

THAIOMARA ALVES SILVA

**AHNAK REGULA A FORMAÇÃO E TROCA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES ENTRE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA
E FIBROBLASTOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas

Versão original

**São Paulo
2015**

RESUMO

SILVA, T. A. **AHNAK regula a formação e troca de vesículas extracelulares entre células tumorais de mama e fibroblastos.** 2015. 115 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer de mama é uma patologia genética, comum entre as mulheres, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo. O sucesso no desenvolvimento de tumores não depende apenas de mutações celulares, mas também é dirigido pelo microambiente tecidual onde ocorrem as interações entre as células tumorais e seu estroma circundante. A comunicação entre as células epiteliais e estromais é importante para a regulação da proliferação, do comportamento invasivo, dos processos angiogênicos e metastáticos de células cancerosas. A maioria das células liberam estruturas vesiculares para o espaço extracelular, no qual estariam envolvidas na sinalização celular e na progressão tumoral. As vesículas extracelulares são estruturas esféricas com bicamada proteolipídica e em seu interior existem diversas moléculas bioativas, metabólitos, lipídios, proteínas e material genético, que refletem a condição e o tipo celular de origem. O objetivo deste estudo foi analisar as interações mediadas por vesículas extracelulares entre as células tumorais e fibroblastos normais de mama, bem como, caracterizar as estruturas vesiculares derivadas de células tumorais de mama, determinando o número, tamanho, composição e supostas funções das proteínas destas vesículas; verificar o papel destas vesículas na proliferação celular. As células tumorais foram co-cultivadas com fibroblastos e cada uma das linhagens carregadas com diferentes corantes vitais. Nossos resultados evidenciaram a presença e a troca de vesículas entre as células tumorais e os fibroblastos de mama em co-cultura. Através das imagens obtidas por MET foi possível a visualização de protrusões das células cultivadas em monocultura, que possivelmente poderiam originar as vesículas, mostrando que as células tumorais apresentam mais protrusões do que os fibroblastos normais. Vesículas isoladas das células tumorais mostraram tamanhos e densidade heterogêneos. Células tumorais apresentaram maiores concentrações de vesículas que as células normais. A seguir, observamos o papel das vesículas extracelulares isoladas da linhagem celular tumoral MDA-MB-231 em algumas linhagens celulares e vimos que as vesículas induziram a proliferação celular de MCF-7, por meio da ativação da via de sinalização ERK 1/2. A análise proteômica mostrou que vesículas extracelulares derivadas de células tumorais de mama MDA-MB-231 são compostas pela proteína AHNAK, e esta, está distribuída no citoplasma (ao longo da membrana plasmática) e em vesículas das células tumorais de mama. Assim, decidimos silenciar a proteína AHNAK e verificar suas possíveis funções. Observamos que o silenciamento de AHNAK levou à redução da migração, invasão celular e a troca de vesículas, além da diminuição do número de protrusões celulares e da produção de vesículas. Com isso, estabelecemos um possível papel para AHNAK na produção e na troca de vesículas extracelulares. AHNAK é mais abundante em tumores de mama e nas metástases de linfonodo, do que no tecido mamário normal. AHNAK pode representar uma importante molécula do microambiente, presente em vesículas extracelulares, que influenciaria na biologia dos tumores de mama, atuando na comunicação célula-célula.

Palavras-chave: Câncer de mama. Células estromais. Co-cultura. Vesículas extracelulares. AHNAK.

ABSTRACT

SILVA, T. A. **AHNAK regulates the formation and exchange of extracellular vesicles from breast tumor cells and fibroblasts.** 2015. 115 p. Ph. D. Thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Breast cancer is a genetic pathology, common among women and the second most frequent cancer in the world. The successful development of tumors is not only dependent on cell mutations, but is also driven by the tissue microenvironment, where there are interactions between tumor cells and their surrounding stroma. The communication between epithelial and stromal cells is important for regulation of cell proliferation, invasive behavior, angiogenic and metastatic processes in cancer. The majority of cells release vesicular structures into the extracellular space and could be involved in cellular signaling and tumor progression. The extracellular vesicles are spherical structures delimited by proteolipid bilayer, which contain a variety of bioactive molecules, metabolites, lipids, proteins and genetic material, reflecting the condition and the cell type of origin. The aim of this study was to analyze extracellular vesicle-mediated interactions between breast tumor cells and normal fibroblasts, and to characterize the vesicular structures derived from tumor breast cells, determining the amount, size, composition and function of the proteins within these alleged vesicles. Additionally, we determined the role of these vesicles in cell proliferation. Tumor cells (MDA-MB-231, MCF-7) were plated on top of fibroblasts monolayer and both cell lines were previous loaded with different vital dyes. Our results evidenced the presence and exchange of vesicles between breast tumor cells and fibroblasts in co-culture. By Transmission Electron Microscopy (TEM) it was possible to view the cell protrusions from monocultures, which can possibly originate vesicles. Tumor cells showed more protrusions compared to fibroblasts. Vesicles isolated from all the cell lines showed heterogeneous sizes. Both tumor cell lines secreted more vesicles than fibroblasts. Next, we examined the role of extracellular vesicles isolated from MDA-MB-231 in different cell lines. MDA-MB-231-derived vesicles induced MCF-7 cell proliferation through activation of ERK 1/2 signaling pathway. Proteomic analysis showed that extracellular vesicles derived from MDA-MB-231 presented AHNAK protein. AHNAK is distributed in the cytoplasm along the plasma membrane and was detected in MDA-MB-231-derived vesicles. Next, we decided to silence the AHNAK protein and check its functions. We observed that AHNAK depletion promotes a decrease on cell migration, cell invasion and vesicles exchange. Also, the number of cell protrusions and vesicles secretion were reduced upon depletion of AHNAK. Therefore, we established a putative role for AHNAK in the release and exchange of vesicles. We then evaluated AHNAK expression in samples of human breast tissue both normal and tumoral by immunohistochemistry. AHNAK levels were more abundant in human tumor and in metastatic tissue when compared to the normal breast tissue. Our results support the hypothesis that AHNAK could represent a microenvironment-molecule with positive effects on breast tumor progression, mainly due to its role on cell-cell communication.

Keywords: Breast cancer. Stromal cells. Co-culture. Extracellular vesicles. AHNAK.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é uma patologia genética, comum entre as mulheres e causada pelo acúmulo de mutações, multiplicação anormal das células e assim, a geração da célula tumoral. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, respondendo por 25% dos novos casos a cada ano e o tipo de câncer que mais causa mortes entre as mulheres. Sendo, a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos (atrás apenas do câncer de pulmão) e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (Instituto Nacional do Câncer/Ministério da Saúde - INCA/MS, 2015). A incidência desta patologia altera-se entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas, em 2012, na Europa Ocidental (96 casos a cada 100 mil habitantes) e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental (27 casos a cada 100 mil habitantes). Nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando nos países desenvolvidos e, atualmente, é de 85% em 5 anos, enquanto que nos países em desenvolvimento, os valores permanecem entre 50% e 60% (INCA/MS, 2015).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil são elevadas, podendo estar relacionadas a diagnósticos tardios, onde a doença se encontra em estágio avançado. Assim sendo, o diagnóstico precoce aumenta a chance de cura do câncer de mama. Em 2015, esperam-se, para o Brasil, 576 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Destes, 57.120 casos são de câncer da mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. O desenvolvimento desta patologia está relacionado com alguns fatores de risco, como: envelhecimento (idade é um dos mais importantes fatores de risco, pois as taxas de incidência aumentam ligeiramente até os 50 anos, e após essa idade o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia do câncer de mama. Cerca de 4 em cada 5 casos ocorrem após os 50 anos de idade); histórico familiar (fator associado ao aumento no risco de cerca de 2 a 3 vezes para o desenvolvimento do câncer de mama; as mutações em alguns genes, por exemplo, os genes BRCA1 e BRCA2 (do inglês, “breast cancer”), aumentam o risco de desenvolver a doença, no entanto, cerca de 9 em cada 10 casos ocorrem em mulheres sem histórico familiar); fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher;

sedentarismo; excesso de peso; consumo de álcool; exposição à radiação ionizante; alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo). A amamentação, a alimentação saudável com a manutenção do peso corporal ideal e a prática de atividade física regular estão associadas a um menor risco de desenvolver o câncer de mama. Cerca de 30% dos casos de câncer de mama podem ser evitados através destas simples medidas (INCA/MS, 2015).

No Brasil, estratégias como a mamografia (a cada 2 anos), para mulheres entre 50 a 69 anos de idade e o exame clínico das mamas anualmente, a partir dos 40 anos, são recomendadas para a detecção precoce do câncer de mama em mulheres com risco padrão. No entanto, estes mesmos exames são recomendados, anualmente, para mulheres mais jovens (a partir de 35 anos de idade), que fazem parte de grupos considerados de risco elevado para câncer de mama, como histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau (INCA/MS, 2015).

Anatomicamente, as mamas femininas são compostas principalmente por lóbulos, que são unidades responsáveis pela produção de leite (MAHR; BHARGAVA; INSANA, 2012); ductos, que transportam o leite dos lóbulos para o mamilo; areóla; estroma, formado por tecido adiposo e tecido conjuntivo, que circunda os ductos e lóbulos; além de vasos sanguíneos e linfáticos (LESTER; COTRAN, 2000). As mamas femininas são órgãos que estão em constante remodelamento, pois sofrem alterações nos níveis hormonais durante cada ciclo menstrual (JOSHI; DI GRAPPA; KHOKHA, 2012).

Patologias da mama, em geral, surgem como massas palpáveis, lesões inflamatórias, secreção mamilar ou alterações anatômicas (LESTER; COTRAN, 2000). A maioria dos cânceres de mama (mais de 80%) tem início nas células epiteliais que revestem os ductos (câncer ductal), porém alguns casos acometem células epiteliais que revestem os lóbulos (câncer lobular) e uma pequena porcentagem é proveniente de outros tecidos mamários (INCA/MS, 2015).

Existem alguns termos comuns quando o assunto é o câncer de mama, por exemplo: carcinoma, adenocarcinoma e sarcoma. O carcinoma é um tumor maligno desenvolvido a partir de células epiteliais que podem invadir os tecidos circundantes, originando as metástases (American Cancer Society, ACS, 2015). O tipo mais comum de câncer em humanos é o carcinoma, pelo qual ocorre um acúmulo de mutações somáticas em células epiteliais (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). A maioria

dos cânceres de mama são carcinomas, estes, podem ser ductal ou lobular. Os carcinomas, por sua vez, são divididos em carcinoma não infiltrante (não invasivo) ou *in situ* e carcinoma invasivo (infiltrante). O carcinoma ductal *in situ* de mama é uma forma muito inicial de neoplasia, no qual as células com características malignas não invadem a membrana basal, sendo incapazes de produzir metástases. No entanto, estas células podem disseminar através de ductos e produzir lesões extensas, comprometendo toda a área da mama. O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo de câncer de mama mais comum, tendo início nas células que revestem os ductos da mama. Estas células podem atravessar a parede dos ductos e invadir o tecido adiposo mamário; podendo ser capazes de disseminar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da corrente sanguínea, ocorrendo as metástases. O carcinoma lobular *in situ* é uma condição na qual as células anormais são encontradas nos lóbulos da mama, estas, raramente levam a metástases. Enquanto que, o carcinoma lobular invasivo pode ocorrer metástases (ACS, 2015; LESTER; COTRAN, 2000). O adenocarcinoma é um tipo de carcinoma que ocorre a partir de células glandulares. Já o termo sarcoma é usado para designar cânceres raros, que desenvolvem a partir dos tecidos conjuntivo, muscular e adiposo, ou vasos sanguíneos (ACS, 2015).

1.2 Modelos celulares tumorais utilizados

As linhagens celulares tumorais de mama humana mais usadas como modelos experimentais em pesquisas sobre o câncer são: MDA-MB-231 e MCF-7. A linhagem tumoral MDA-MB-231 é proveniente do tecido mamário de uma paciente de 51 anos de idade com adenocarcinoma (tumor triplo negativo, que não apresentam receptores de estrógeno, progesterona e HER-2). Estas células são consideradas invasivas em modelos *in vitro*, porém de baixo índice metastático *in vivo*, embora, quando realizados ensaios pelo qual foram injetadas diretamente na circulação sanguínea, são adequadas para a observação de eventos de extravasamento celular (HARRIS et al., 2015; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

Já a linhagem celular tumoral MCF-7, é considerada tumorigênica, porém não metastática (HARRIS et al., 2015). Estas células são provenientes do tecido mamário de uma paciente de 69 anos com adenocarcinoma. Em ensaios *in vitro*, apresentam características de um epitélio mamário normal, como a adesão célula-célula

(HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; MOHAMMADI, H. et al., 2013). Possuem a capacidade de processar o estrogênio, sob a forma de estradiol, através de receptores de estrogênio localizados no citoplasma da célula (MOHAMMADI H. et al., 2013) e por isso, esta linhagem tornou-se um modelo ideal para estudar a resposta hormonal (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

Uma linhagem celular não tumoral também muito usada como comparativo em estudos sobre câncer de mama é MCF-10A. São células imortalizadas, não transformadas, provenientes de tecido mamário de uma paciente de 36 anos de idade com alterações fibrocísticas. Estas células possuem características de epitélio mamário normal, como: não tumorigenicidade, falta de crescimento independente de ancoragem e dependência de hormônios e fatores de crescimento para proliferação e sobrevivência. Apresentam discretas modificações genéticas típicas de células epiteliais mamárias adaptadas para cultura celular (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003; SOULE et al., 1990).

1.3 Microambiente tumoral

O sucesso no desenvolvimento dos tumores é conduzido pelo microambiente tumoral (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; MURPHY, 2008). Esse microambiente é constituído por moléculas e componentes da matriz extracelular (MEC), bem como, por células normais (estromais) que cercam as células cancerosas. As células estromais circundantes podem ser: fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso, células do sistema imunológico e inflamatórias, entre outras. Essa elaborada infraestrutura responde ao processo de carcinogênese, protegendo o tumor do sistema imune, auxiliando o crescimento, promovendo a invasão e metástase tumoral (BURTON; LIBUTTI, 2009; QUAIL; JOYCE, 2013; SWARTZ et al., 2012).

Outros componentes presentes no microambiente tumoral são os vasos sanguíneos, através destes, os tumores recebem oxigênio e nutrientes, importantes para o desenvolvimento e crescimento tumoral. Deste modo, células tumorais podem sobreviver, induzir metástases e assim, atingir órgãos distantes (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; HANNAFON; DING, 2013). A figura abaixo está ilustrando o microambiente tumoral.

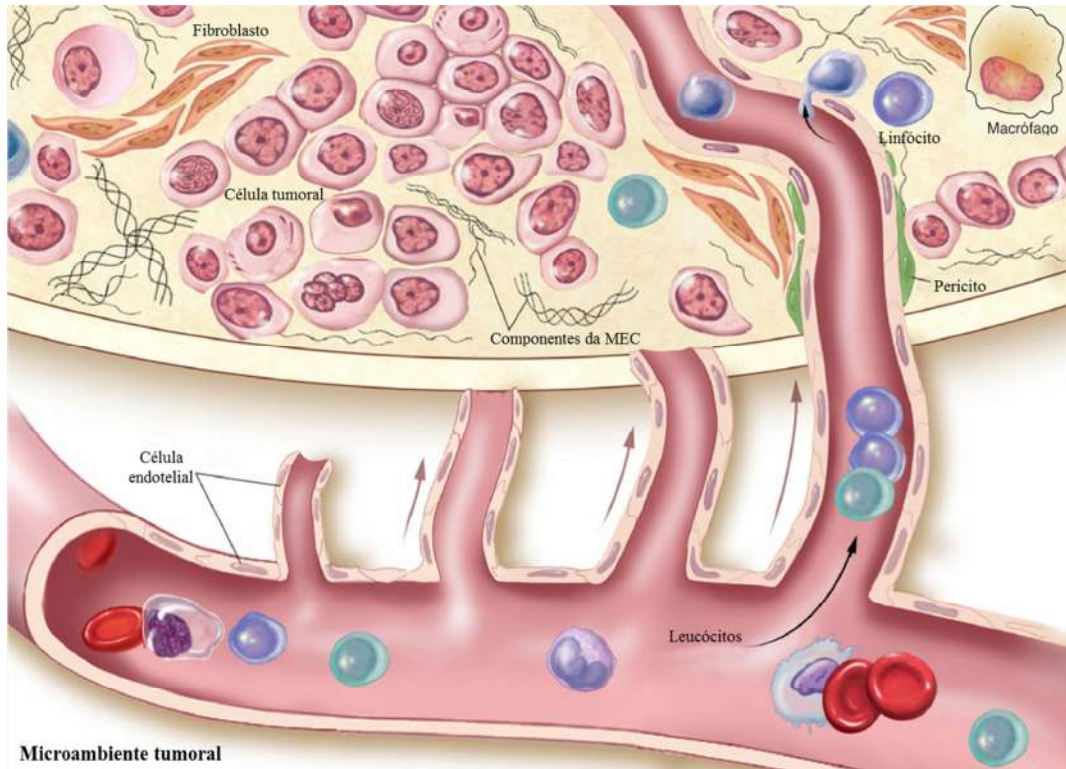


Figura 1 - **Representação esquemática do microambiente tumoral.** O microambiente é constituído por moléculas e componentes da MEC, vasos sanguíneos e células estromais que cercam as células tumorais. As células estromais circundantes podem ser: fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imunológico e inflamatórias, entre outras. Adaptado de (BURTON; LIBUTTI, 2009).

O microambiente tumoral responde à constante remodelação do tecido, nos quais ocorrem alterações metabólicas, expressão de fatores de crescimento que promovem o processo de angiogênese, alterações na MEC, mudanças no recrutamento de células estromais, incluindo uma variedade de células imunes e acelerada proliferação de fibroblastos (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2011; KLEMM; JOYCE, 2015; SWARTZ et al., 2012). Por exemplo, a remodelação do tecido mamário que ocorre no pós-parto, durante a involução da glândula mamária, se torna um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama, porém a gestação proporciona efeito protetor do câncer para mulheres jovens (BORGES; SCHEDIN, 2012). Outra característica importante do microambiente tumoral é o conteúdo e a organização da MEC, cujas propriedades mecânicas podem afetar a

diferenciação, bem como, a invasão celular. O aumento da rigidez do estroma mamário também é um fator de risco para o câncer de mama (SWARTZ et al., 2012).

Interações recíprocas entre os diversos tipos celulares do estroma e as células cancerosas regulam a progressão tumoral. Células mesenquimais não imunes, como fibroblastos, adipócitos e miofibroblastos, desempenham papel importante no microambiente tumoral, sendo estes, “direcionados” pelas células tumorais (SWARTZ et al., 2012). Desta maneira, o desenvolvimento do câncer não depende apenas do acúmulo de mutações genéticas nas células cancerosas, mas também da interação entre células tumorais e seu estroma circundante. A comunicação entre as células epiteliais e estromais é importante para a regulação da proliferação, do comportamento invasivo, dos processos angiogênicos e metastáticos de células cancerosas (HU; POLYAK, 2008).

1.3.1 Fibroblastos

A primeira descrição dos fibroblastos surgiu no final do século XIX, com base na localização celular e aspecto microscópico. Os fibroblastos apresentam aspecto alongado e fusiforme, são células mesenquimais, não epiteliais e não inflamatórias do tecido conjuntivo (sendo a principal célula deste tecido), são responsáveis pela síntese de vários constituintes da matriz fibrilar do tecido conjuntivo, como colágeno (tipos I, III e V) e fibronectina, bem como, proteases que degradam a MEC. Os fibroblastos são células estromais multifuncionais, que além da deposição, remodelação e homeostase da MEC, atuam na regulação da diferenciação e homeostase de células epiteliais associadas, na cicatrização de feridas (produzem MEC que serve como suporte para outras células), na regulação da inflamação e modulação da resposta imune (KALLURI; ZEISBERG, 2006; PARSONAGE et al., 2005; QUAIL; JOYCE, 2013).

Os principais marcadores para fibroblastos são vimentina, desmina, α -actina de músculo liso, porém estes marcadores não são específicos apenas para esta linhagem celular. Vários marcadores podem ser considerados como indicadores específicos e locais de fibroblastos, por exemplo, a desmina que é específica para fibroblastos da pele (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Os fibroblastos de mamíferos são muito heterogêneos, sendo que estas células isoladas a partir de diferentes locais, podem apresentar diferentes características e propriedades funcionais, como nos padrões de expressão

gênica, produção e degradação de MEC, além da capacidade de contractilidade e migração (PARSONAGE et al., 2005).

Os fibroblastos estromais podem influenciar o desenvolvimento do câncer, em resposta aos sinais das células tumorais. Durante o processo de tumorigênese, células pré-cancerosas adquirem várias mutações genéticas e os fibroblastos estromais adjacentes tornam-se “ativados”, atuando de forma autócrina e parácrina, e desta maneira, auxiliam na sobrevivência tumoral (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). Fibroblastos podem ainda contribuir com o processo de angiogênese (através da secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos) (KALLURI; ZEISBERG, 2006; YOON; KIM; GHO, 2014).

1.3.2 O comportamento celular pode ser observado por co-cultura

Vários estudos sobre o comportamento celular (avaliando proliferação, invasão e migração celular) já foram realizados através de ensaios de co-cultura entre fibroblastos não tumorais de mama ou fibroblastos associados ao câncer e células tumorais ou não de mama. No entanto, apresentaram resultados contraditórios, devido ao modo pelo qual foi realizado o ensaio, seja ele onde as células eram co-cultivadas diretamente (SHEKHAR et al., 2001) ou quando as células eram separadas por membrana microporosa, havendo interação através de fatores solúveis (CAMP et al., 2011; DONG-LE BOURHIS et al., 1997; STUELLEN et al., 2010; TYAN et al., 2012).

O perfil de expressão gênica também já foi estudado utilizando ensaios de co-cultura. Santos e colaboradores (2011) realizaram ensaios de co-cultura usando membrana porosa, entre fibroblastos advindos de linfonodos axilares comprometidos ou não de paciente com câncer de mama e células epiteliais mamárias tumorais MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MCF-7. Neste estudo, os efeitos dos fibroblastos foram distintos, conforme as linhagens tumorais co-cultivadas (SANTOS et al., 2011). As alterações fenotípicas e da expressão gênica observadas através da interação de células tumorais e fibroblastos, sugerem que o contato célula-célula no microambiente é uma característica fundamental para cada tipo de câncer de mama (CAMP et al., 2011). Contudo, apesar de que nos ensaios de co-cultura *in vitro* não estarem presentes todas as células e fatores ambientais necessários para conferir uma situação real da célula no microambiente tumoral, a co-cultura tornou-se um método bastante utilizado para estudar o

comportamento e a interação celular *in vitro*. Em geral, estes estudos tentam mimetizar eventos que ocorrem no microambiente tumoral *in vivo*.

Com relação à comunicação entre linhagens celulares tumorais e normais mediada por microvesículas, a interação por meio da troca de exossomos foram observados entre células tumorais de mama co-cultivadas com células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (KUHBIER et al., 2014). Assim como o estudo entre células tumorais de mama metastáticas ou não e a troca de vesículas extracelulares entre estas células, bem como do seu conteúdo, na promoção de metástases (LE et al., 2014). Após co-cultura indireta, macrófagos associados ao câncer transferiram exossomos (e seu conteúdo, contendo miRNAs) para células tumorais de mama, promovendo a invasão celular (YANG et al., 2011).

1.4 Comunicação celular

A comunicação intercelular é uma característica essencial dos organismos multicelulares, sendo fundamental para a sobrevivência e manutenção da homeostase. Este processo pode ser mediado através do contato direto célula-célula (através de moléculas de adesão, junções comunicantes e nanotubos) ou pela transferência de moléculas secretadas, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios (CHOI et al., 2015; EL ANDALOUSSI et al., 2013; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; VADER; BREAKFIELD; WOOD, 2014). Com isso, as células interagem entre si, sincronizando a atividade metabólica, a expressão gênica e outros processos celulares (DE MAIO, 2011).

Outro mecanismo recém-descoberto é a comunicação intercelular que envolve a transferência de vesículas extracelulares (OHNO; ISHIKAWA; KURODA, 2013; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; YOON; KIM; GHO, 2014). As vesículas extracelulares estão relacionadas com a comunicação entre as células tumorais e as várias células do estroma, e assim, também interagem com o microambiente tumoral (ARAKELYAN et al., 2014; MARTINS; DIAS; HAINAUT, 2013; YUANA; STURK; NIEUWLAND, 2013); podendo colaborar com a progressão tumoral, processo angiogênico e imunológico, degradação da MEC e metástases (KUCCHARZEWSKA; BELTING, 2013). A interação celular através de vesículas extracelulares serve como um mecanismo de tráfico intercelular de complexas mensagens biológicas, como a troca

de moléculas que não pode ser realizada através de vias secretoras clássicas, ou que são predispostas a degradação extracelular (D'ASTI et al., 2012). Recentemente, estas vesículas extracelulares que participam da comunicação intercelular receberam o nome de comunicossomos intercelulares (CHOI et al., 2015).

A comunicação celular através de vesículas extracelulares é importante, pois as vesículas possuem grande número de moléculas em volume pequeno, no qual quando adentram na célula-alvo podem ativar várias vias de sinalização, simultaneamente. Outra vantagem é que essas vesículas podem percorrer longas distâncias, sem alterarem suas estruturas ou liberarem seu conteúdo, até interagirem com a célula-alvo (DE MAIO, 2011). Esta interação pode ocorrer através do processo de endocitose ou fusão com a membrana celular (D'ASTI et al., 2012; DE MAIO, 2011; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; ROBBINS; MORELLI, 2014).

Vesículas extracelulares não interagem com qualquer tipo celular, mas sim com determinadas células-alvo (COCUCCI; MELDOLESI, 2015). Esta interação ocorre devido a presença de ligantes específicos, presentes na superfície da célula ou da vesícula (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). A eficiência e as consequências desta interação podem depender da natureza das células envolvidas e do microambiente circundante (hipóxia, acidez, inflamação), nos quais podem controlar a liberação, o conteúdo e a entrada das vesículas extracelulares (D'ASTI et al., 2012). Na figura abaixo, pode ser observada a troca de vesículas entre as células.

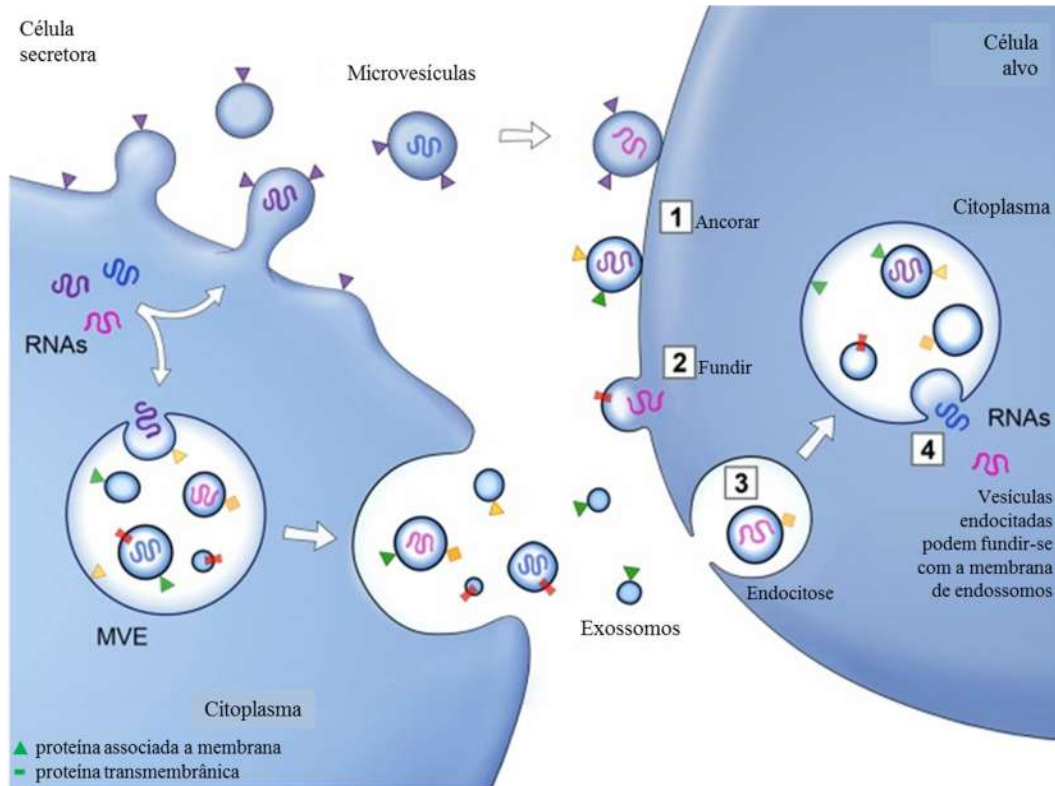


Figura 2 - **Troca de vesículas entre as células.** Neste processo ocorre a transferência de proteínas e RNAs através das vesículas. Proteínas associadas à membrana (triângulos), proteínas transmembrânicas (retângulos) e RNAs (símbolos de curvas) são incorporadas seletivamente a endossomos multivesiculares (MVE) ou em microvesículas que surgem a partir do brotamento direto da membrana plasmática. MVE fundem-se com a membrana plasmática para liberar exossomos para o meio extracelular. 1: Microvesículas e exossomos (vesículas extracelulares) podem ancorar na membrana plasmática da célula-alvo; 2: Vesículas podem fundir-se diretamente com a membrana plasmática; 3: Vesículas podem ser endocitadas pela célula-alvo; 4: Vesículas endocitadas podem fundir-se com a membrana de endossomos. Adaptado de (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

1.5 Vesículas extracelulares

A liberação de vesículas para o meio extracelular pode ser uma resposta adaptativa celular universal. As vesículas podem ser liberadas de diferentes tipos de células (*in vivo* e *in vitro*) em condições fisiológicas e patológicas (GYÖRGY et al., 2011), bem como, liberadas em resposta ao estresse celular (DE MAIO, 2011). Vesículas extracelulares podem ativar receptores, além de transferir informações biológicas entre as células (COCUCCI; MELDOLESI, 2015). As vesículas tornam-se importantes na fisiologia normal, porém podem levar a alterações em várias patologias (ARAKELYAN et al., 2014).

A maioria das células liberaram continuamente vesículas e fatores solúveis para o meio extracelular. Por exemplo, os linfócitos T e mastócitos, que liberam o conteúdo dos seus grânulos de secreção (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002), além de adipócitos, neurônios, plaquetas, células dendríticas, epiteliais e endoteliais, dentre outras (HANNAFON; DING, 2013). Desta maneira, as vesículas também podem ser encontradas em muitos fluidos biológicos (amniótico, lacrimal, seminal, cefalorraquidiano, bÍlis), bem como, no plasma sanguíneo, saliva, leite materno e na urina (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; KIM, D. K. et al., 2015; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010; ROBBINS; MORELLI, 2014; SANDVIG; LLORENTE, 2012). Células não tumorais liberam vesículas para o meio extracelular, em quantidades menores. Vesículas de células endoteliais, por exemplo, são formadas após estimulação com citocinas e espécies reativas de oxigênio, e estas, podem estar elevadas no plasma sanguíneo de pacientes com doenças vasculares (GYÖRGY et al., 2011). Outro exemplo são as células do sistema nervoso, que liberam vesículas que atuam nos processos neurobiológicos, modulando várias funções (YOON; KIM; GHO, 2014).

As vesículas extracelulares são estruturas esféricas limitadas por bicamada lipídica, semelhante à membrana celular. Em seu interior existem diversas moléculas bioativas, lipídios, proteínas, DNA, mRNAs, miRNAs ou microRNAs e metabólitos que refletem a condição e o tipo celular de origem (KIM, D. K. et al., 2015; YOON; KIM; GHO, 2014).

Diferentes tipos celulares podem, por sua vez, liberar diferentes tipos de vesículas para o ambiente extracelular, simultaneamente, constitutivamente ou de forma regulada (CHOI et al., 2015; GYÖRGY et al., 2011; KIM, D. K. et al., 2015). Elas podem ser isoladas de fluidos extracelulares, ou seja, a partir do meio de cultura da célula (LÖTVALL et al., 2014). A classificação das vesículas pode ser quanto a sua origem e quanto as suas características (tamanho, densidade, morfologia, composição proteica e lipídica, dentre outras) (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; VAN DER POL et al., 2012).

As vesículas extracelulares desempenham papéis em vários aspectos da biologia, como: tráfego e comunicação intercelular; função no sistema imune, microbiologia, neurobiologia e no desenvolvimento; contribuem para diversas doenças (cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, infecções virais, como a AIDS);

colaboram na biotecnologia (GOULD; RAPOSO, 2013; YOON; KIM; GHO, 2014); servindo como fonte de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de diversas patologias; além da terapêutica (ARAKELYAN et al., 2014; D'SOUZA-SCHOREY; DIVIZIO, 2014; KIM, D. K. et al., 2015).

Marcadores moleculares para diferentes patologias podem ser observados no plasma a partir de sangue total, com isso pode-se acompanhar a eficácia de um tratamento em diferentes pontos. O DNA circulante e miRNAs são estáveis em plasma, além do mais, estes marcadores podem ser encontrados no conteúdo de vesículas extracelulares presentes no plasma sanguíneo (BEST et al., 2015). Devido a esta estabilidade, vesículas extracelulares presentes em muitos fluidos corporais podem ser utilizadas como biomarcadores do câncer (MARTINS; DIAS; HAINAUT, 2013).

Células tumorais também liberam vesículas extracelulares para o microambiente tumoral (GYÖRGY et al., 2011), no qual podem controlar as células adjacentes (D'SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010; SANDVIG; LLORENTE, 2012). O processo de formação de vesículas na célula tumoral pode levar a várias alterações celulares, como: nos processos biológicos; aumento quantitativo da liberação de vesículas; mudanças na estrutura, tamanho e composição molecular (D'ASTI et al., 2012). Vesículas derivadas de células tumorais podem contribuir para a propagação do fenótipo transformado; colaborar com a capacidade de células tumorais resistirem ao processo imune; estimular a angiogênese, dentre outros (D'ASTI et al., 2012; D'SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012; VADER; BREAKFIELD; WOOD, 2014). Diversos estudos acreditam que estas vesículas também podem estar relacionadas com a progressão, invasão e metástase tumoral (D'ASTI et al., 2012; D'SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012; HENDRIX; HUME, 2011; KUCHARZEWSKA; BELTING, 2013; VAN DOORMAAL et al., 2009). As microvesículas também podem servir como biomarcadores do câncer (D'SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012; SANDVIG; LLORENTE, 2012). Contudo, todas estas informações sobre o papel das vesículas extracelulares advindas de células tumorais ainda são contraditórias, sendo necessários mais estudos que confirmem estes dados (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). A figura abaixo, esta representando possíveis papéis das vesículas extracelulares no microambiente tumoral.

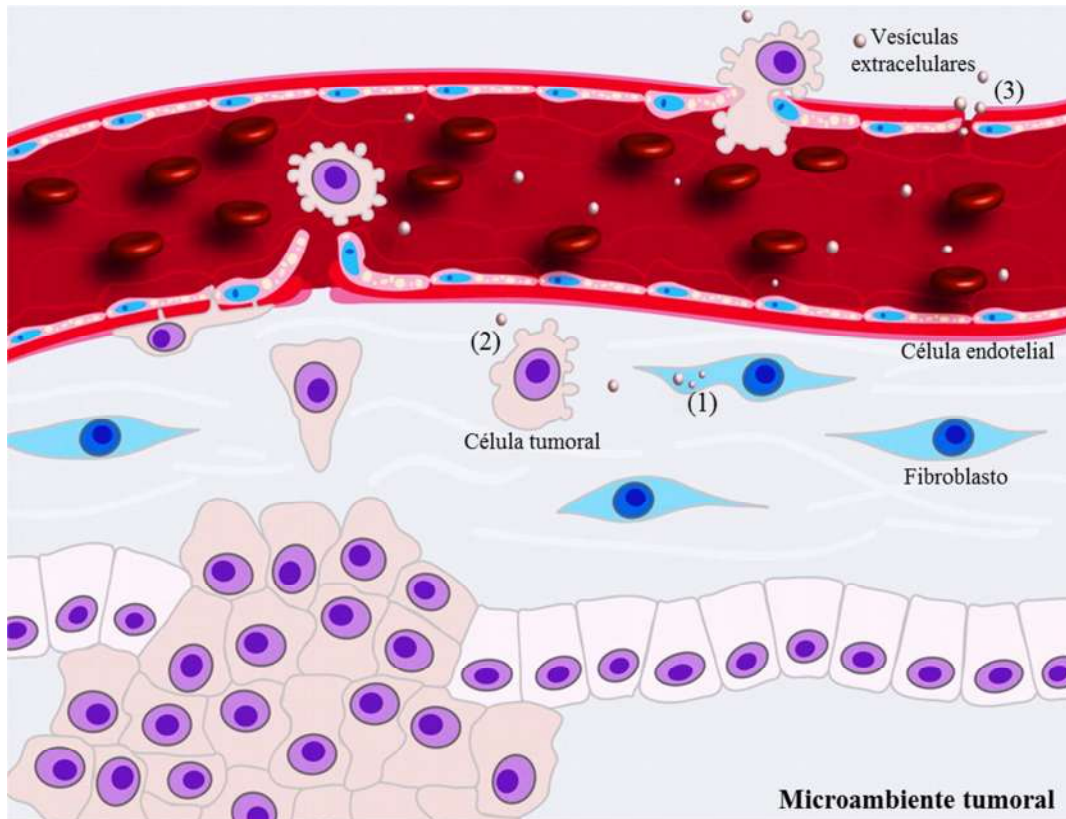


Figura 3 - **Vesículas extracelulares derivadas de células tumorais podem modular o microambiente tumoral.** (1) Vesículas extracelulares de células tumorais podem interagir com as células estromais, por exemplo, o fibroblasto, levando a modificação no comportamento destas células alvo; (2) Também podem interagir com a MEC através da deposição de seu conteúdo ou promover a degradação da matriz, facilitando o trajeto da célula; (3) Vesículas podem estar relacionadas com a progressão, invasão e metástase tumoral. Adaptado de (D'SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012).

Existem diferentes metodologias e diversas amostras biológicas que são usadas para investigar a biologia das vesículas extracelulares. Deste modo, surgem diversos protocolos e heterogêneas interpretações dos resultados, tornando-se necessário o uso de marcadores específicos para cada tipo de vesícula. Esta, seria uma maneira possível de padronizar as vesículas extracelulares, principalmente após comparação com os bancos de dados já existentes na literatura (LÖTVALL et al., 2014).

1.5.1 Nomenclatura das vesículas

A variedade de vesículas extracelulares liberadas por diversas células levou a contradições quanto à sua nomenclatura, surgindo assim diversas terminologias

(COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; VAN DER POL et al., 2012). Dentre elas estão as que se referem ao tamanho (microvesícula, micropartícula, nanopartícula); as que se referem ao tecido ou tipo celular de origem (oncossomo, prostassomo); aquelas cuja presença seria fora (prefixo “exo” ou “ecto”) da célula (exossomo, vesícula semelhante à exossomo, exovesícula, ectossomo); algumas relacionadas a supostas funções (argossomo, vesícula de matriz, epididimossomo, tolerossomo, prominossomo, dexossomo, texossomo); além de vesículas de membrana extracelular e vesículas (bolhas ou corpos) apoptóticas (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; KIM, D. K. et al., 2015; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010).

A maioria destas nomenclaturas refletem as funções específicas de cada tipo de vesícula ou mesmo ao tipo celular de origem, por exemplo, “tolerossomo”, vesícula que induz a tolerância do sistema imune à antígenos alimentares (KARLSSON et al., 2001); “prostassomo”, vesícula de próstata (GOULD; RAPOSO, 2013; STEGMAYR; RONQUIST, 1982); existem também “vesículas que auxiliam na calcificação da matriz”, iniciando a formação óssea (ANDERSON, 1969; GOULD; RAPOSO, 2013).

O termo “exossomo” vem sendo utilizado de maneiras diferentes, como: vesículas de endossomos, que são liberadas após a fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática; ou ainda, como vesículas que possuem alguma “função biológica”. Outro exemplo é com relação ao termo “microvesícula”, que é sendo usado como: vesícula que surge a partir do brotamento direto da membrana plasmática (GOULD; RAPOSO, 2013). A partir de 2004, o termo “exossomo” é frequentemente usado em artigos científicos, sendo que, o termo “vesículas extracelulares”, foi escolhido como termo genérico, e está em constante uso (LÖTVALL et al., 2014). Atualmente, o termo “vesículas extracelulares” se tornou o mais recomendado, visto que, ainda não há um consenso na literatura sobre a nomenclatura correta para as vesículas liberadas para o ambiente extracelular (GOULD; RAPOSO, 2013). No presente trabalho, adotamos o termo “vesículas extracelulares”.

1.5.2 Diversidade de vesículas

Existem vesículas que participam do tráfego intracelular ou entre compartimentos celulares, denominadas vesículas transportadoras e secretoras; outras vesículas

(microvesículas) são formadas a partir da membrana plasmática por brotamento direto; outras, são formadas no interior dos compartimentos celulares internos (endossomos precoces) e são posteriormente secretadas pela fusão destes compartimentos com a membrana plasmática; vesículas extracelulares como os exossomos, são geradas em endossomos tardios ou corpos multivesiculares, e posteriormente secretados para meio extracelular (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). A liberação de vesículas extracelulares através do brotamento direto, resulta na perda de pequenos fragmentos da membrana plasmática, pelo qual a célula providencia medidas para manter o equilíbrio da membrana, como a exocitose de vesículas intracelulares (COCUCCI; MELDOLESI, 2015). Na figura abaixo, pode ser observada a diversidade de vesículas:

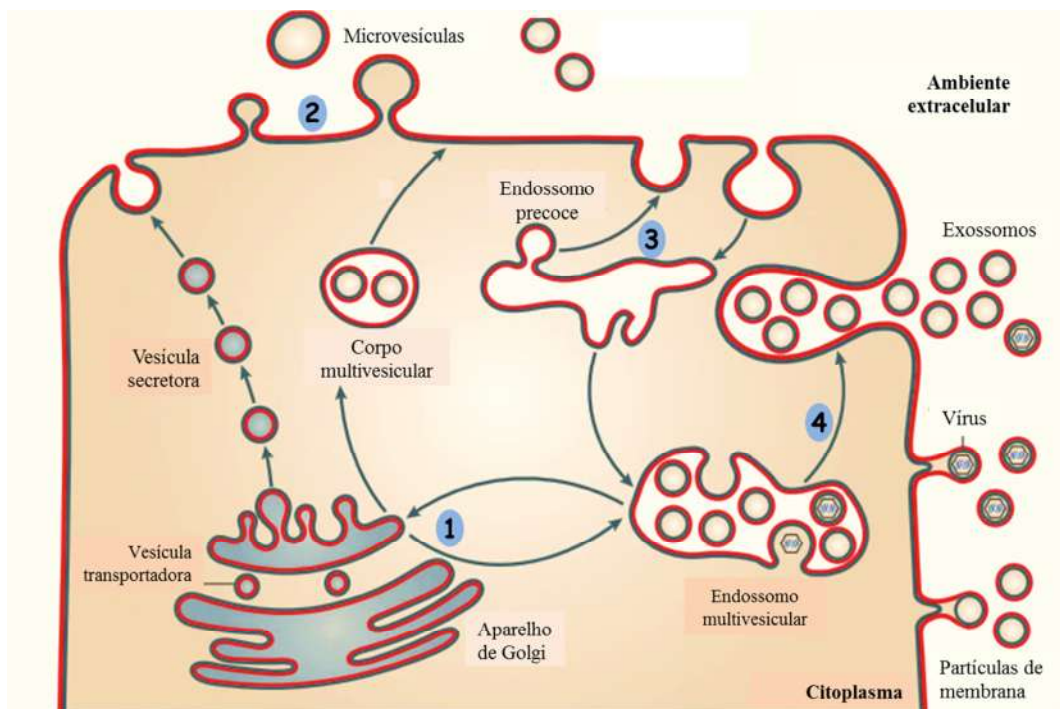


Figura 4 - **Diversidade de vesículas liberadas pelas células.** 1: vesículas que participam do tráfego intracelular ou entre compartimentos celulares, denominadas vesículas transportadoras e secretoras; 2: vesículas como, microvesículas, vírus envelopados (como retrovírus) e partículas de membranas, são formadas a partir da membrana plasmática por brotamento direto; 3: vesículas advindas de endossomos precoces, são formadas no interior dos compartimentos celulares internos e são posteriormente secretadas por fusão destes compartimentos com a membrana plasmática; 4: vesículas extracelulares como os exossomos, são gerados em endossomos tardios ou corpos multivesiculares, e posteriormente secretados. Adaptado de (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009).

De modo geral, os termos mais usados para classificar as vesículas extracelulares são: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (EL ANDALOUSSI et al., 2013; GYÖRGY et al., 2011; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009; VADER; BREAKFIELD; WOOD, 2014). A figura abaixo representa esta classificação das vesículas extracelulares:

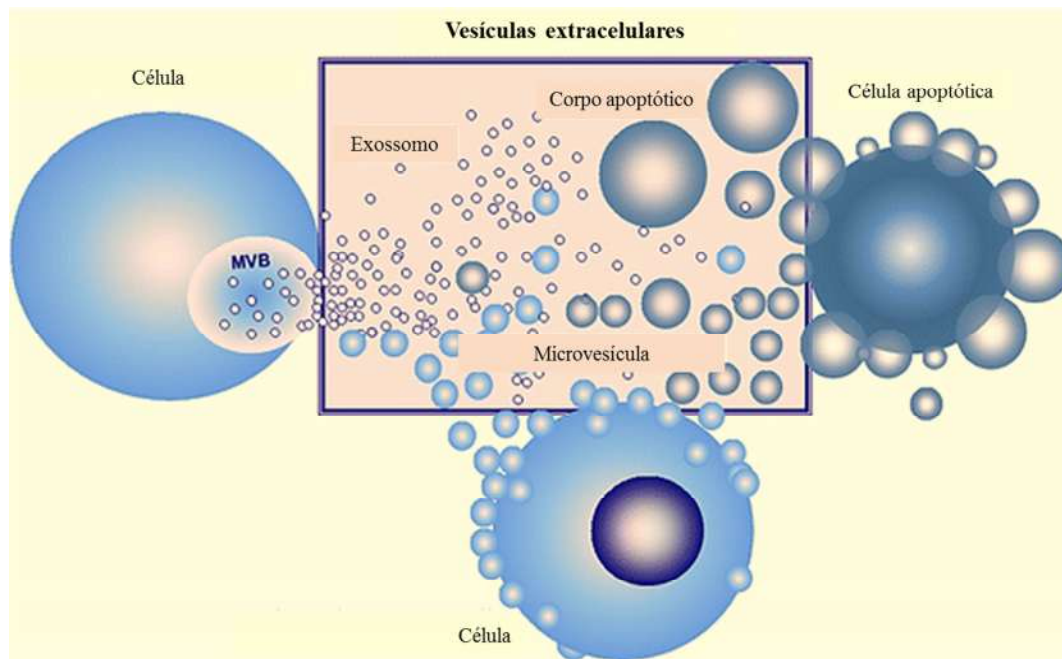


Figura 5 - **Representação esquemática das vesículas extracelulares.** As principais populações incluem exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Para simplificar a figura, as células não foram mostradas liberando todos os tipos de vesículas. MVB: do inglês, “multivesicular body”. Adaptado de (GYÖRGY et al., 2011).

Os exossomos foram descritos pela primeira vez por Trams e colaboradores, em 1981 (TRAMS et al., 1981). A origem endossomal é um critério comumente utilizado para definir os exossomos; estruturas de morfologia arredondada e bem delimitada, de tamanho entre 30 e 100 nm de diâmetro, similar ao tamanho de vírus (Figura 6). Exossomos podem ser liberados tanto constitutivamente como após a indução do processo de exocitose de corpos multivesiculares, assim, são secretados após a fusão destes corpos com a membrana plasmática (Figura 4). Deste modo, podem apresentar membrana celular e componentes citosólicos em sua composição. Devido sua origem, possuem proteínas envolvidas na via endossomal-lisossomal, e estas, são utilizadas

como marcadores de exossomos (CONDE-VANCELLS et al., 2008; GYÖRGY et al., 2011; ROBBINS; MORELLI, 2014; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). Os exossomos podem exercer as suas funções biológicas nas células através do contato direto entre as moléculas da superfície celular e a vesícula; processo de endocitose de vesículas; e fusão da membrana da célula e a vesícula (GYÖRGY et al., 2011).

As microvesículas foram descritas pela primeira vez por Chargaff e West, em 1946 como um precipitado observado em plasma sanguíneo (GYÖRGY et al., 2011). Em 1967, Wolf também observou a presença de partículas após ultracentrifugação de plasma sanguíneo humano (WOLF, 1967). O brotamento direto a partir da membrana plasmática das células é aplicado para microvesículas, vesículas de forma e tamanho mais heterogêneo, em geral, maior que 100 nm (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; DUBREUIL et al., 2007; EL ANDALOUSSI et al., 2013; OHNO; ISHIKAWA; KURODA, 2013; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009; TURIÁK et al., 2011; VADER; BREAKEFIELD; WOOD, 2014). Diferente dos exossomos, as microvesículas não estão envolvidas com a via endocítica (DE MAIO, 2011). Seu tamanho sobrepõe ao tamanho de bactérias e agregados proteicos (Figura 6). A liberação de microvesículas pode ser induzida após a ativação de receptores da superfície celular ou apoptose e consequente aumento de fluxo de Ca^{2+} intracelular (GYÖRGY et al., 2011). Também ocorre perda de assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática, exposição de fosfatidilserina e alterações no citoesqueleto; levando a formação da curvatura da membrana e assim, a liberação da vesícula para o meio extracelular (D'ASTI et al., 2012). Contudo, a maioria dos estudos são sobre os exossomos, poucos são sobre a caracterização das microvesículas.

O termo corpo apoptótico foi utilizado pela primeira vez por Kerr e colaboradores, em 1972. Estes corpos são considerados como estruturas com tamanhos heterogêneos entre 1 e 5 μm , liberados após a fragmentação de células em processo apoptótico (GYÖRGY et al., 2011; TURIÁK et al., 2011). Corpos apoptóticos podem conter organelas citoplasmáticas e/ou fragmentos nucleares, enquanto que microvesículas não apresentam estas estruturas (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008; VADER; BREAKEFIELD; WOOD, 2014). O tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares está representado na figura abaixo:

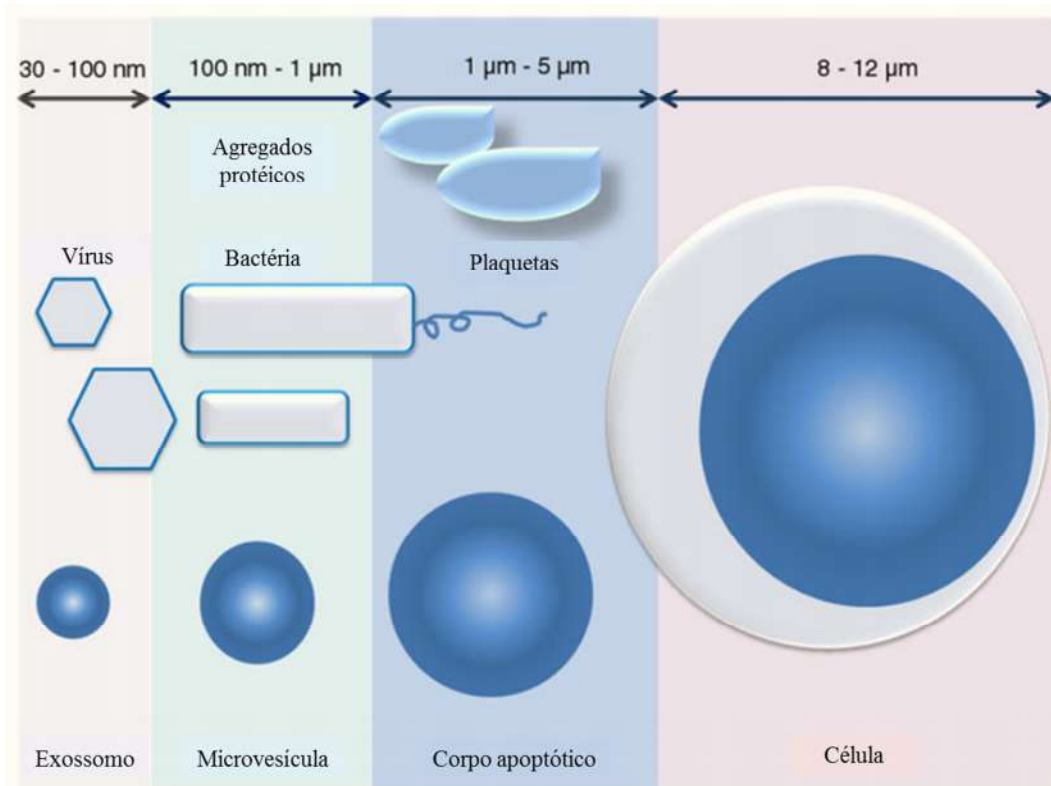


Figura 6 - **Tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares.** Enquanto exossomos compartilham uma distribuição de tamanho com os vírus, as microvesículas sobrepõem em tamanho, com as bactérias e os agregados proteicos (por exemplo, complexos imunes). Corpos apoptóticos e plaquetas possuem tamanho entre 1 e 5 µm. Adaptado de (GYÖRGY et al., 2011).

1.5.3 Isolamento e análises de vesículas extracelulares

Na literatura, ainda não está totalmente estabelecido um protocolo para isolar vesículas extracelulares. Em geral, os métodos de isolamento e análise de exossomos são: centrifugação diferencial, seguida de ultracentrifugação em gradiente de densidade utilizando sacarose, com até 100.000 g (GOULD; RAPOSO, 2013; KRUGER et al., 2014; THÉRY et al., 2006), ou mesmo, reagentes comerciais, como ExoQuick (System Biosciences, EUA) (GYÖRGY et al., 2011). Os métodos mais usados de isolamento de microvesículas são através de centrifugações mais baixas, a partir de 10.000 g (GOULD; RAPOSO, 2013; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2009; YUANA; STURK; NIEUWLAND, 2013).

Existem contradições sobre os métodos de isolamento de vesículas usando centrifugação (tempo, força, números de ciclos, outros). Outro fator é a ampla

distribuição de tamanhos das vesículas extracelulares. Alguns protocolos indicam a filtração da amostra usando membrana de poro de 0,2 μm (para isolar exossomos) ou 0,8 μm (para isolar microvesículas) no caso de sobrenadantes celulares, para a remoção de células e debris (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; GYÖRGY et al., 2011; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002). No entanto, uma rápida filtração pode levar à fragmentação das vesículas, e para evitar este problema recomenda-se a filtração por gravidade (GYÖRGY et al., 2011). Alguns tipos de centrifugações aplicam 200 a 1500 g para remover restos celulares; 10.000 a 20.000 g para sedimentar e isolar vesículas maiores que 100 nm; e 100.000 a 200.000 g para isolar vesículas menores que 100 nm (VAN DER POL et al., 2012) sem passar pela etapa de filtração. A centrifugação diferencial ainda é um método difícil, devido às distribuições de tamanho e as diferentes populações de vesículas extracelulares. Neste caso, utiliza-se gradiente de sacarose, sendo possível separar exossomos de microvesículas, devido à diferença na densidade das vesículas (GYÖRGY et al., 2011; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009).

Outro método usado para o isolamento de vesículas é através de imunoafinidade, usando esferas revestidas de anticorpos específicos para vesículas extracelulares (HANNAFON; DING, 2013).

Ainda é complicado determinar os componentes ou marcadores moleculares específicos dos diferentes tipos de vesículas extracelulares (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; DE MAIO, 2011). É possível analisar e caracterizar as proteínas das vesículas extracelulares através da análise proteômica, usando técnica de espectrometria de massa (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; D'SOUZA-SCHOREY; DI VIZIO, 2014; GYÖRGY et al., 2011;). Algumas proteínas podem ser específicas conforme: o tipo de vesícula analisada, tipo celular a qual a vesícula foi isolada, ou mesmo o tipo de centrifugação utilizada para isolar a mesma. Também é plausível realizar a quantificação de proteínas das vesículas através de "immunoblot" (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014; GYÖRGY et al., 2011).

A citometria de fluxo pode ser usada para analisar o tamanho e composição das vesículas extracelulares, tornando possível detectar apenas vesículas maiores de 200 nm. Exossomos e microvesículas menores não podem ser analisadas (ARAKELYAN et al., 2014; GYÖRGY et al., 2011).

Com relação ao tamanho das vesículas, também pode ser usada a microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou a microscopia de força atômica, uma variante da

microscopia eletrônica de varredura, para visualizar e analisar estas estruturas (GYÖRGY et al., 2011; LÖTVALL et al., 2014).

A distribuição do tamanho e a concentração das vesículas presentes em um determinado fluido também podem ser observadas após análise de rastreamento de nanopartículas, utilizando por exemplo, o NanoSight. Esse equipamento utiliza as propriedades de espalhamento de luz das partículas em um meio fluido. O NanoSight detecta estruturas entre 10-2000 nm de diâmetro (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; LÖTVALL et al., 2014).

Os corpos apoptóticos não são isolados, em geral, utiliza-se ensaios de co-culturas de células apoptóticas para investigar as funções destas estruturas, visto que estas estruturas são bem maiores (como representado na Figura 6), com diâmetro entre 1 a 5 μm (GYÖRGY et al., 2011). Estas estruturas também podem ser observadas através de imagens após técnica de imunofluorescência (LÖTVALL et al., 2014).

A microscopia de fluorescência também é usada para visualizar vesículas, diretamente em lamínulas ou dentro das células. Vesículas menores ($< 100 \text{ nm}$) também podem ser observadas, visto que o limite de resolução dos microscópios ópticos clássicos é de 200 nm, e em geral são vistas como agregados de vesículas (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

Por fim, independente da técnica usada para analisar as vesículas extracelulares, cada método deve ser otimizado para o tipo de amostra biológica em questão, podendo até mesmo, ser necessário a utilização de várias metodologias para examinar as características físicas e morfológicas, bem como a composição, destas estruturas vesiculares (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Além de que, muitas dessas técnicas ainda necessitam de otimização para o estudo de vesículas extracelulares.

1.5.4 Conteúdo das vesículas extracelulares

A função das vesículas extracelulares parece ser dependente do conteúdo que transportam. Este conteúdo, por sua vez, depende do tipo celular pelo qual foi originado (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010) e ainda, no caso de ensaios *in vitro*, depende das condições de cultivo das células (CHOI et al., 2015). As vesículas extracelulares podem transferir seu conteúdo para uma célula alvo. Esta célula receptora pode apresentar novas funções após receber o conteúdo através da vesícula (D'ASTI et al.,

2012; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010; ROBBINS; MORELLI, 2014). Microvesículas e exossomos estão envolvidas no processo de sinalização intracelular, devido a presença de diferentes moléculas, em seu conteúdo (DUBREUIL et al., 2007; SANDVIG; LLORENTE, 2012; TURIÁK et al., 2011).

A composição geral das vesículas extracelulares está representada por: proteínas citoplasmáticas e de membrana, como selectinas e integrinas, bem como seus receptores (EL ANDALOUSSI et al., 2013; OHNO; ISHIKAWA; KURODA, 2013; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009), lipídios (fosfatidilserina, esfingomiéline e colesterol) e ácidos nucleicos (mRNA e miRNA) (CHOI et al., 2015; COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014), como está representado na Figura 7. miRNA são pequenas moléculas de RNA, não codificadoras de proteínas, que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. miRNA desempenham importante papel em diversos processos biológicos, como na tumorigênese (LI et al., 2009). As vesículas extracelulares das células tumorais também apresentam em seu conteúdo o miRNA, pelo qual tornaram-se biomarcadores do câncer, pois podem levar a caracterização da origem e do desenvolvimento de tumores (GYÖRGY et al., 2011). Além disso, miRNAs podem ativar moléculas de sinalização e receptores da célula alvo (YOON; KIM; GHO, 2014).

Atualmente existem dois bancos de dados que agrupam informações a respeito da composição das vesículas extracelulares (proteínas, ácidos nucleicos e lipídios): “EVpedia” (<http://evpedia.info>) (KIM, D. K. et al., 2015) e “Vesiclepedia” (<http://microvesicles.org>) (KALRA et al., 2012); estes bancos são atualizados constantemente por grupos de pesquisadores (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Vesículas extracelulares foram caracterizadas com sucesso, por análise proteômica utilizando espectrometria de massa (COCUCCI; MELDOLESI, 2015; D'SOUZA-SCHOREY; DI VIZIO, 2014;).

Como mencionado, a metodologia mais usada para analisar e caracterizar as proteínas das vesículas extracelulares é a análise proteômica. Em geral, as proteínas vesiculares são advindas de vesículas internas, membrana plasmática e citoplasma (CHOI et al., 2015). Dentre as principais proteínas mais encontradas em vesículas extracelulares estão: proteínas de transporte de membrana (anexinas, flotilins, proteínas Rab, TSG101); proteínas apresentadoras de antígeno (MHC, do inglês, “major histocompatibility complex”); proteínas adesivas (tetraspaninas, integrinas, outras);

proteínas de membrana (LAMP, do inglês, “lysosome-associated membrane protein”; TfR, do inglês, “transferrin receptor”); proteínas citosólicas (histonas, ribossomais e proteínas de choque térmico - HSP, do inglês “heat shock protein”); proteínas de citoesqueleto (actina, tubulina, dentre outras) (CHOI et al., 2015; COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). A figura abaixo exemplifica os principais componentes já encontrados nas vesículas extracelulares:

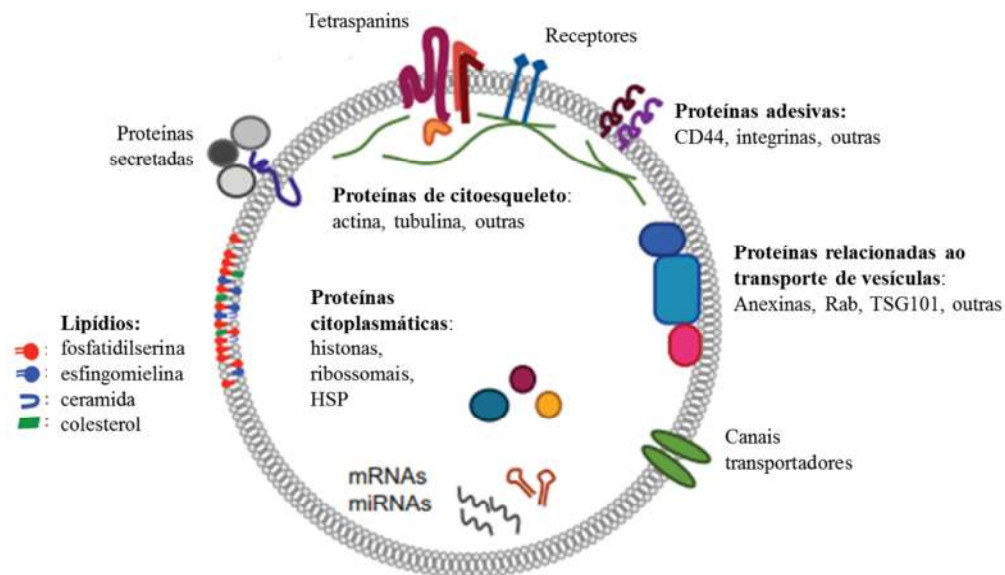


Figura 7 - **Vesícula extracelular e seus principais componentes.** A composição geral das vesículas extracelulares está representada por: proteínas citoplasmáticas, de citoesqueleto, de membrana e seus receptores; além de proteínas de transporte de vesículas, proteínas apresentadoras de antígeno, proteínas adesivas (tetraspaninas, integrinas); lipídios e ácidos nucleicos (mRNA e miRNA). Adaptado de (CHOI et al., 2015).

Kruger e colaboradores (2014) isolaram vesículas semelhantes à exossomos de células tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e as proteínas mais encontradas foram: actina, anexinas (A1, A2, A5), isozimas piruvato kinase (M1/M2), tubulina (β e α), proteína de choque térmico (HSP 90 α), histona (H4), integrina α -2, entre outras. A análise proteômica identificou em vesículas derivadas de células MCF-7, mesmo que de maneira menos relevante, as proteínas AHNAK e mioferlina (KRUGER et al., 2014).

1.6 Proteína AHNAK

AHNAK (“Neuroblast differentiation-associated protein”), também conhecida como, “desmoyokin” é uma molécula grande (com aproximadamente 700 kDa). Tanto o mRNA como a proteína já foram identificadas em vários tipos celulares. Devido à sua grande estrutura, AHNAK pode ser clivada em vários locais diferentes (DAVIS; LOOS; ENGELBRECHT, 2014).

A proteína AHNAK está associada à interações proteína-proteína, devido aos seus vários locais de ligação. A estrutura de proteína AHNAK possui natureza tripartida: domínios N-terminais com 251 aminoácidos de tamanho; unidades repetidas centrais que apresentam cerca de 4390 aminoácidos de 26 elementos repetidos e domínio C-terminal, que contém 1002 aminoácidos (DAVIS; LOOS; ENGELBRECHT, 2014; HUANG et al., 2007).

AHNAK faz parte de uma estrutura chamada "enlargeossomo", que foi descrito em neurônios e está associada ao aumento de vesículas citoplasmáticas dependente da superfície de células em exocitose (BORGONOVO et al., 2002; DAVIS; LOOS; ENGELBRECHT, 2014; LORUSSO et al., 2006; RACCHETTI et al., 2010). AHNAK pode apresentar diferentes funções entre os vários tipos celulares, por exemplo, modulação do reparo da membrana muscular e regulação dos canais de cálcio cardíacos (DAVIS; LOOS; ENGELBRECHT, 2014; HASHIMOTO et al., 1993; HUANG et al., 2007). Além do papel no enlargeossomo, AHNAK também é importante, na altura da célula e manutenção do citoesqueleto (BENAUD et al., 2004). No entanto, outro estudo mostrou que animais deficientes de AHNAK apresentaram efeito mínimo sobre o desenvolvimento geral, tumorigênese, adesão de células epidérmicas, proliferação e diferenciação celular, bem como, na manutenção da integridade da epiderme de camundongos (KOUNO et al., 2004).

AHNAK foi identificada em uma diversidade de tipos celulares em ambos os níveis de mRNA e proteína; e sua distribuição pode ser diferenciada de acordo com o tipo celular. AHNAK já foi encontrada em núcleos e aparelho de Golgi de células não epiteliais (SHTIVELMAN; BISHOP, 1993), no entanto, também já foi descrita como predominantemente de localização citoplasmática ou associada à membrana plasmática de células epiteliais (SUSSMAN et al., 2001). Hashimoto e colaboradores (2003) observaram que em queratinócitos AHNAK foi encontrada na membrana celular, ao

contrário da maioria das outras células, em que AHNAK esta distribuída no citoplasma (HASHIMOTO et al., 1993). A localização de AHNAK na membrana plasmática possivelmente seria devido às suas interações específicas com proteínas Anexina A2 e S100A10, pois AHNAK não apresenta domínios transmembrânicos (BENAUD et al., 2004; GENTIL et al., 2003; HUANG et al., 2007). Isto sugere que a proteína AHNAK é uma molécula global, com uma estrutura exclusiva e de diversificada distribuição.

A proteína AHNAK já foi encontrada altamente expressa em linhagens celulares de mesotelioma (SUDO et al., 2014); após proteômica, AHNAK foi identificada em linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MDA-MB-435), células tumorais de próstata (DU145), de fibrossarcoma (HT1080), além de linhagens de glioma (U251 e U87) (SHANKAR et al., 2010).

Apesar da identificação prévia da proteína ou mRNA de AHNAK em estudos de vesículas extracelulares, o papel desempenhado por essa molécula em vesículas derivadas de câncer de mama permanece indefinida.

CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, concluímos que:

- Existe a presença e troca de vesículas entre as células tumorais e fibroblastos não tumorais quando co-cultivados;
- Células tumorais produzem mais vesículas do que fibroblastos;
- Vesículas isoladas de células MDA-MB-231 induzem a proliferação de células MCF-7 por meio da ativação de ERK 1/2;
- AHNAK está presente entre as proteínas que formam as microvesículas;
- AHNAK está localizada nas vesículas trocadas entre células tumorais e fibroblastos;
- AHNAK é importante para a migração, invasão celular e troca de vesículas, bem como, a depleção de AHNAK reduz o número de protrusões celulares e a liberação de vesículas;
- AHNAK é superexpressa em tumores de mama, quando comparado com o tecido normal.

REFERÊNCIAS*

AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/>>. Acesso em: Julho, 2015.

ANDERSON, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. **J. Cell Biol.**, v. 41, n. 1, p. 59-72, Abr 1969.

ANSA-ADDO, E. A. et al. Human plasma membrane-derived vesicles halt proliferation and induce differentiation of THP-1 acute monocytic leukemia cells. **J. Immunol.**, v. 185, n. 9, p. 5236-5246, Nov 2010.

ANTONYAK, M. A. et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 12, p. 4852-4857, Mar 2011.

ARAKELYAN, A. et al. Antigenic composition of single nano-sized extracellular blood vesicles. **Nanomedicine**, v. 11, n. 3, p.489-498, Dez 2014.

BENAUD, C. et al. AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. **J. Cell Biol.**, v. 164, n. 1, p. 133-144, Jan 2004.

BEST, M. G. et al. Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. **Acta. Neuropathol.**, v. 129, n. 6, p. 849-865, Jun 2015.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, Nov 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BORGES, V. F.; SCHEDIN, P. J. Pregnancy-associated breast cancer: an entity needing refinement of the definition. **Cancer**, v. 118, n. 13, p. 3226-3228, Jul 2012.

BORGONOVO, B. et al. Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, n. 12, p. 955-962, Dez 2002.

BURTON, E. R.; LIBUTTI, S. K. Targeting TNF-alpha for cancer therapy. **J. Biol.**, v. 8, p. 85.1-85.5, 2009.

CAMP, J. T. et al. Interactions with fibroblasts are distinct in Basal-like and luminal breast cancers. **Mol. Cancer Res.**, v. 9, n. 1, p. 3-13, Jan 2011.

CHARGAFF, E.; WEST, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **J. Biol. Chem.**, v. 166, n. 1, p. 189-197, Nov 1946.

CHASSEROT-GOLAZ, S. et al. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. **Mol. Biol. Cell**, v. 16, n. 3, p. 1108-1119, Mar 2005.

CHOI, D. S. et al. Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 34, n. 4, p. 474-490, Jul 2015.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. **Trends Cell Biol.**, v. 25, n. 6, p. 364-372, Jun 2015.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biol.**, v. 19, n. 2, p. 43-51, Fev 2009.

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

CONDE-VANCELLS, J. et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 12, p. 5157-5166, Dez 2008.

CRESCITELLI, R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **J. Extracell. Vesicles**, v. 12, n. 2, p. 1-10, 2013.

D'ASTI, E. et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. **Front. Physiol.**, v. 3, n. 294, p. 1-15, 2012.

D'SOUZA-SCHOREY, C.; CLANCY, J. W. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. **Genes Dev.**, v. 26, n. 12, p. 1287-1299, Jun 2012.

D'SOUZA-SCHOREY, C.; DI VIZIO, D. Biology and proteomics of extracellular vesicles: harnessing their clinical potential. **Expert. Rev. Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 251-253, Jun 2014.

DAVIS, T. A.; LOOS, B.; ENGELBRECHT, A. M. AHNAK: the giant jack of all trades. **Cell Signal.**, v. 26, n. 12, p. 2683-2693, Dez 2014.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress Chaperon.**, v. 16, n. 3, p. 235-249, Maio 2011.

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, n. 3, p. 256-268, Jul 2003.

DONG-LE BOURHIS, X. et al. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. **Int. J. Cancer**, v. 71, n. 1, p. 42-48, Mar 1997.

DUBREUIL, V. et al. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. **J. Cell Biol.**, v. 176, n. 4, p. 483-495, Fev 2007.

DUMITRU, C. A. et al. AHNAK and inflammatory markers predict poor survival in laryngeal carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2013.

EL ANDALOUSSI, S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 12, n. 5, p. 347-357, Maio 2013.

ENRICH, C. et al. Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 5, p. 935-947, Maio 2011.

GALINDO-HERNANDEZ, O. et al. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 91, n. 6, p. 299-310, Dez 2014.

GENTIL, B. J. et al. Expression of the giant protein AHNAK (desmoyokin) in muscle and lining epithelial cells. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, n. 3, p. 339-348, Mar 2003.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **J. Extracell. Vesicles**, v. 2, p. 1-3, 2013.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, Ago 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HANNAFON, B. N.; DING, W. Q. Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 7, p. 14240-14269, 2013.

HARRIS, D. A. et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-18, 2015.

HASHIMOTO, T. et al. Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK. **J. Cell Sci.**, v. 105, p. 275-286, Jun 1993.

HEIJNEN, H. F. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791-3799, Dez 1999.

HENDRIX, A.; HUME, A. N. Exosome signaling in mammary gland development and cancer. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 55, n. 7-9, p. 879-887, 2011.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Res.**, v. 13, n. 215, p. 1-7, 2011.

HOSSEINI-BEHESHTI, E. et al. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes. **Mol. Cell Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 863-885, Out 2012.

HU, M.; POLYAK, K. Microenvironmental regulation of cancer development. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 18, n. 1, p. 27-34, Fev 2008.

HUANG, Y. et al. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. **FASEB J.**, v. 21, n. 3, p. 732-742, Mar 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER /MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA/MS.
Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: Março, 2015.

JOSHI, P. A.; DI GRAPPA, M. A.; KHOKHA, R. Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammopoiesis. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 23, n. 6, p. 299-309, Jun 2012.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, Maio 2006.

KALRA, H. et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol.**, v. 10, n. 12, p. 1-5, 2012.

KARLSSON, M. et al. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 10, p. 2892-2900, Out 2001.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, Ago 1972.

KIM, D. K. et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. **Bioinformatics**, v. 31, n. 6, p. 933-939, Mar 2015.

KIM, J. et al. Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells: potential effects on the tumor microenvironment. **Cancer Biol. Ther.**, v. 15, n. 4, p. 409-418, Abr 2014.

KLEIFELD, O. et al. Identifying and quantifying proteolytic events and the natural N terminome by terminal amine isotopic labeling of substrates. **Nat. Protoc.**, v. 6, n. 10, p. 1578-1611, Out 2011.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends Cell Biol.**, v. 25, n. 4, p. 198-213, Abr. 2015.

KOUNO, M. et al. Ahnak/Desmoyokin is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 123, n. 4, p. 700-707, Out 2004.

KRUGER, S. et al. Molecular characterization of exosome-like vesicles from breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 44, p. 1-10, 2014.

KUCHARZEWSKA, P.; BELTING, M. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. **J. Extracell. Vesicles**, v. 2, p. 1-10, 2013.

KUHBIER, J. W. et al. Observed changes in the morphology and phenotype of breast cancer cells in direct co-culture with adipose-derived stem cells. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 134, n. 3, p. 414-423, Set 2014.

LE, M. T. et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 12, p. 5109-5128, Dez 2014.

LEE, I. H. et al. Ahnak functions as a tumor suppressor via modulation of TGF β /Smad signaling pathway. **Oncogene**, v. 33, n. 38, p. 4675-4684, Set 2014.

LEHNER, B. et al. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. **Cell Tissue Res.**, v. 345, n. 3, p. 313-328, Set 2011.

LESTER, S. C.; COTRAN, R. S. A mama. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **ROBBINS Patologia estrutural e funcional**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. Cap. 25, p. 979-1002.

LI, X. et al. Regulation of miRNA expression by Src and contact normalization: effects on nonanchored cell growth and migration. **Oncogene**, v. 28, n. 48, p. 4272-4283, Dez 2009.

LINDOSO, R. S.; COLLINO, F.; CAMUSSI, G. Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 10, p. 7959-7969, Abr 2015.

LORUSSO, A. et al. Annexin2 coating the surface of enlargeosomes is needed for their regulated exocytosis. **EMBO J.**, v. 25, n. 23, p. 5443-5456, Nov 2006.

LUGA, V. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1542-1556, Dez 2012.

LÖTVALL, J. 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**, v. 3, p. 1-6, 2014.

MAHR, D. M.; BHARGAVA, R.; INSANA, M. F. Three-dimensional in silico breast phantoms for multimodal image simulations. **IEEE Trans. Med. Imaging**, v. 31, n. 3, p. 689-697, Mar 2012.

MARTINS, V. R.; DIAS, M. S.; HAINAUT, P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 25, n. 1, p. 66-75, Jan 2013.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J. Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, Set 2010.

MENCK, K. et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. **J. Mol. Cell Biol.**, v. 7, n. 2, p. 143-153, Abr 2015.

MOHAMMADI, H. et al. Evaluation of synthesized platinum nanoparticles on the MCF-7 and HepG-2 cancer cell lines. **International Nano Letters**. v. 3, n.28, p.1-5. 2013.

MURALIDHARAN-CHARI, V. et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. **Curr. Biol.**, v. 19, n. 22, p. 1875-1885, Dez 2009.

MURALIDHARAN-CHARI, V. et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **J. Cell Sci.**, v. 123, n. 10, p. 1603-1611, Maio 2010.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 12, p. 929-941, Dez 2008.

OHNO, S.; ISHIKAWA, A.; KURODA, M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 65, n. 3, p. 398-401, Mar 2013.

PARSONAGE, G. et al. A stromal address code defined by fibroblasts. **Trends Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 150-156, Mar 2005.

QU, J. L. et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. **Dig. Liver. Dis.**, v. 41, n. 12, p. 875-880, Dez 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat. Med.**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, Nov 2013.

RACCHETTI, G. et al. Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome. **J. Cell Sci.**, v. 123, n. 2, p. 165-170, Jan 2010.

RAIMONDO, S. et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. **Cell Commun. Signal.**, v. 13, n. 8, p. 1-12, 2015.

RAPOSO, G.; STORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J. Cell Biol.**, v. 200, n. 4, p. 373-383, Feb 2013.

REZVANPOUR, A.; SANTAMARIA-KISIEL, L.; SHAW, G. S. The S100A10-annexin A2 complex provides a novel asymmetric platform for membrane repair. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 46, p. 40174-40183, Nov 2011.

RICHES, A. et al. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. **Eur. J. Cancer**, v. 50, n. 5, p. 1025-1034, Mar 2014.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.

SANDVIG, K.; LLORENTE, A. Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3. **Mol. Cell Proteomics**, v. 11, n. 7, p. 1-11, Jul 2012.

SANTOS, R. P. et al. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. **Tumour Biol.**, v. 32, n. 1, p. 145-157, Feb 2011.

SHANKAR, J. et al. Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 9, p. 3780-3790, Maio 2010.

SHAO, H. et al. Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. **Nat. Med.**, v. 18, n. 12, p. 1835-1840, Dez 2012.

SHEKHAR, M. P. et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. **Cancer Res.**, v. 61, n. 4, p. 1320-1326, Feb 2001.

SHTIVELMAN, E.; BISHOP, J. M. The human gene AHNAK encodes a large phosphoprotein located primarily in the nucleus. **J. Cell Biol.**, v. 120, n. 3, p. 625-630, Fev 1993.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 4, p. 575-581, Ago 2009.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat. Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 1470-1476, Dez 2008.

SOULE, H. D. et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res.**, v. 50, n. 18, p. 6075-6086, Set 1990.

STAUBACH, S.; RAZAWI, H.; HANISCH, F. G. Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. **Proteomics**, v. 9, n. 10, p. 2820-2835, Maio 2009.

STEGMAYR, B.; RONQUIST, G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. **Urol. Res.**, v. 10, n. 5, p. 253-257, 1982.

STUELTEN, C. H. et al. Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. 1-13, 2010.

SUDO, H. et al. AHNAK is highly expressed and plays a key role in cell migration and invasion in mesothelioma. **Int. J. Oncol.**, v. 44, n. 2, p. 530-538, Fev 2014.

SUSSMAN, J. et al. Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization. **J. Cell Biol.**, v. 154, n. 5, p. 1019-1030, Set 2001.

SWARTZ, M. A. et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. **Cancer Res.**, v. 72, n. 10, p. 2473-2480, Maio 2012.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 231-241, Mar 2008.

THÉRY, C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr. Protoc. Cell Biol.**, capítulo 3, unidade 3.22, p.1-29, Abr 2006.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 8, p. 581-593, Ago 2009.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 8, p. 569-579, Ago 2002.

TLSTY, T. D.; COUSSENS, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 1, p. 119-150, 2006.

TRAMS, E. G. et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 645, n. 1, p. 63-70, Jul 1981.

TURIÁK, L. et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. **J. Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 2025-2033, Set 2011.

TYAN, S. W. et al. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to secrete ADAMTS1 for cancer invasion through an epigenetic change. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.

VADER, P.; BREAKEFIELD, X. O.; WOOD, M. J. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. **Trends Mol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 385-393, Jul 2014.

VAN DER POL, E. et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. **Pharmacol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 676-705, Jul 2012.

VAN DOORMAAL, F. F. et al. Cell-derived microvesicles and cancer. **Neth. J. Med.**, v. 67, n. 7, p. 266-273, 2009.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **J. Extracell. Vesicles**, v. 2, p. 1-25, 2013.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br. J. Haematol.**, v. 13, n. 3, p. 269-288, Maio 1967.

YANG, M. et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. **Mol. Cancer**, v. 10, n. 117, p. 1-13, 2011.

YOON, Y. J.; KIM, O. Y.; GHO, Y. S. Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes. **BMB Rep.**, v. 47, n. 10, p. 531-539, Out 2014.

YUANA, Y.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. **Blood Rev.**, v. 27, n. 1, p. 31-39, Jan 2013.