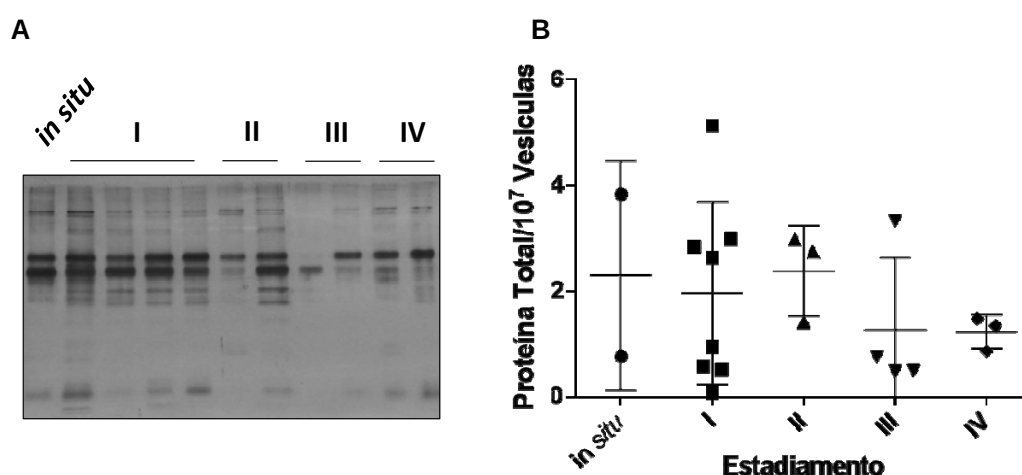


Figura 11 - Total de Proteínas Carregadas pelas EVs circulantes no plasma de pacientes portadores de melanoma. (A) Representação de um dos 3 géis de SDS-PAGE carregado com as proteínas provenientes de 10^7 EVs circulantes no plasma de pacientes portadores de melanoma em diferentes estadios após coloração por nitrato de prata. (B) O gráfico ilustra a quantificação (em unidades arbitrárias) dos géis de prata, representando o carregamento proteico das EVs provenientes do plasma de pacientes portadores de melanoma de estádios *in situ* (n=2), estadio I (n=8), estágio II (n=3), estágio III (n=4) e estadio IV (n=3).

É sabido que algumas proteínas presentes nas EVs apresentam atividade específica no processo tumoral e sua concentração nas EVs pode determinar a progressão da doença (PEINADO et al. 2012). Dado o interesse do grupo na proteína STI1/HOP e o fato desta estar associada a EVs (HAJJ et al. 2013) decidimos avaliar seu conteúdo nas EVs circulantes no plasma de pacientes portadores de melanoma. Além disso, avaliamos também a proteína flotilina, que está presente em *lipid rafts* e tem um papel importante na organização destas plataformas e que apesar de ser considerada um marcador de exossomos, seu possível papel no processo tumoral ainda é desconhecido.

O isolamento das EVs respeitou o mesmo protocolo realizado para sua quantificação e análise de perfil. Para tal, foram utilizadas 20 amostras de EVs derivadas de plasma de pacientes portadores de melanoma abrangendo todos os estadiamentos (*in situ*, I, II, III e IV). As amostras são as mesmas usadas para o experimento da Figura 11 e estas foram divididas em 3 géis sendo que cada uma delas continha extrato proteico de 10^7 EVs que foi avaliado por *western blot* usando-se anticorpos anti-STI1/HOP e anti-flotilina. A figura 12A mostra um *western blot* representativo dos 3 realizados onde se observa a presença de flotilina e de STI1/HOP nas amostras e em 12B as concentrações relativas de STI1/HOP nas EVs provenientes do plasma p de pacientes portadores de melanomas estadiados de I a IV em relação aos melanomas *in situ*.

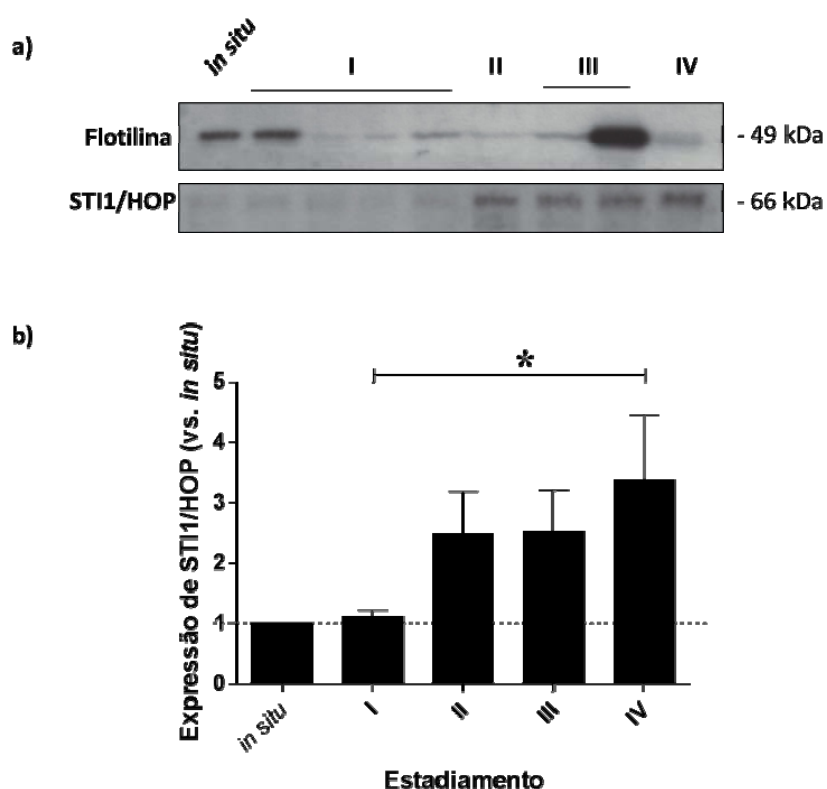


Figura 12 - Análise Quantitativa da Expressão de STI1/HOP em EVs de plasma de pacientes portadores de melanoma. (A) Imagem representativa da expressão de Flotilina (bandas de 49 kDa) e STI1/HOP (bandas de 66 kDa) em 10^7 EVs pelo método de Western-blot de acordo com o estadiamento do tumor. (B) Expressão relativa de STI1/HOP em EVs do plasma de pacientes com melanoma estadiamento I a IV comparados ao melanoma *in situ*. Estádios *in situ* (n=2), estadio I (n=8), estágio II (n=3), estágio III (n=4) e estágio IV (n=3). (n=20). * p=0,01).

Os resultados mostram que a secreção de STI1/HOP em vesículas extracelulares é maior em estádios mais avançados, revelando uma diferença estatística significativa entre os estadio II a IV e o estágio I e *in situ*. Sugerindo, portanto, que a presença de HOP nas vesículas poderia ter um papel na progressão tumoral.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo inicial determinar se a expressão de proteínas associadas a formação e secreção de EVs no tecido tumoral estava correlacionada a progressão dos melanomas. Os resultados obtidos mostraram que a marcação de Rab27a, Rab27b e TRP2 era mais intensa nos tumores metastáticos (estádios III e IV) do que nos não metastático (*in situ*, e estádios I e II). Dados da literatura mostraram a redução da expressão de Rab27a em células de melanoma tratadas com o fator pigmentar derivado do epitélio (do inglês, PEDF), o qual apresenta atividades anti-metastáticas (ORGAZ et al. 2011). Além disso, a importância de Rab27a na progressão tumoral está, não apenas na secreção das EVs, mas na modulação do microambiente tumoral em tumores de mama onde esta pode induzir a secreção do fator de crescimento tipo insulina e promover invasão e metástase (WANG et al. 2008; BOBRIE et al. 2012). Da mesma forma, alta expressão de Rab27b foi considerada como um fator preditivo de metástase no câncer colorretal (BAO et al. 2014) e com um pior prognóstico em pacientes com câncer de pâncreas (ZHAO et al. 2016). Além disso, sua expressão em tumores pancreáticos está associada a uma menor sobrevida (ZHAO et al. 2016). Por sua vez, a expressão nuclear da Rab27b é fator prognóstico em tumores gastrointestinais do tipo estromal (WANG et al. 2014). Adicionalmente, a proteína TRP2, que é um marcador para melanócitos com expressão mais elevada em melanócitos transformados do

que nos melanócitos normais, foi descrita aumentada em estádios mais avançados da doença, mais especificamente a partir do estadio III (PAK et al. 2004; PEINADO et al. 2012).

Neste estudo conduzimos uma avaliação pareada entre a expressão de Rab27a, Rab27b e TRP2 no tecido tumoral e o número de EVs presente no plasma dos mesmos pacientes, um total de 14 pacientes foram avaliados. Os dados obtidos mostraram que não houve correlação entre a expressão destas proteínas e o número de EVs no plasma. Desta forma podemos sugerir que estas proteínas apresentam outras funções relacionadas com a progressão tumoral que não somente a secreção de vesículas. Por outro lado, devemos levar em conta a limitação do isolamento de EVs derivadas do tumor do pool total de vesículas existentes no plasma, o que pode mascarar as vesículas derivadas das células tumorais.

A análise de EVs baseada no movimento Browniano das partículas permite a quantificação da distribuição e tamanho e, apesar dos valores de tamanho apresentados na literatura, é importante reforçar que na prática, esse perfil possui variações visto que fluidos biológicos, como plasma são compostos por uma mistura de EVs provenientes de diversos tipos celulares (GERCEL-TAYLOR et al. 2012).

Nossos dados obtidos pela técnica de Nanoparticles Tracking Analysis (NTA), referentes ao perfil das EVs que compõem as amostras de plasma, que nos mostra um pico médio de vesículas na faixa de 100 a 150 nm, são corroborados por dados da literatura, que indicam que exossomos provenientes de células derivadas da medula óssea (BMDCs) apresentam o

pico de tamanho em 90 nm (EL ANDALOUSSI et al. 2012). Outros trabalhos que fornecem dados obtidos pela NTA referente aos exossomos isolados através do meio de cultura de células endoteliais (HUVEC) e glioblastomas (U87) possuem na prática um tamanho que varia entre 100 e 200nm (SHELDON et al. 2010).

Mais especificamente para EVs provenientes de plasma, é estabelecido na técnica de NTA o isolamento de EVs que variam entre 70-120 nm (GARDINER et al. 2013; VARGA et al. 2014). No trabalho de PEINADO et al. (2012), as EVs isoladas do plasma de pacientes em estadiamento IV de melanoma e do grupo controle sem a doença estão distribuídas entre 10 e 330nm com pico de concentração no intervalo de 110 e 150nm, valores bem próximos aos obtidos no presente estudo, revelando uma reprodutibilidade dos dados.

É sabido que o plasma humano livre de plaquetas e proveniente de um indivíduo saudável contém aproximadamente $1,5 \times 10^{13}$ partículas por ml, porém 98% dessas partículas lipoproteicas não são isoladas no processo de ultracentrifugação, restando portanto aproximadamente 5×10^9 partículas por ml de plasma (GARDINER et al. 2013). Estudos indicam que as concentrações de exossomos no plasma de pacientes portadores de alguns tipos de câncer encontram-se elevados quando comparados a controles saudáveis (ZHANG et al. 2015). Em tumores de ovário, por exemplo, foi observada uma correlação positiva entre o número de exossomos e o estadiamento (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR 2008).

Buscando identificar alguma diferença significativa entre a

concentração de vesículas e o estadiamento da doença, nossos dados de quantificação pela técnica de NTA revelaram que para nosso grupo amostral (50 amostras), não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros avaliados. Esse dado vai ao encontro das análises do trabalho de PEINADO et al. (2012) que não observaram diferença estatisticamente significativa no número de partículas por ml de plasma entre os estádios III e IV quando comparados entre si ou em relação aos controles saudáveis.

Nesse aspecto, vale ressaltar que o número de EVs presentes no plasma de pacientes com tumores de diferentes estadios representa uma mistura de vesículas provenientes de plaquetas e diversos tipos celulares como células inflamatórias, além de outras, e não apenas do tumor. Esta composição heterogênea de vesículas pode mascarar aquelas vindas das células tumorais impedindo a avaliação específica dessas últimas. É importante ressaltar ainda que as células tumorais podem secretar diferentes tipos de exossomos que controlam várias etapas da colonização e progressão tumoral (TAURO et al. 2013). Uma vez que a composição proteica das EVs reflete a célula de origem estas podem apresentar marcadores específicos e um grande número de estudos vem tentando separar EVs que expressem antígenos tumor-específicos (YANG e ROBBINS 2011). No caso de melanomas, tem sido explorado o fato de EVs derivadas de melanomas conterem moléculas envolvidas na síntese de melanina (ZHANG e GRIZZLE 2014).

Desta forma é crucial que se estabeleçam metodologias que

permitam isolar, a partir do sangue periférico, vesículas derivadas apenas das células tumorais. Enquanto isso a caracterização de marcadores específicos de prognóstico, resposta terapêutica ou ainda novos alvos terapêuticos fica comprometida.

Neste estudo foi avaliada ainda a diferença entre o conteúdo proteico de vesículas provenientes do plasma de pacientes com melanomas em diferentes estádios. Os dados obtidos mostraram não haver diferença estatisticamente significativa para esta variável. Este dado está em desacordo com aquele observado por PEINADO et al. (2012) que apontou que a concentração de proteínas exossomais era maior em pacientes do estágio 4 quando comparado com outros estadiamentos ou ainda aos controles saudáveis.

Avaliando a composição proteica das EVs presentes no plasma de pacientes portadores de melanoma observamos que estas contem a proteína STI1/HOP. Estes dados reforçam resultados anteriores do grupo que mostraram que astrócitos normais e células de glioblastoma secretam STI1/HOP (HAJJ et al. 2013; LOPES et al. 2015) e que seu mecanismo de secreção acontece por seu empacotamento em EVs do tipo exossomos (HAJJ et al. 2013). Interessantemente, nossos resultados apontam que a quantidade de STI1/HOP associada a EVs está correlacionada com o estadiamento do melanoma, isto é, tumores de estadio II, III e IV secretam no plasma EV com maiores quantidades de STI1/HOP do que os tumores *in situ* ou estadio I. Estudo recente do nosso grupo correlacionou a expressão de STI1/HOP com a proliferação tumoral e com a menor sobrevida de

pacientes com glioblastomas (LOPES et al. 2015). Entretanto não se conhece se exossomos provenientes destes tumores contem concentrações maiores de STI1/HOP.

Os dados apresentados no presente trabalho apontam que STI1/HOP secretada em EVs pode ter um papel importante tanto enquanto marcador como na biologia dos melanomas e que portanto, merece ser melhor explorado.

6 CONCLUSÕES

- 1 As proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 apresentam expressão aumentada em melanomas metastáticos (estádios III e IV) quando comparadas a melanomas não metastáticos. (*in situ* ou estádios I e II)
- 2 Não foram observadas diferenças significativas no número de EVs bem como no carregamento proteico total das EVs provenientes do plasma de pacientes portadores de melanomas em diferentes estadiamentos;
- 3 Não foi possível estabelecer uma correlação entre a quantidade de vesículas secretadas no plasma dos pacientes com melanomas e a intensidade de marcação das proteínas Rab27a, Rab27b e TRP2 no tecido tumoral bem como na progressão do tumor.
- 4 Foi observado um aumento da expressão de STI1/HOP nas vesículas extracelulares isoladas do plasma de pacientes com melanoma em estádios mais avançados (II, III e IV) em comparação ao estágio I e os *in situ*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS]. American Cancer Society. **What are the key statistics about melanoma?** Available from:

<URL:<http://www.cancer.org/Cancer/SkinCancer-Melanoma/DetailedGuide/melanoma-skin-cancer-key-statistics>> [2015 dez 7]

Amselgruber WM, Buttner M, Schlegel T, Schweiger M, Pfaff E. The normal cellular prion protein (PrPc) is strongly expressed in bovine endocrine pancreas. **Histochem Cell Biol** 2006; 125:441-8.

Antonacopoulou AG, Grivas PD, Skarlas L, Kalofonos M, Scopa CD, Kalofonos HP. POLR2F, ATP6V0A1 and PRNP expression in colorectal cancer: new molecules with prognostic significance? **Anticancer Res** 2008; 28:1221-7.

Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:15336-41.

Azoury C, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. **Surg Clin N Am** 2014; 94:945-62.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

Bao J, Ni Y, Qin H, et al. Rab27b is a potential predictor for metastasis and prognosis in colorectal cancer. **Gastroenterol Res Pract** 2014; 2014:913106.

Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, et al. Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. **Cancer Res** 2012; 72:4920-30.

Chapman PB, Yang AS. The history and future of chemotherapy for melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009. 23:583-97.

Chiaverini C, Beuret L, Flori E, et al. Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. **J Biol Chem** 2008; 283:12635-42.

Coghlin C, Murray GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. **J Pathol** 2010; 222:1-15.

Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nat Cell Biol** 2015; 17:816-26.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. **Br J Dermatol** 2002; 146 Suppl 61:1-6.

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine** 2011; 7:780-8.

El Andaloussi SE, Lee Y, Lakhali-Littleton S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. **Nat Protoc** 2012; 7:2112-26.

El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov** 2013; 12:347-57.

Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-8.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle** 2004, 3:1098-100.

Flom G, Behal RH, Rosen L, Cole DG, Johnson J L. Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and in vivo functions. **Biochem J** 2007; 404:159-67.

Gardiner C, Ferreira YJ, Dragovic RA, Redman CW, Sargent IL. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. **J Extracellular Vesicles** 2013 2:19671.

Gassart A, Géminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic** 2004; 5:896-903.

Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. **Anal Biochem** 2012; 428:44-53.

Gloster HM Jr, Neal K. Skin cancer in skin of color. **J Am Acad Dermatol** 2006. 55:741-60; quiz 61-4.

Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2013; 70:3211-27.

Houben R, Schmid CP, Maier M, et al. p53 regulation by TRP2 is not pervasive in melanoma. **PloS One** 2014, 9:e87440.

Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, et al. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. **Nephrology** 2005; 10:283-90.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J Biol Chem** 1987; 262:9412-20.

Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:239-52.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature** 2005; 438:820-7.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett** 2006; 107:102-8.

Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem** 1997;272:1876-84.

Li C, Yu S, Nakamura F, et al. Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. **J Clin Invest** 2009; 119:2725-36.

Liang J, Pan Y, Ning XX, et al. Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. **Tumour Biol** 2006a; 27:84-91.

Liang J, Pan Y, Zhang D, et al. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. **Faseb J** 2006b; 21:2247-56.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Longshaw VM, Dirr HW, Blatch GL, Lassle M. The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. **Biol Chem** 2000; 381:1133-8.

Lopes MH, Santos TG, Rodrigues BR. Disruption of prion protein–HOP engagement impairs glioblastoma growth and cognitive decline and improves overall survival. **Oncogene** 2015; 34:3305-14

Mathivanan S, Hong J, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics** 2010; 73:1907-20.

Martins VR. Prion protein signaling as therapeutic target in human tumors. **BMC Proc** 2013; 7 Suppl 2:K23.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Curr Opin Oncol** 2013; 25:66-75.

Mcewan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. **Tumour Biol** 2009; 30:141-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2015: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Murray GI, Telfer CM, Melvin WT. Markers for colorectal cancer. United States Patent Application Publication 2006, C12Q1/68; G01N33/574 ed., Vol. US 2006/0188883 A1: 1-20. United States.

Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Int J Dermatol** 2010; 49:978-86.

Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. **J Biol Chem** 2003; 278:52347-54.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:148-55.

Noerholm M, Balaj L, Limperg T, et al. RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. **BMC Cancer** 2012; 12:22.

Odunuga OO, Longshaw VM, Blatch GL. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays** 2004; 26:1058-68.

Orgaz JL, Benguria A, Sanchez-Martinez C, Ladhani O, Volpert OV, Jimenez B. Changes in the gene expression profile of A375 human melanoma cells induced by overexpression of multifunctional pigment epithelium-derived factor. **Melanoma Res** 2011; 21:285-97.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol** 2010; 12:19-30.

Pak BJ, Lee J, Thai BL, et al. Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. **Oncogene** 2004; 23:30-8.

Pan Y, Zhao L, Liang J, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. **FASEB J** 2006; 20:1886-8.

Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. **Transplantation** 2003; 76:1503-10.

Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nat Med** 2012; 18:893-91.

Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. **Mol Cell Proteomics** 2006; 5:1760-771.

Porto-Carreiro I, Février B, Paquet S, Vilette D, Raposo G. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. **Blood Cells Mol Dis** 2005; 35:143-8.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:285-93.

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med** 1996; 183:1161-72.

Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. **Biochim Biophys Acta** 2014; 1841:108-20.

Rodrigues BR. **Regulação da atividade de STAT3 e o papel da proteína STI1/Hop secretada em glioblastoma.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, et al. Melanoma. **Nat Rev Disease Primers** 2015; 1.

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell** 2000; 101:199-210.

Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. **Blood** 2010 116: 2385-94.

Sin JI, Kim H, Ahn E, et al. Combined stimulation of TLR9 and 4.1 BB augments Trp2 peptide vaccine-mediated melanoma rejection by increasing Ag-specific CTL activity and infiltration into tumor sites. **Cancer Lett** 2013, 330;190-9.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol** 2008; 10:1470-6.

Smalheiser NR. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. **Biol Direct** 2007; 2:35.

Somasundaram R, Herlyn M. Melanoma exosomes: messengers of metastasis. **Nat Med** 2012; 18:853-4.

Song Y, Masison DC. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **J Biol Chem** 2005; 280:34178-85.

Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. **Mol Cell Proteomics** 2013; 12:587-98.

Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. **Dev Neurobiol** 2007; 67:1815-29.

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2008; 110:13-21.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol** 2007; 9:654-9.

Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, et al. Towards traceable size determination of extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles** 2014 Feb 4;3.

Wang JS, Wang FB, Zhang QG, Shen ZZ, Shao ZM. Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II. **Mol Cancer Res** 2008; 6:372-82.

Wang Q, Ni Q, Wang X, Zhu H, Wang Z, Huang J. High expression of RAB27A and TP53 in pancreatic cancer predicts poor survival. **Med Oncol** 2015; 32:1-9.

Wang W, Ni Q, Wang H, Zhang S, Zhu H. Prognostic value of Rab27B nuclear expression in gastrointestinal stromal tumors. **Dis Markers** 2014; 2014:942181.

[WHO] World Health Organization. **Health effects of UV radiation/skin cancer**. Available from: <URL:<http://www.who.int/en/>> [2015 jul 31].

Wu X, Hu A, Zhang M, Chen Z. Effects of Rab27a on proliferation, invasion, and anti-apoptosis in human glioma cell. **Tumour Biol** 2013; 34:2195-203.

Yang C, Robbins PD. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. **Clin Dev Immunol** 2011; 2011:842849.

Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. **Cancer Res** 2006; 66:4795-4801.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **Embo J** 2002; 21:3307-16.

Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. **Am J Pathol** 2014; 184:28-41.

Zhang T, Hamza A, Cao X, et al. A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:162-70.

Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. **J Hematol Oncol** 2015; 8:1-13.

Zhang Y, Wang XF. A niche role for cancer exosomes in metastasis. **Nat Cell Biol** 2015; 17:709-11.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic-cell-derived exosomes. **Nat Med** 1998; 4:594-600.

Zhao H, Wang Q, Wang X, et al. Correlation between RAB27B and p53 expression and overall survival in pancreatic cancer. **Pancreas** 2016; 45:204-10.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 06 de março de 2014.

A

Dra. Vilma Regina Martins.

Aluna: Juliana Rocha Belmiro Batista (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1867/14

“avaliação da expressão de proteínas envolvidas na biogênese de vesículas extracelulares em melanomas humanos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/02/2014, **aprovaram** a realização do projeto (datado de 13 de novembro de 2013), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 1.0 – Fevereiro de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração Sobre o Plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Cutânea;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado;

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Tabela dos dados clínicos dos pacientes com melanoma utilizados no estudo.

RGH	Gênero	Data diagnóstico	Breslow (mm)	Estadiamento	Metástase	Data última consulta	Status
10495860	M	23/05/2011	0	0	Não	14/04/2014	Vivo sem doença
10791460	F	21/12/2011	0	0	Não	01/07/2014	Vivo sem doença
10463140	M	13/04/2011	0	0	Não	13/07/2011	Vivo sem doença
10495860	M	23/05/2011	0	0	Não	14/04/2014	Vivo sem doença
13306480	F	08/12/2014	0	0	n.i.	23/01/2015	Vivo sem doença
12154490	M	23/09/2013	0.49	IA	Não		Desconhecido
10630980	M	17/08/2011	0.6	IA	Não	31/10/2011	Vivo sem doença
12079490	M	19/08/2013	0.99	IA	Não	09/04/2014	Vivo com doença
12649580	F	15/05/2014	0,6	IA	Não	15/01/2015	Vivo sem doença
8077140	F	23/01/2015	0,43	IA	Não	13/02/2015	Vivo sem doença
13628040	F	07/04/2015	0.72	IA	Não	15/02/2016	Vivo sem doença
12135620	M	04/09/2013	0.18	IA	Não	02/05/2014	Vivo sem doença
12041620	F	06/08/2013	1.1	IB	Não	11/06/2014	Vivo sem doença
10540380	F	02/06/2011	1.2	IB	Não	05/02/2014	Vivo sem doença
10501500	M	01/06/2011	1.2	IB	Não	05/11/2012	Vivo sem doença
10501500	M	01/06/2011	1.2	IB	Não	05/11/2012	Vivo sem doença
12288610	M	12/11/2013	0,95	IB	Não	30/06/2014	Vivo sem doença
12328230	M	13/12/2013	1,3	IB	Não	25/06/2014	Vivo sem doença
12474260	F	13/03/2013	1	IB	Não	25/06/2014	Vivo sem doença
12431640	M	14/03/2014	1,9	IB	Não	13/05/2014	Vivo sem doença
12514410	F	12/03/2014	1,1	IB	Não	03/06/2014	Vivo sem doença
13584620	M	19/03/2015	1,18	IB	Não		Desconhecido
13604780	F	24/03/2015	1.2	IB	Não	02/12/2015	Vivo sem doença
10535690	M	09/06/2011	1.3	IB	Não	14/03/2014	Vivo sem doença
10898620	F	05/04/2012	2.05	IIB	Não	28/07/2014	Vivo sem doença
11922500	M	17/06/2013	5.5	IIB	Não	15/01/2014	Vivo sem doença
12614370	F	17/04/2014	3	IIB	Não	06/08/2014	Vivo sem doença
12612110	M	16/05/2014	2,2	IIB	Não	17/03/2015	Vivo sem doença
11922500	M	17/06/2013	5.5	IIB	Não	15/01/2014	Vivo sem doença
5023360	M	04/02/2013	0.22	IIIA	Não	15/05/2014	Vivo sem doença
12381030	M	11/04/2014	2,3	IIIA	Sim	15/04/2014	Vivo com doença
13473130	M	30/01/2015	5	IIIA	Sim		Desconhecido
5023360	M	04/02/2013	0.22	IIIA	Não	15/05/2014	Vivo sem doença
11860180	F	31/05/2013	3.1	IIIA	Não	04/06/2014	Vivo sem doença
13007010	M	19/05/2014	6,4	IIIB	Não	27/01/2015	Vivo sem doença
10931750	M	20/03/2012	4.4	IIIC	Sim	15/08/2014	Vivo sem doença
10599330	F	27/07/2011	0.7	IIIC	Não		Desconhecido
90030150	F	13/10/2011	9	IIIC	Sim	05/02/2012	Óbito por outras causas
10826880	M	26/01/2012	n.i.	IV	Sim	01/02/2013	Óbito por Câncer
9278640	M	n.i.	2	IV	Sim	21/01/2015	Vivo com doença
10970540	F	22/03/2013	0.85	IV	Sim	01/07/2014	Vivo com doença
8053650	M	18/03/2011	1.58	IV	Sim	06/03/2013	Óbito por Câncer
10970540	F	22/03/2013	0.85	IV	Sim	01/07/2014	Vivo com doença
11542310	M	03/01/2005	4,4	IV	Sim	31/07/2014	Vivo com doença
99042037	F	27/08/2008	9.7	IV	Sim	12/10/2013	Óbito por Câncer
12279600	M	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	30/10/2013	Vivo com doença
12485280	F	17/03/2014	n.i.	n.i.	n.i.	30/07/2014	Vivo sem doença
12494240	F	28/03/2014	n.i.	n.i.	n.i.	21/03/2014	Desconhecido
1358462	F	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.		Desconhecido
12569770	F	12/02/2015	n.i.	n.i.	n.i.	13/03/2015	Vivo com doença

Os casos destacados em negrito são das 14 amostras que havia disponibilidade de tecido e plasma. n.i.: não informado; M: masculino; F: feminino