

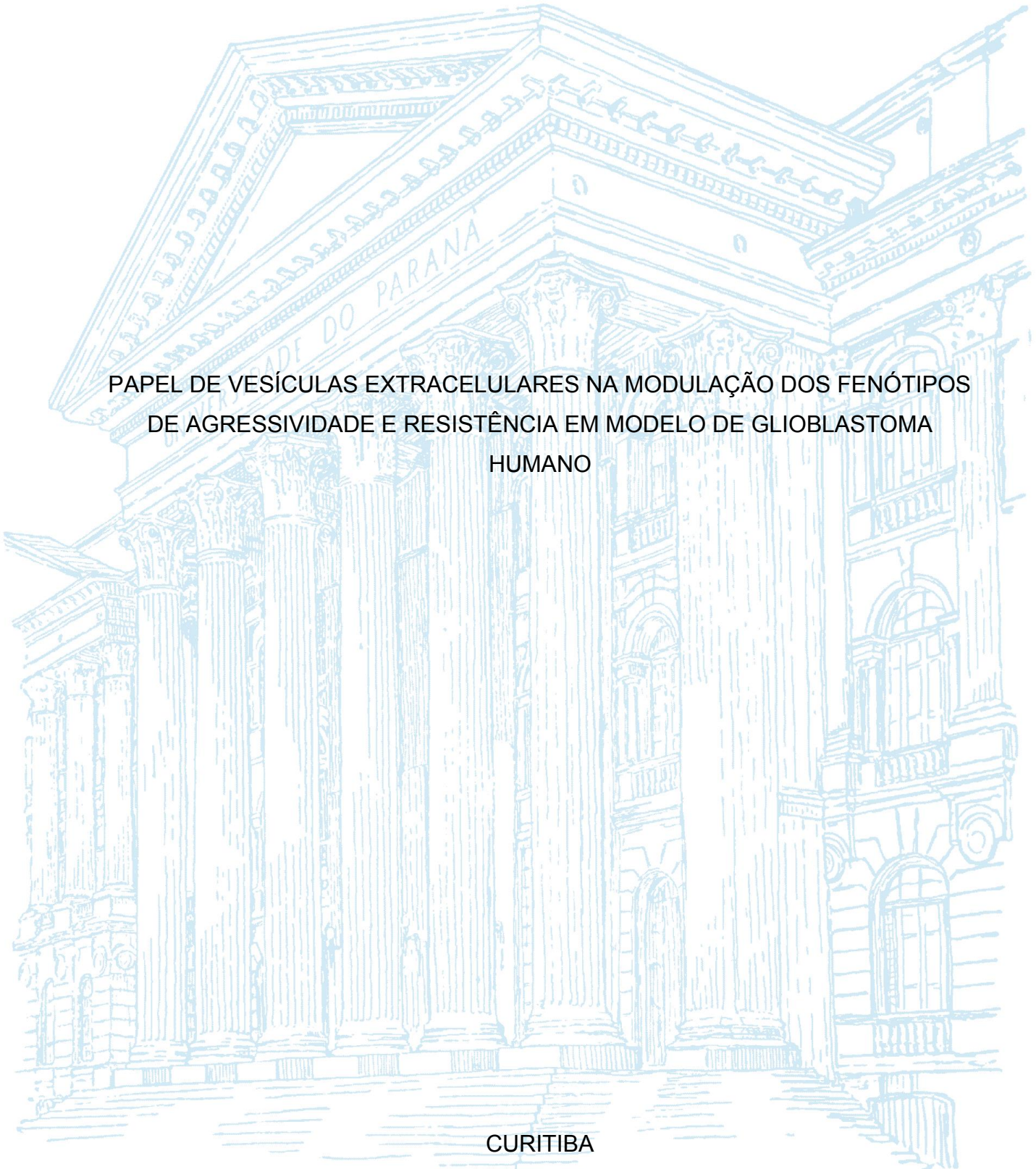
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA SIMÕES PIRES RIBEIRO

PAPEL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS  
DE AGRESSIVIDADE E RESISTÊNCIA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA  
HUMANO

CURITIBA

2021



CAROLINA SIMÕES PIRES RIBEIRO

PAPEL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS  
DE AGRESSIVIDADE E RESISTÊNCIA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA  
HUMANO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer

Coorientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribeiro, Carolina Simões Pires

Papel de vesículas extracelulares na modulação dos fenótipos de agressividade e resistência em modelo de glioblastoma humano. / Carolina Simões Pires Ribeiro. – Curitiba, 2021.

100 p.: il.

Orientadora: Sheila Maria Brochado Winnischofe.

Coorientador: Marcel Ivan Ramírez.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Glioblastoma. 2. Resistência a medicamentos. 3. Temozolomida. I. Título II. Winnischofer, Sheila Maria Brochado, 1976-. III. Ramírez, Marcel Iván. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (22. ed.) 616.9948



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINA SIMOES PIRES RIBEIRO** intitulada: **PAPEL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA MODULAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE AGRESSIVIDADE E RESISTÊNCIA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA HUMANO**, sob orientação da Profa. Dra. SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Janeiro de 2021.

Assinatura Eletrônica  
03/02/2021 14:27:08.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
16/03/2021 14:41:58.0

ANDREA SENFF RIBEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
03/02/2021 15:53:44.0

MARINA TROMBETTA LIMA

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF GRONINGEN)

Assinatura Eletrônica  
03/02/2021 10:37:21.0

MARIA ELIANE MERLIM ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
09/02/2021 14:22:14.0

TÂNIA BEATRIZ CRECZYNSKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

---

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: [pgbioq@ufpr.br](mailto:pgbioq@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 71910

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 71910

Dedico esse trabalho à memória dos meus “Vô Velho” e “Vó Lelê”.

A ele, por ter sempre nos lembrar de nunca pararmos de estudar e a ela, por ser um dos meus maiores exemplos como ser humano, mulher, mãe e avó.

Estejam onde estiverem, serão minha primeira referência e lembrança para todas as vezes que eu quis contar para alguém uma conquista minha.

Com todo o meu amor e saudade...

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de demonstrar os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese se concretizasse.

Agradeço à minha super orientadora, Prof.<sup>a</sup> Sheila, por todos esses anos juntas, pela confiança, paciência, apoio e carinho durante esse período. Obrigada pelas oportunidades e por dividir teus conhecimentos comigo.

Ao meu coorientador, prof. Marcel, por ser mais que um professor, por todo teu tempo dedicado a me auxiliar, a me corrigir e orientar, tanto no trabalho como na vida. Muito obrigada por tanto.

Agradeço também aos meus familiares, principalmente meus queridos pais, por sempre acreditarem em mim, me incentivarem a ir além e por me apoiarem em todas as decisões.

Ao meu marido, Pedro, por continuar sendo minha maior inspiração como pesquisador. Pra ti amor, não tenho palavras suficientes que representem toda minha gratidão, por tu estar sempre do meu lado, em todas as horas, por me ajudar, por ser paciente, por ser meu parceiro de vida e jornada. Em todos os momentos, bons e não tão bons, tu sempre esteve ali comigo. Tu e a nossa família me fazem querer ser melhor, como pessoa e como profissional, todos os dias. Te amo.

A minha família pelotense, meu muito obrigada por estarem sempre “perto” e dispostos a ajudar e se fazerem presentes na nossa vida.

Obrigada aos meus avós, Ênio e Celina, por continuarem me colocando em um patamar que sequer atingi, mas ainda assim, continuo tentando com que sintam orgulho pela minha dedicação, que de certa forma, faz com que fiquemos tanto tempo separados fisicamente.

Agradeço à minha irmã, Luiza, por me proporcionar momentos de descontração e alegrias, por ser minha cúmplice e primeira melhor amiga. Tu já és o meu orgulho como pessoa e como profissional.

A todos os meus familiares e amigos, muito obrigada. Vocês são muito importantes na minha vida e o carinho e afeto de vocês me faz querer retribuir ainda mais a cada um.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório de oxidações biológicas e aos colegas do grupo de vesículas, que além de colegas de trabalho se tornaram

uma família pra mim aqui em Curitiba e são laços que quero levar pra sempre comigo.

Agradeço em especial a Elaine, Rafa, Diego, Will, Paloma, Monique, Ju Bark, Lis, Henrique, Viktor, Mari, Jainy, Iza que são mais que amigos, friends. Pra vocês, minha gratidão é pouca.

A prof.<sup>a</sup> Gláucia, prof.<sup>a</sup> Carolina e a Marina, pelas correções de projeto, relatórios e qualificação do trabalho, obrigada pelo incentivo e pelos conselhos sempre que precisei.

As demais professoras do grupo de oxidações biológicas pelas orientações e ensinamentos.

As professoras que aceitaram ser membros da minha banca final de defesa, meu muito obrigado. Toda contribuição e toda crítica construtiva são sempre bem vindas.

As agências CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.*

*Não sou o que deveria ser, mas Graças a  
Deus, não sou o que era antes”*

- Martin Luther King



## RESUMO

Os gliomas apesar de apresentarem baixa incidência (2% dos tumores malignos em geral) possuem altas taxas de mortalidade. O quimioterápico padrão para esse tipo de tumor é a Temozolomida (TMZ). Dentre os gliomas, os astrocitomas são os mais comuns e são classificados de acordo com o grau de agressividade (I a IV), sendo o IV conhecido como glioblastoma - GB. Apesar do progresso na terapia, o perfil de agressividade e os mecanismos de resistência tumoral dificultam o tratamento. Células de GB secretam vesículas extracelulares (VEs) e o conteúdo dessas vesículas pode estar associado à modulação de fenótipos como agressividade e resistência. Diversos alvos moleculares caracterizados na biologia tumoral vêm sendo descritos no conteúdo vesicular. No presente trabalho, um de nossos principais alvos é o gene supressor de tumor *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* (associado a mau prognóstico) com o objetivo de avaliar o papel de ambos na modulação dos fenótipos de agressividade e resistência, via VEs, em modelo de GB humano. Foram utilizadas as linhagens A172, T98G, U87MG, U87MG-EGFR, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3, diferentes em relação ao grau de agressividade e nível de expressão endógena dos transcritos. Nossos resultados mostram que VEs derivadas destas células foram caracterizadas como uma população majoritariamente de microvesículas (cerca de 200 nm). A internalização das VEs foi observada na linhagem A172 incubada com VEs derivadas das outras linhagens. Houve aumento na proliferação e na capacidade de formação de colônias em substrato sólido das células A172 após incubação com VEs de células mais agressivas (U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK var 3), sugerindo que essas VEs modularam o fenótipo de agressividade das células A172. Ainda, os resultados sugerem um aumento da proteína RECK endógena nas células A172 após incubação com VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK, assim como um aumento nos níveis de transcrito de RECK-var 3 após incubação com VEs da linhagem U87MG-RECK var3. Juntos, esses resultados mostram a participação de ambos os transcritos na modulação do fenótipo de agressividade. Comparando os perfis das células U87MG e T98G na responsividade à TMZ, foi observado que células U87MG incubadas com VEs derivadas de T98G (resistente à TMZ) e posteriormente tratadas com TMZ aumentaram a sua resistência ao quimioterápico. Por outro lado, VEs derivadas de U87MG incubadas em células T98G parecem sensibilizá-las à TMZ enquanto VEs derivadas de U87MG-RECK var 3 parecem reverter esse efeito, não alterando a resistência ao tratamento. Os resultados encontrados até o momento evidenciam que células de glioblastoma com níveis diferenciados de *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de modular o fenótipo proliferativo e de resistência tumoral via sua capacidade de secreção de VEs com características distintas.

**Palavras-chave:** Glioblastoma; vesículas extracelulares; agressividade; resistência; temozolomida *RECK*; *RECK-var 3*

## ABSTRACT

Despite gliomas have a low incidence (2% of malignant tumors in general), they have high mortality rates. The standard chemotherapy for this type of tumor is Temozolomide (TMZ). Among gliomas, astrocytomas are the most common and are classified according to the degree of aggression (I to IV), the IV being known as glioblastoma - GB. Despite progress in therapy, the profile of aggressiveness and the mechanisms of tumor resistance make treatment difficult. GB cells secrete extracellular vesicles (EVs), and the contents of these vesicles may be associated with the modulation of phenotypes such as aggressiveness and resistance. Several molecular targets characterized in tumor biology have been described in the vesicular content. In the present study, one of our targets is the RECK tumor suppressor gene and its alternative RECK-var 3 transcript (associated with poor prognosis) to evaluate the role of both in modulating the phenotypes of aggression and resistance, via EVs, in a human GB model. The cell lines A172, T98G, U87MG, U87MG-EGFR, U87MG-RECK and U87MG-RECK var 3 were used, different in relation to the degree of aggressiveness and level of endogenous expression of the transcripts. Our results show that EVs derived from these cells were characterized as a population mainly of microvesicles (about 200 nm). The internalization of EVs was observed in the A172 cells incubated with EVs derived from the other cells. There was modulation in the proliferation and colony formation capacity on solid substrate of A172 cells after incubation with EVs of more aggressive cells (U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK var 3), suggesting that these EVs modulated the cell aggressiveness phenotype A172. Furthermore, we can observe the modulation of the endogenous RECK protein in A172 cells after incubation with EVs derived from the U87MG-RECK cells, as well as an increase in the transcript levels of RECK-var 3 after incubation with EVs of the U87MG-RECK var3 cells. Together, these results suggest the participation of both transcripts in the modulation of the aggressiveness phenotype. Comparing the profiles of U87MG and T98G cells in response to TMZ, it was observed that U87MG cells incubated with EVs derived from T98G (resistant to TMZ) and subsequently treated with TMZ increased their resistance to chemotherapy. On the other hand, EVs derived from U87MG incubated in T98G cells appear to sensitize them to TMZ while EVs derived from U87MG-RECK var 3 seem to reverse this effect, without changing the resistance to treatment. The results found so far show that glioblastoma cells with differentiated levels of RECK and RECK-var 3 can modulate the proliferative and tumor resistance phenotype, mediated by the secretion capacity of EVs with different characteristics.

**Keywords:** Glioblastoma; extracellular vesicles; aggressiveness; resistance; temozolomide; *RECK*; *RECK-var 3*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ORIGEM DOS DIFERENTES TIPOS DE GLIOMA .....	16
FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS SÍTIOS DE METILAÇÃO GERADOS PELA TMZ.....	19
FIGURA 3 - PRINCIPAIS MECANISMOS DE REPARO AOS DANOS CAUSADOS PELA TEMOZOLOMIDA (TMZ) .....	20
FIGURA 4 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA BIOGÊNESE DOS DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	22
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DE <i>RECK</i> E O VARIANTE DERIVADO DE SPLICING ALTERNATIVO <i>RECK-VAR 3</i> .....	28
FIGURA 6 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL – MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE AGRESSIVIDADE .....	31
FIGURA 7 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL – MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA .....	32
FIGURA 8 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGENS PARENTAIS A172 E U87MG.....	44
FIGURA 9 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS LINHAGENS A172 E U87MG EM SUBSTRATO SÓLIDO.....	45
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES UTILIZADOS PARA GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE <i>RECK</i> E <i>RECK-VAR 3</i> .....	46
FIGURA 11 - GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA CARACTERIZAÇÃO POR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA) DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DAS DIFERENTES LINHAGENS.....	48
FIGURA 12 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS OBTIDAS DE CADA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA (A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG- <i>RECK</i> E U87MG- <i>RECK VAR 3</i> ) AVALIADAS POR NTA.....	50
FIGURA 13 - UPTAKE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÉLULAS DA LINHAGEM A172 .....	52
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM A172 NA PRESENÇA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE DIFERENTES LINHAGENS.....	54

FIGURA 15 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM SUBSTRATO SÓLIDO DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E DAS CÉLULAS A172 INCUBADAS COM AS DIFERENTES VESÍCULAS .....	59
FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DAS COLÔNIAS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E DAS CÉLULAS A172 INCUBADAS COM AS VESÍCULAS DERIVADAS DE CADA UMA DELAS .....	61
FIGURA 17 - DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK NAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK, U87MG-RECK VAR 3 E NA LINHAGEM A172 APÓS INCUBAÇÃO COM AS DIFERENTES VESÍCULAS .....	64
FIGURA 18 - DETECÇÃO DE RECK (110 KDA) NA LINHAGEM U87MG E EM POOL DE VESÍCULAS DERIVADAS DA MESMA.....	65
FIGURA 19 –DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO DE RECK E RECK-VAR 3 NA LINHAGEM A172 E NA LINHAGEM A172 APÓS INCUBAÇÃO COM VESÍCULAS DERIVADAS DE A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK, U87MG-RECK VAR 3 .....	66
FIGURA 20 - CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS DERIVADAS DA LINHAGEM T98G POR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA) .....	68
FIGURA 21 – CURVA PADRÃO DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGEM T98G E U87MG TRATADAS COM DMSO E TMZ .....	70
FIGURA 22 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM U87MG TRATADA COM TMZ E TMZ + VES DERIVADAS DA LINHAGEM T98G .....	71
FIGURA 23 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM U87MG EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO .....	73
FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM U87MG .....	74
FIGURA 25 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM T98G TRATADA COM TMZ E TMZ + VES DA LINHAGEM U87MG .....	76
FIGURA 26 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM T98G EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO .....	77
FIGURA 27 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM T98G.....	78

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS PROJETADOS COM PRIMERBLAST .....	41
TABELA 2 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172 E U87MG .....	44
TABELA 3 –QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS EXTRATOS DE VESÍCULAS OBTIDOS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 .....	47
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DE VESÍCULAS OBTIDAS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 .....	51
TABELA 5 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172 E U87MG E A172 COM AS RESPECTIVAS VESÍCULAS	56
TABELA 6 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E A172 COM AS RESPECTIVAS VESÍCULAS .....	57
TABELA 7 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM U87MG SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO .....	72
TABELA 8 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM U87MG SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BER: Reparo por Excisão de Bases  
BHE: Barreira Hematoencefálica  
DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindole  
DMEM-AG: Meio Dulbecco MEM Alta Glucose  
DMSO: Dimetil Sulfóxido  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
ERK: Quinases reguladas por sinal extracelular  
EV: Extracellular vesicles  
FPP: Farnesil Pirofosfatase  
GB: Glioblastoma  
HCl: Ácido clorídrico  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
MAPK: Proteínas Quinases Ativadas por Mitogênio  
MEC: Matriz Extra Celular  
MGMT: Metilguanina Metiltransferase  
miR: MicroRNA  
MMP: Metaloproteinase MMR: Reparo de mal pareamento do DNA  
MTIC: Monometil Triazenoimidazol Carboxamida  
MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium  
MT-MMPs: Membrana tipo MMP  
N3-metil-A: N3-metiladenina  
N7-metil-G: N7-metilguanina  
NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa  $\beta$   
NOS: Óxido Nítrico Sintetase  
NTA: Nanoparticle Tracking Assay  
O6MeG: O6-metilguanina  
PBS: Tampão Fosfato Salino PFA: Paraformaldeído  
PVDF: Difluoreto de polivinilideno  
RECK: Proteína rica em cisteína, indutora de reversão, com motivos Kazal  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida  
SFB: Soro Fetal Bovino

SiRNA: Pequenos fragmentos de DNA

SNC: Sistema Nervoso Central

TIMP: Inibidores teciduais de metaloproteinases

TMZ: Temozolomida

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose nuclear

VEs: Vesículas Extracelulares

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 OBJETIVOS .....	13
1.1.1 Objetivo geral .....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
1.2 JUSTIFICATIVA .....	14
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
1.3 GLIOMAS .....	15
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA TUMORAL E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS .....	18
1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	21
1.6 O GENE <i>RECK</i> E SEU PAPEL NA TUMORIGÊNESE .....	25
<b>2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR .....	33
3.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células .....	33
3.1.2 Soluções.....	33
3.1.3 Meios de cultura, linhagens celulares e condições de cultivo .....	34
3.2 PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	34
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	35
3.4 UPTAKE DE VESÍCULAS .....	36
3.5 CURVA DE PROLIFERAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE FENÓTIPO DE AGRESSIVIDADE .....	37
3.6 EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO - ENSAIO CLONOGÊNICO .....	37
3.7 MTT PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA.....	38
3.8 CRISTAL VIOLETA PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA.....	38
3.9 CURVA DE PROLIFERAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA .....	39
3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA .....	40
3.10.1 Extração e quantificação de proteínas .....	40
3.10.2 Imunodeteccção de proteínas .....	40
3.11 QRT-PCR.....	41
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42



<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1.1 Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares.....	47
4.1.2 Determinação do uptake de vesículas extracelulares .....	51
4.1.3 Avaliação da modulação do perfil de proliferação via VEs .....	54
4.1.4 Detecção de alvos moleculares.....	63
4.1.4.1 Western Blotting .....	63
4.1.4.2 qRT-PCR .....	66
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>91</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Tumores com origem no sistema nervoso central (SNC) representam cerca de 2% dos tumores malignos no mundo. Dentre eles, os gliomas compõe a maioria e de acordo com as células que os originam, podem ser chamados de oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos), astrocitomas (derivados de astrócitos) e oligoastrocitomas (tumores mistos) (ABTA, 2020).

Os astrocitomas são considerados o tipo mais comum de glioma e geralmente são classificados de acordo com suas características morfológicas e seu grau de agressividade, que varia de I a IV, sendo o grau IV considerado mais agressivo (também chamados de glioblastomas ou GB) (PREUSSER *et al.*, 2011; MAROSI, 2012).

Embora sejam tumores com baixa incidência, os glioblastomas consistem em um tipo de tumor cerebral mais comum (em torno de 16% dos tumores primários de cérebro e com origem no SNC) (THAKKAR *et al.*, 2014) e são considerados extremamente agressivos. Eles possuem progressão rápida e apresentam mau prognóstico (pois o tempo médio de sobrevivência dos pacientes com GB após tratamento é de 12 - 14 meses). O tratamento padrão para esse tipo de tumor é realizado com o quimioterápico Temozolomida (TMZ), cujo efeito citotóxico está relacionado à capacidade de promover danos no DNA das células tumorais (NAJBAUER; KRALJIK; NÉMETH, 2014; GEDEON *et al.*, 2014; SAYEGH *et al.*, 2014; BOVENBERG; DEGELING; TANNOUS, 2013; LIMA *et al.*, 2012), porém, os astrocitomas de graus III e IV possuem diversos mecanismos de resistência que podem levar à sobrevivência das células tumorais frente aos tratamentos (ORZA *et al.*, 2013).

Vesículas extracelulares (VEs) mediam a comunicação celular no microambiente tumoral (através da transferência de biomoléculas que possuem propriedades pró-tumorais e antitumorais), sendo capazes de modular diferentes fenótipos, promovendo aumento da agressividade e resistência ao tratamento (GANGODA *et al.*, 2015; YEKULA *et al.*, 2020).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na agressividade e na capacidade de resistência de células de glioblastoma é determinante para que haja uma melhoria nas terapias atuais, principalmente a partir da investigação de possíveis alvos moleculares.

Alguns estudos mostram que diferentes tipos celulares (tanto células normais como tumorais, inclusive GB) secretam vesículas extracelulares (VEs), constituídas por exossomos (30 - 100 nm) e microvesículas (100 nm à 1 µm), que podem transportar diversas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos (incluindo microRNAs), entre outras (DONGMEI SUN, 2010). Dessa forma, VEs derivadas de células tumorais podem ser capazes de modular diferentes fenótipos em células receptoras, que internalizam essas vesículas (THERY *et al.*, 2002; KHARAZIHA *et al.*, 2012). Dessa forma, pode-se considerar que VEs são importantes alvos para novos estudos em termos de diagnóstico e/ou prognóstico de doenças como os tumores.

No contexto de glioblastoma, foi demonstrado que a expressão de miR-21 em exossomos presentes no líquido de pacientes foi significativamente mais elevada em comparação à expressão no grupo controle (pacientes sem tumor), correlacionando negativamente a alta expressão de miR-21 com o baixo tempo de sobrevivência dos pacientes. No mesmo estudo, em modelo *in vitro*, a expressão de miR-21 foi inibida na linhagem de glioblastoma humano U251, e com isso, observou-se o aumento da expressão de genes alvo de miR-21 (como *RECK*, *PTEN*, *PDCD4*). Esse dado sugere que a presença de miR-21 ou de um de seus alvos no interior de VEs pode ser útil no diagnóstico e prognóstico de pacientes com glioblastomas (SHI, *et al.*, 2015).

Um dos alvos diretos de miR-21 é o gene *RECK* (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs), que codifica para uma glicoproteína de mesmo nome, rica em cisteína, expressa de forma ubíqua na maioria dos tecidos normais (OH *et al.*, 2001). O gene foi descrito pela primeira vez como um gene supressor tumoral, devido a sua capacidade de reverter o fenótipo tumoral induzido pelo oncogene *v-Ki-Ras* em fibroblastos murinos, e essa capacidade de reversão foi relacionada com o efeito inibitório em metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas remodeladoras de matriz extracelular e classicamente envolvidas no processo invasivo de células tumorais (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Na literatura, o papel mais bem descrito para *RECK* é a atuação como inibidor de MMPs, o que diminui a agressividade, capacidade de migração e invasão de células tumorais (NODA *et al.*, 2003). Alguns transcritos derivados de *splicing* alternativo de *RECK* vem sendo descritos na literatura. Entre eles, foi demonstrado que o transcrito *RECK-var 3* é capaz de promover o crescimento de células de glioma em meio semissólido de

agarose, e parece ter função oposta ao de *RECK* canônico, associado à progressão tumoral (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). Da mesma forma, a razão entre os transcritos *RECK* e *RECK-var 3* é menor em linhagens derivadas de lesões metastáticas do que as derivadas de tumores primários e a alta expressão do transcrito alternativo *RECK-var 3*, em comparação com a forma canônica, está relacionada ao menor tempo de sobrevida de pacientes com melanoma. (JACOMASSO et al., 2019), o que sugere que *RECK-var 3* está relacionado a um fenótipo celular mais agressivo.

Juntos esses trabalhos demonstram a correlação positiva da expressão de *RECK* com o tempo de sobrevida dos pacientes, tanto de glioma como de melanoma, caracterizando-o como um alvo molecular a ser explorado.

No presente trabalho buscamos avaliar se *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* são capazes de modular os fenótipos de agressividade e resistência tumoral mediados por vesículas extracelulares, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de transformação maligna em modelo de glioblastoma humano.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar o papel de *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* na modulação dos fenótipos de agressividade e resistência tumoral mediados por vesículas extracelulares em modelo de glioblastoma humano.

### 1.1.2 Objetivos específicos

I. Caracterizar vesículas extracelulares derivadas de linhagens de glioblastoma humano que expressam de forma diferencial o gene *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var3*;

II. Avaliar se as diferentes vesículas extracelulares originadas das diferentes linhagens de glioblastoma humano são capazes de modular o fenótipo de agressividade tumoral;

III. Correlacionar a modulação do fenótipo de agressividade promovida por vesículas extracelulares com a modulação da expressão de *RECK* e/ou *RECK-var 3* nas células receptoras;

IV. Avaliar a responsividade de células de glioblastoma humano à terapia convencional com quimioterápico Temozolomida (TMZ) e correlacionar com a modulação desse fenótipo via vesículas extracelulares.

V. Avaliar a modulação do fenótipo de responsividade à TMZ em células de glioblastoma, mediado por vesículas extracelulares secretadas a partir de células com expressão diferenciada de *RECK* e/ou *RECK-var 3*.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Tem sido demonstrado que glioblastomas são tumores extremamente agressivos, com rápida progressão e altas taxas de mortalidade. Essas características estão associadas à diferentes mecanismos moleculares, como a alta expressão de moléculas pró-tumorais e a própria secreção de VEs. Por terem papel importante na comunicação celular, VEs podem modular fenótipos tumorais como resistência ao tratamento e agressividade.

O entendimento de mecanismos envolvidos na agressividade e na capacidade de resistência de células de glioblastoma é determinante para que haja progresso nas terapias atuais, principalmente a partir da investigação de possíveis alvos moleculares envolvidos na modulação fenotípica.

O gene *RECK* destaca-se como um possível alvo molecular de interesse a ser explorado, pois a sua proteína (de mesmo nome), é capaz de reverter *in vitro* características relacionadas ao fenótipo agressivo tumoral e está envolvida em processos de angiogênese e metástase, associada a um melhor prognóstico de pacientes com diversos tipos de tumores. A complexidade de regulação e atuação do gene *RECK* foi recentemente ampliada, com a descrição de transcritos derivados de *splicing* alternativo, como o denominado *RECK-var 3*, com função distinta e oposta ao de *RECK* canônico, envolvido na progressão tumoral.

No presente trabalho buscamos avaliar se *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de modular os fenótipos de agressividade e resistência tumoral mediados por VEs, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de transformação maligna em modelo de glioblastoma humano.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.3 GLIOMAS

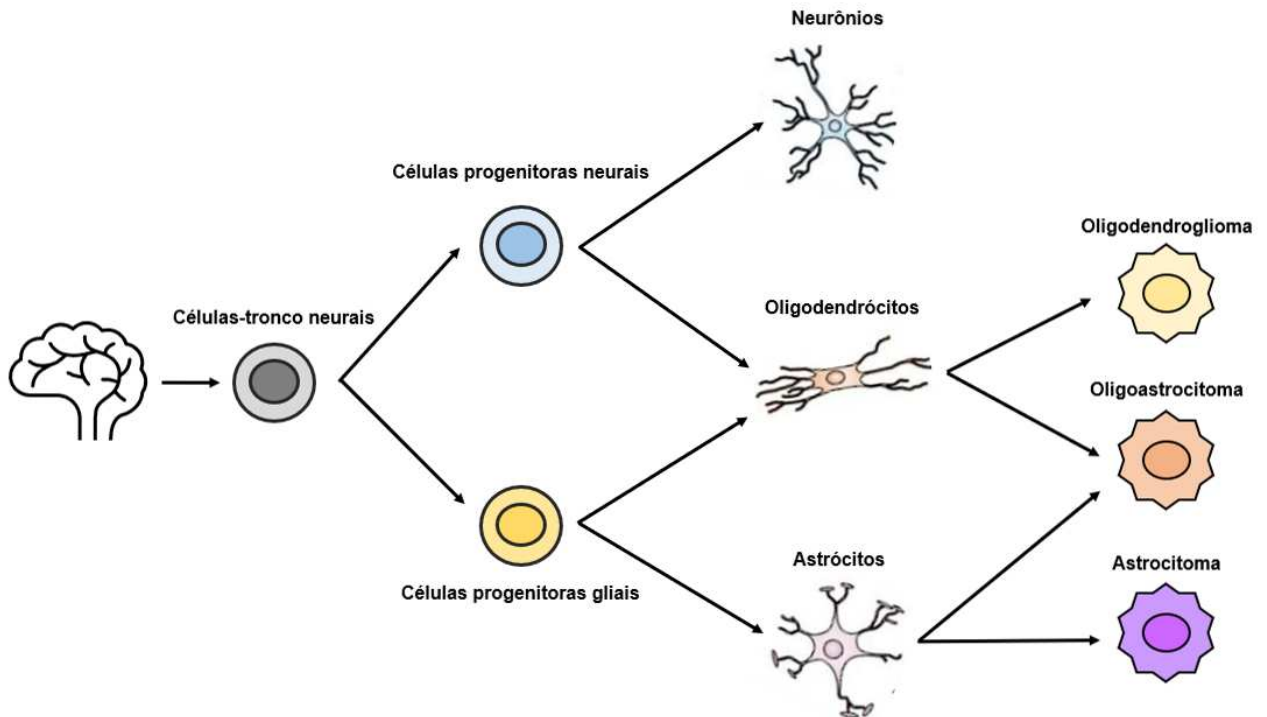
Dentre as células que compõe a glia no sistema nervoso central (SNC), os astrócitos são as células mais abundantes e suas principais funções são: promover sustentação e isolamento dos neurônios, captação e liberação de diversos neurotransmissores, formação da barreira hematoencefálica, secreção de fatores de sobrevivência, diferenciação dos neurônios, entre outras. Os astrócitos estão diretamente envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo no cérebro e participam do sistema imunológico (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013; KREBS, C.; WEINBERG, J.; AKESSON, 2013).

De todos os tipos de câncer existentes, aqueles com origem no SNC possuem baixa incidência, representando menos de 2% dos tumores em geral. Dentre eles, os gliomas representam cerca de 80% dos tumores malignos, com incidência principalmente na idade adulta (American Brain Tumor Association - ABTA, 2020). Apesar da baixa incidência desse tipo de tumor, são tumores extremamente agressivos e invasivos, pois apresentam uma rápida progressão e evolução (PERSAUD-SHARMA *et al.*, 2017).

No Brasil, para o ano de 2020, foram estimados 5.870 novos casos de gliomas em homens e 5.230 novos casos em mulheres de acordo com o Instituto Nacional de Câncer – INCA, 2020.

Os gliomas são originados de células-tronco neurais, células progenitoras ou de células neurais maduras diferenciadas (CAFFO *et al.*, 2013), e assim podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e histopatológicas como oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e astrocitomas (ABTA, 2016), como mostra a Figura 1. Os astrocitomas, derivados de astrócitos, compreendem aproximadamente 75% dos casos de glioma e assim como os demais tipos, podem ser classificados em uma escala de I-IV, segundo o grau de agressividade, onde o grau IV é considerado o mais agressivo e pode ser chamado de glioblastoma (PREUSSER *et al.*, 2011; MAROSI, 2012). O glioblastoma é o tumor primário mais comum no cérebro, representa cerca de 16% dos tumores com origem no SNC (THAKKAR *et al.*, 2014).

FIGURA 1 - ORIGEM DOS DIFERENTES TIPOS DE GLIOMA



FONTE: O autor, 2020.

De acordo com alguns estudos, os glioblastomas têm sido subdivididos de acordo com seu padrão molecular e da presença de mutações, originando classificações como proneural (PN), neural (NEU), clássico (CL) ou mesenquimal (MES), os quais diferem biologicamente e apresentam relevância clínica (FEDELE *et al.*, 2019; VERHAAK *et al.*, 2010), podendo na massa tumoral existir não um, mas diferentes subtipos, evidenciando a grande heterogeneidade dos glioblastomas.

O microambiente tumoral em modelo de glioma é constituído por células de glioma, células-tronco de glioma (GSC), células do estroma (oligodendrócitos, astrócitos, células endoteliais, micróglia) e células do sistema imunológico (como monócitos, macrófagos e linfócitos) (YEKULA *et al.*, 2020).

A progressão dos tumores está diretamente associada à interação entre as células tumorais e as demais células presentes no microambiente e na matriz. A matriz extracelular (MEC) é composta por moléculas como proteínas, glicoproteínas e carboidratos e sabe-se que a associação entre essas moléculas pode promover diferentes características, dependendo do tecido em que estão, como a resistência mecânica dos tendões, a elasticidade dos tecidos da pele, entre outras (ALBERTS, 2008; KÖNNECKE, H.; BECHMANN, I., 2013). A interação das células com a matriz

ocorre por moléculas de adesão célula-MEC, principalmente as integrinas, que são heterodímeros associados à membrana plasmática e possuem domínios de ligação a componentes da MEC como os colágenos, fibronectina e vitronectina (ALBERTS, 2008). Além de servir como suporte para as células, a MEC regula a difusão de moléculas sinalizadoras, facilitando ou impedindo que estas cheguem aos seus respectivos receptores (ALBERTS, 2008). Tumores com grande capacidade de migração ou invasão, deslocam o equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC no sentido de degradar as moléculas que a compõem para permitir a passagem de células tumorais pela matriz. Neste equilíbrio, a síntese das moléculas constituintes da matriz é contrabalançada pela produção de enzimas capazes de degradá-las (Adaptado de Jacomasso *et al.*, 2010).

Sendo assim, o sucesso de diferentes estratégias terapêuticas depende muito do tipo de tumor e do grau de malignidade, podendo ser em geral cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou uma combinação entre elas. A cirurgia normalmente é a primeira abordagem em tumores cerebrais, porém em muitos casos a localização do tumor não permite sua retirada completa e isso pode comprometer e deixar sequelas no paciente (CAFFO *et al.*, 2013; OMURO; DEANGELIS, 2013). Para astrocitomas de grau I a principal estratégia terapêutica é a remoção cirúrgica, já que esses tumores são considerados biologicamente benignos. Astrocitomas de grau II também são considerados de baixo grau, porém, embora se desenvolvam lentamente, a remoção cirúrgica deve ser acompanhada de quimioterapia, pois podem se tornar malignos em poucos anos na maioria dos casos (HUI *et al.*, 2013). Astrocitomas de grau III são considerados malignos e podem evoluir para óbito do paciente em poucos anos e os astrocitomas de grau IV (glioblastomas - GB), são o tipo mais comum e invasivo entre eles, possuem evolução rápida, são geralmente resistentes a quimioterápicos convencionais e possuem mau prognóstico, pois o tempo de sobrevivência dos pacientes é de no máximo 15 meses (NAKADA *et al.*, 2018; ZONG, 2012; HUI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

Conhecer e entender os mecanismos envolvidos na resistência das células de glioblastoma aos tratamentos convencionais com quimioterápicos seria a estratégia ideal para intervir e melhorar as combinações terapêuticas atuais, principalmente partindo da investigação de novos alvos moleculares que possam estar envolvidos em algum desses mecanismos celulares de resistência tumoral.

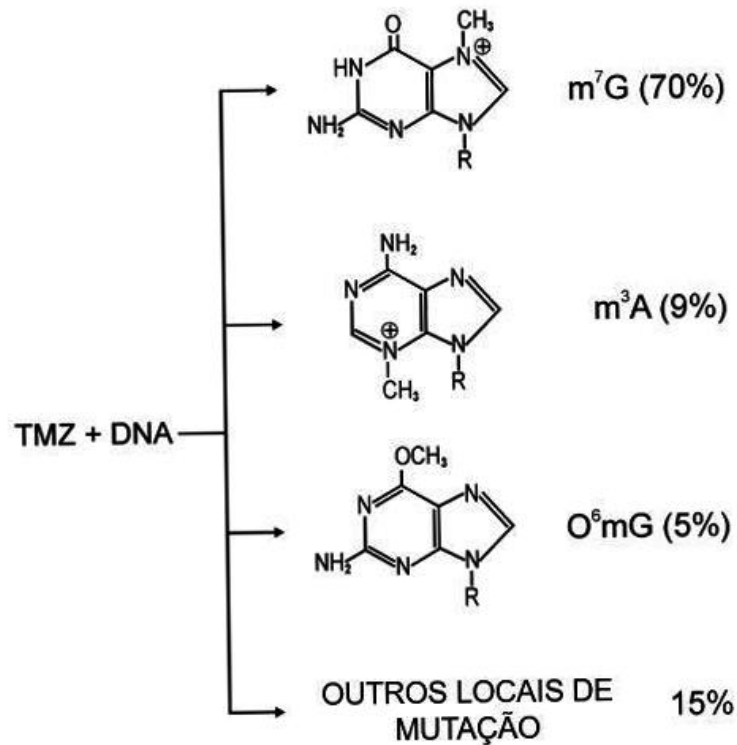


## 1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA TUMORAL E ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

O efeito citotóxico da maioria das drogas usadas em terapias convencionais, bem como em modelo de glioblastoma, está relacionado com a capacidade que o fármaco tem em gerar danos no DNA da célula tumoral. O tratamento padrão para glioblastomas envolve o uso do quimioterápico Temozolomida (TMZ) e geralmente deve ser acompanhado de radioterapia. Em ensaios clínicos, por exemplo, a dose recomendada de TMZ varia entre 750 e 1000 mg/m<sup>2</sup> administrados por via oral 5 dias por semana durante 4 semanas (LEE, 2016). Embora essa estratégia possa aumentar o tempo de sobrevida dos pacientes (NAJBAUER; KRALJIK; NÉMETH, 2014; GEDEON *et al.*, 2014; SAYEGH *et al.*, 2014; BOVENBERG; DEGELING; TANNOUS, 2013; LIMA *et al.*, 2012), é pouco eficaz na promoção de morte das células tumorais, evidenciando a necessidade da busca por novas abordagens terapêuticas e novos alvos moleculares envolvidos nos fenótipos de agressividade e resistência no modelo de glioblastoma humano (ORZA *et al.*, 2013).

A Temozolomida (TMZ) é um agente alquilante da família imidazoltetrazina (KHASRAW *et al.*, 2009), e como é uma substância lipofílica, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Observa-se na Figura 2 que seu principal mecanismo de ação é a metilação das posições N7 (70%) e O6 (5 a 10%) da guanina e N3 (~10%) da adenina (KOHSAKA; TANAKA, 2013). A metilação na posição O6 da guanina é a responsável pelo efeito biológico mais severo e importante dos agentes alquilantes, como mutagenicidade e alta citotoxicidade, embora apenas 5 - 10 % das metilações ocorra nessa posição (BERANEK, 1990), pois ao gerar a O6-metilguanina (O6MeG), esta pareia de forma errônea com timina no lugar de citosina, o que induz morte celular na tentativa de reparar as bases pareadas incorretamente (BEIER; SCHULZ; BEIER, 2011; CABRINI *et al.*, 2015).

FIGURA 2 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS SÍTIOS DE METILAÇÃO GERADOS PELA TMZ



FONTE: Adaptado de BARCISZEWSKA *et al.*, 2015.

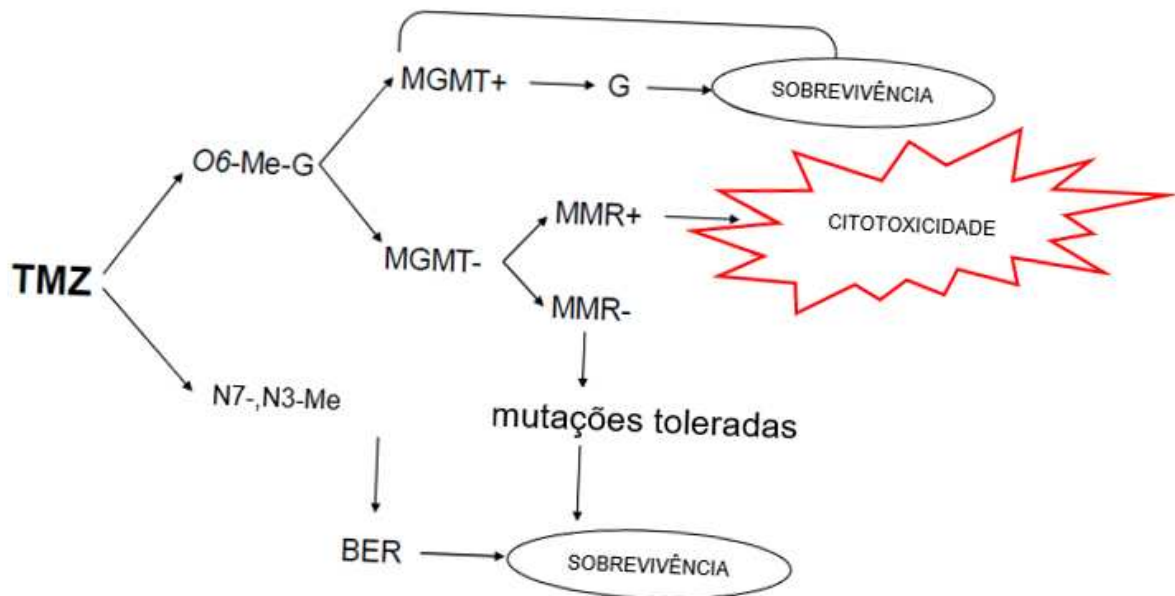
Na Figura 3 é possível compreender que um dos mecanismos de resistência tumoral extremamente importante em modelo de glioma é a presença da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), que faz reparos no DNA ao remover grupos metil adicionados pela TMZ, na posição O6 da guanina, e assim gera resistência às células de glioblastoma (KNIZHNIK *et al.*, 2013; WELLER *et al.*, 2010).

Contudo, MGMT não é o único meio de reparo das células tumorais frente a agentes alquilantes. No caso da metilação na posição O6 da guanina, também há o mecanismo de reparo por MMR (Mismatch Repair Genes), que são genes reparadores de emparelhamento capazes de corrigir erros durante a replicação do DNA. É um mecanismo também associado à maior resistência tumoral, pois a metilação gerada pela TMZ pode ser reparada por MMR, reconhecendo bases mal pareadas e repara os erros na replicação do DNA, o que gera quebras na fita de DNA na próxima fase de duplicação, principalmente quando há falha no reparo por MGMT (YOSHIMOTO *et al.*, 2012), levando a morte celular.

Por outro lado, além da metilação na posição O6 da guanina, existe uma metilação via TMZ na posição N7-metil-G (N7-metilguanina) e N3-metil-A (N3-

metiladenina) que pode ser reparada pelo mecanismo de excisão de bases conhecida como BER (Base Excision Repair). As lesões em N7-metil-G, N3-metil-A compreendem mais de 80% das lesões induzidas pela TMZ no DNA (TENTORI; GRAZINI, 2002; SOBOL; WILSON, 2001). Esse mecanismo consiste no reconhecimento e excisão de bases danificadas, reparando danos em nucleotídeos após reações como oxidação, hidrólise ou desaminação (ZHANG *et al.*, 2012).

FIGURA 3 - PRINCIPAIS MECANISMOS DE REPARO AOS DANOS CAUSADOS PELA TEMOZOLOMIDA (TMZ)



FONTE: Adaptado de ZHANG *et al.*, 2012.

NOTA: Principais mecanismos de reparo de DNA ao tratamento com Temozolomida. TMZ metila a posição O6 (O6-Me-G), e N7 da guanina e N3 da adenina (N7-,N3-Me). A metilação na posição O6-Me-G, na presença da enzima metilguanina metiltransferase (MGMT+) é reparada, levando sobrevivência celular. Na ausência da enzima metilguanina metiltransferase (MGMT-), não ocorre o reparo de DNA acarretando pareamento errôneo de bases, e assim ativação da via de reparo MMR. Na presença de MMR (MMR+) ocorre a tentativa de reparo do DNA, onde ocorre sucessivas quebras na fita dupla do DNA, levando a morte celular. Na ausência de MMR (MMR-), a tentativa de reparo no DNA não ocorre, levando a sobrevivência celular. Quando ocorre a metilação nas posições N7, N3-Me, a via de reparo por excisão de bases (BER) é ativada. A ativação da via BER leva a sobrevivência celular.

Dessa forma, a ação citotóxica da temozolomida (TMZ) depende que os sistemas de reparo (MGMT, MMR, BER, entre outros) estejam ou não funcionais.

As falhas do tratamento estão sendo também relacionadas à existência de uma subpopulação celular, conhecida como células iniciadoras de gliomas malignos ou células tronco-tumorais (JIN *et al.*, 2017), capazes de resistir ao tratamento com TMZ e radiação devido, entre outros aspectos, à alta expressão de Bcl-2, proteína anti-apoptótica (UENO *et al.*, 2010) e à expressão de onco-micro-RNAs, como miR-21 (ZHANG *et al.*, 2012). A inibição de miR-21 (utilizando o inibidor 2'-O-methyl (2'-OMe) para miR-21) em células-tronco tumorais de glioblastoma humano (derivadas da linhagem U251) potencializou os efeitos da TMZ, levando ao aumento de apoptose nessa subpopulação (ZHANG *et al.*, 2012).

Vale lembrar que a expressão de alguns miRNAs pode ser determinante na avaliação de prognóstico, diagnóstico e estratégias terapêuticas em tumores, principalmente em modelo de GB. Dentre esses miRNAs (como miR-21, miR-7, miR-9, miR-124, miR-15, miR-16, miR-375 entre outros) (MATOS *et al.*, 2018; DONGMEI SUN, 2010; KHARAZIHA *et al.*, 2012), o miR-21 destaca-se no envolvimento da progressão de tumores e tem como alvo diversos genes supressores de tumor (como *RECK*, *PTEN*, entre outros) sendo associado à proliferação, apoptose e invasão (FENG *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de resistência a ser destacado é a presença de transportadores ABC na membrana celular, como a glicoproteína-P (P-gp-ABCB1) e a proteína associada à resistência de múltiplos fármacos (PRM, ABCC1), pois estes são capazes de promover o efluxo e redução intracelular do quimioterápico, o que impede sua ação citotóxica (VERINGA *et al.*, 2013).

De forma interessante, cada vez mais na literatura tem sido estabelecido que o conteúdo de vesículas extracelulares (VEs) (que carregam proteínas, lipídeos, RNAs, microRNAs, DNAs, e outras biomoléculas) pode refletir e influenciar no microambiente tumoral e ser capaz de modular mecanismos de resistência e agressividade tumoral.

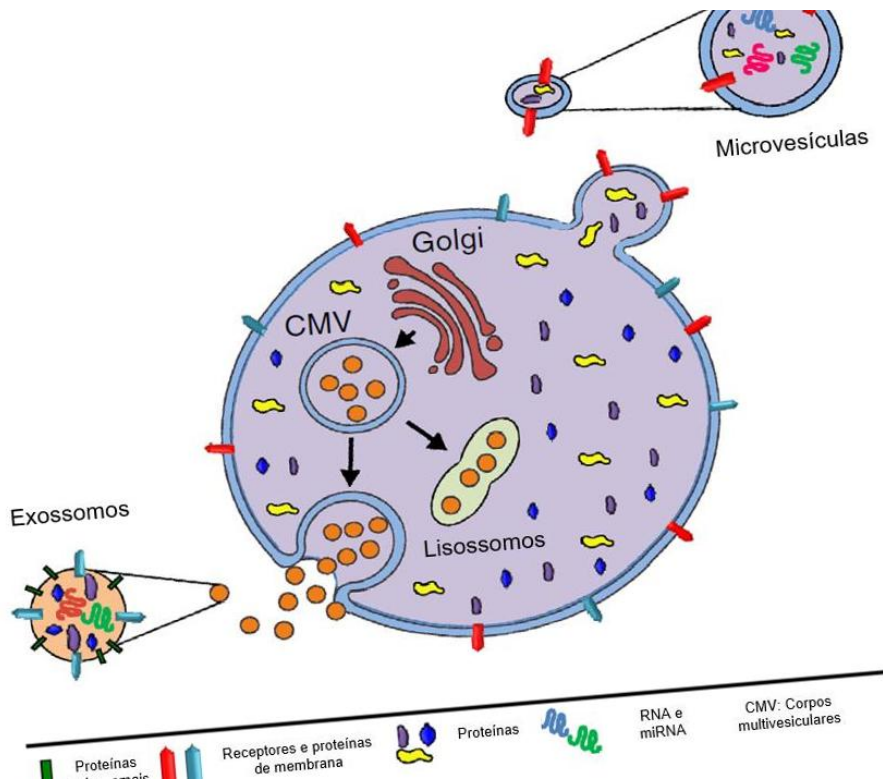
## 1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES

Vesículas extracelulares (VEs) são pequenas “bolsas” delimitadas por bicamada lipídica formadas pela maioria dos tipos celulares que vem sendo estudadas há alguns anos devido a sua participação na comunicação célula x célula e transporte de biomoléculas (THERY *et al.*, 2002).

No contexto de câncer, VEs medeiam a comunicação celular no microambiente, modulando propriedades pró-tumorais e antitumorais nas células receptoras (GANGODA *et al.*, 2015). Assim, a caracterização de VEs pode ser considerada uma boa estratégia na avaliação da modulação de fenótipos tumorais, na compreensão da biologia tumoral, no diagnóstico da doença e na formulação de estratégias terapêuticas (YEKULA *et al.*, 2020).

O mecanismo de formação e liberação das VEs varia de acordo com a célula de origem e estas podem cumprir funções diferentes, dependendo do conteúdo interno (YIM e CHOI, 2016). Dessa forma, são classificadas de acordo com suas propriedades físicas e bioquímicas (Figura 4).

FIGURA 4 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA BIOGÊNESE DOS DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES



FONTE: Adaptado de ROVIRA *et al.*, 2017.

Normalmente, microvesículas são derivadas da membrana plasmática e tem um tamanho entre 100 nm e 1 µm. Já os exossomos, são vesículas derivadas de corpos vesiculares (presentes no citoplasma) possuem tamanho entre 30 – 100 nm. Corpos apoptóticos não são considerados vesículas extracelulares apesar de serem

secretados pelas células, e são formados a partir de células que estão em processo de morte por apoptose, tendo tamanho maior (8 - 12  $\mu\text{m}$ ).

Por serem vetores naturais para a transferência de biomoléculas, é crescente o interesse em vesículas extracelulares em modelo tumoral (MONFARED *et al.*, 2019; GOURLAY *et al.*, 2016; RAPOSO e STOORVOGEL 2013; SANTIAGO-DIEPPA *et al.*, 2014).

Já foi demonstrado que o conteúdo interno de VEs reflete o fenótipo e genótipo da célula secretora, sendo capaz de alterar o fenótipo de uma célula receptora (GODLEWSKI *et al.*, 2015). Um bom exemplo, em modelo de glioblastoma, é a pesquisa de Setti e colaboradores (2015) que avaliou o papel de VEs derivadas da linhagem U87MG, ora superexpressando CLIC1 (que é uma proteína que está associada a um mau prognóstico de pacientes com GB) – linhagem U87MG-CLIC1, ora com CLIC1 silenciada – linhagem U87MG-siCLIC1, em diferentes linhagens de GB (U87MG, U118MG, T98G). Foi observado que a incubação das diferentes células parentais com VEs derivadas da linhagem U87MG-CLIC1 promoveu o aumento da proliferação celular *in vitro* (modulando o microambiente tumoral) e aumentou o volume tumoral *in vivo* (mediando a expansão das células tumorais na massa tumoral enxertada) e nada disso ocorreu quando as células foram incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG com CLIC1 silenciado (U87MG-siCLIC1).

O fenótipo de resistência tumoral e possíveis recidivas da doença, também tem sido relacionado ao conteúdo vesicular (SIMON *et al.*, 2020). Em um estudo clínico realizado em 2016, foram coletadas VEs em amostras de sangue de 16 pacientes com GB, logo após cirurgia e/ou durante o tratamento com TMZ, os resultados mostram uma associação entre a alta concentração de VEs séricas com uma recorrência precoce da doença e tempo de sobrevida menor dos pacientes (EVANS *et al.*, 2016). Mais recentemente, no estudo conduzido por Zeng *et al.*, (2018) foi demonstrado que a transferência de miR-151a via EVs aumentou a sensibilidade à TMZ de linhagens celulares de GB antes resistentes por meio da inibição do reparo de DNA.

Além disso, VEs têm sido consideradas como um dos principais moduladores da heterogeneidade do microambiente do GB, por meio da troca de carga oncogênica, as VEs ajudam a alterar o fenótipo de várias células dentro do microambiente (RICKLEFS *et al.*, 2016; PARKER *et al.*, 2015; BEHNAN *et al.*, 2019).

Vale lembrar que algumas subpopulações de células de GB (proneural ou mesenquimal) diferem em relação às características biológicas (FEDELE *et al.*, 2019) e tem sido demonstrado que VEs derivadas de cada um desses subtipos participam da comunicação e integração celular, influenciando nas propriedades das subpopulações de células-tronco de glioma e demais células presentes no microambiente tumoral. Como o fenótipo MES está associado a um pior prognóstico de pacientes com GB, por ser mais agressivo e relacionado ao menor tempo de sobrevida, VEs derivadas de células mesenquimais promovem um microambiente com características mais invasivas (CARRO *et al.*, 2010). A liberação de VEs com origem proneural ou mesenquimal é bastante discutida, assim como a influência delas na responsividade à terapia, pois tem sido demonstrado que além das VEs refletirem o perfil do subtipo celular de origem, influenciam no equilíbrio do microambiente tumoral a partir da transferência de drivers, transcritos e ácidos nucleicos de uma célula à outra, permitindo determinar a localização dos subtipos celulares no microambiente e direcionar o tratamento para obter efeitos biológicos de sucesso (VERHAAK *et al.*, 2010; revisado em NAKANO *et al.*, 2015).

Ainda, relacionado ao fenótipo de resistência tumoral e a modulação do microambiente mediado por VEs, foi demonstrado que células de glioma estimulam astrócitos normais à ativação em astrócitos reativos e estes, liberam exossomos contendo mRNA de MGMT. Assim, células de glioma que não expressam MGMT podem fazer o uptake de exossomos derivados de astrócitos reativos (contendo o transcrito correspondente à MGMT no conteúdo vesicular) e adquirir um fenótipo resistente à TMZ por meio da tradução do mRNA de MGMT exossomal (YU *et al.*, 2018).

De modo geral, VEs derivadas de GB influenciam e modulam a formação do microambiente tumoral a partir de uma série de processos, como angiogênese, aumento da proliferação celular, aumento da capacidade de clonogenicidade, transferência de fatores pró-migratórios e indução de malignidade em células normais (ARSCOTT *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; KAHLERT *et al.*, 2013; revisado por GOURLAY *et al.*, 2016).

De maior interesse para este trabalho, vale a pena destacar o estudo de Shi *et al* (2015), onde foi demonstrado que os níveis de miR-21 exossomal presente no líquido de pacientes com glioma foram significativamente mais elevados que no grupo controle (indivíduos normais, sem tumor), correlacionando negativamente com o

tempo de sobrevivência dos pacientes. Ainda, após a inibição da expressão de miR-21 na linhagem U251, de glioblastoma humano foi verificado que os níveis de genes alvo de miR-21 (como *RECK*, *PTEN* e *PDCD4*) foram positivamente regulados em nível proteico (SHI *et al.*, 2015).

O potencial de transferência de conteúdo vesicular associada à alteração de fenótipos também é bastante explorado como estratégia terapêutica. Visando tratamento de tumores cerebrais primários tem sido constante a busca pela utilização de VEs, uma vez que podem atravessar a barreira hematoencefálica e carregar pequenas moléculas biológicas e farmacológicas até as células tumorais (KATAKOWSKI *et al.*, 2016).

No trabalho de Monfared *et al* (2019) foi demonstrada a regulação negativa da expressão de miR-21 em modelo de GB (linhagem U87MG), via exossomos projetados com uma construção de esponja para esse miRNA. A construção de esponja tem como objetivo a ligação (captação) do miRNA de interesse para impedir a sua ligação com alvos biológicos na célula. Dessa forma, ao suprimir miR-21 nessas células, seus genes alvo (*RECK* e *PDCD4*) foram regulados positivamente, levando à redução na proliferação celular e aumento nas taxas de apoptose. Ainda foi observado em modelo de crescimento tumoral murino de GB, que a administração de exossomos com essa construção de esponja para miR-21 reduziu o volume tumoral, mostrando que a inibição de miR-21, ou modulação da expressão dos genes alvos de mir21, tem potencial terapêutico no combate ao glioblastoma.

Nesse sentido, a busca por possíveis alvos moleculares que sejam transferidos de uma célula a outra via VEs e que possam estar associados a modulação de fenótipos relacionados à tumorigênese, torna-se uma estratégia terapêutica interessante a ser explorado em modelo de glioblastoma.

## 1.6 O GENE *RECK* E SEU PAPEL NA TUMORIGÊNESE

O gene *RECK* (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) foi identificado em uma biblioteca de expressão de cDNAs de fibroblastos de origem humana, após uma busca por novos alvos capazes de reverter o fenótipo transformado da linhagem DT (células NIH-3T3 transformadas com o oncogene v-Ki-ras) (TAKAHASHI *et al.*, 1998). O gene *RECK* codifica para uma glicoproteína de mesmo nome, de aproximadamente 110kDa, rica em cisteína, que é expressa de



forma ubíqua na maioria dos tecidos normais. Possui três domínios do tipo inibidor de serina protease e dois domínios com homologia parcial ao fator de crescimento epidermal (EGF). A porção N-terminal de RECK possui quatro sítios onde ocorre glicosilação que se localizam próximos aos domínios ricos em cisteína (SIMIZU *et al.*, 2005). Esta proteína encontra-se ligada à membrana citoplasmática por uma modificação glicosilfosfatidilinositol (GPI) na extremidade carboxiterminal (TAKAHASHI *et al.*, 1998) e está presente também em regiões perinucleares da membrana (MORIOKA *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrado que pacientes com diferentes tipos de tumores, como hepatocarcinomas (FURUMOTO *et al.*, 2001), cânceres de pulmão (LONG *et al.*, 2008; PESTA *et al.*, 2009), cânceres de intestino (OSHIMA *et al.*, 2008), cânceres de próstata (OHL *et al.*, 2005), cânceres de estômago (SONG *et al.*, 2006) e osteosarcomas (KANG *et al.*, 2007), que apresentam níveis elevados de expressão de *RECK* possuem melhor prognóstico, comparados a pacientes com tumores contendo baixa expressão de *RECK* (revisado por NODA e TAKAHASHI, 2007). Vale lembrar que *RECK* tem sido descrito como alvo de miR-21 em diferentes modelos tumorais, como câncer de pulmão (XU *et al.*, 2014), hepatocarcinoma (ZHOU *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2010), câncer colorretal (BULLOCK *et al.*, 2013), osteosarcoma (ZIYAN *et al.*, 2011), adenocarcinoma pancreático (PARK *et al.*, 2009), e de maior interesse nesse trabalho, em modelo de gliomas (GABRIELY *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2012). Em um modelo xenográfico de glioma, a inibição de miR-21 promoveu diminuição do crescimento tumoral e inibição da capacidade invasiva, pelo menos em parte, mediada pelo aumento da expressão de *RECK* (HAN *et al.*, 2012).

O primeiro trabalho com foco no papel de *RECK* na biologia de glioblastomas mostra que a baixa expressão do gene *RECK* em células da linhagem T98G, de glioblastoma humano, é um fator crítico para o potencial invasor dessa linhagem (CORREA *et al.*, 2006).

De fato, sabe-se que as MMPs, um conjunto de proteases capazes de degradar os componentes da matriz extracelular e tecidos conectivos, estão mais expressas em diversos tipos de tumores (revisado por BASBAUM e WERB, 1996) e que provocam a desestabilização da membrana extracelular, permitindo que as células tumorais atravessem a membrana basal e atinjam outros tecidos, o que está

relacionado com a agressividade e progressão tumoral (KÖNNECKE, H.; BECHMANN, I., 2013).

Os inibidores clássicos e mais descritos para MMPs são as TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases), proteínas secretadas que formam complexos TIMP-MMP tornando as proteases inativas (GOMEZ *et al.*, 1997). As TIMPs pertencem à uma família (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), com pequenas diferenças na estrutura que direcionam cada uma delas a uma maior especificidade contra determinadas MMPs (DINAKARPANDIAN e NAGASE, 2000).

Já o *RECK*, atua como um inibidor não competitivo da atividade proteolítica de MMPs, a partir de interações físicas (TAKAHASHI *et al.*, 1998; MENG *et al.*, 2008). *RECK*, possui uma característica única dentre os inibidores de MMPs por ser uma proteína ancorada à membrana citoplasmática, capaz de inibir diferentes MMPs, como a MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998, OH *et al.*, 2001). *RECK* inibe a transcrição, secreção da pró-MMP-9 e a atividade catalítica da mesma (TAKAHASHI *et al.*, 1998; TAKAGI *et al.*, 2009), reduz os níveis de MMP-2 por inibição do processamento proteolítico da pró-MMP-2 e promove inibição da atividade catalítica da MT1-MMP (OH *et al.*, 2001; MIKI *et al.*, 2007).

Ainda, a análise de camundongos nocautes para *RECK*<sup>-/-</sup> mostram que estes morrem antes do nascimento, por volta da metade do 10º dia do período embrionário, e estas mortes foram associadas à deficiência na formação do tubo neural, sistema vascular imaturo e hemorragia abdominal grave, associado ao aumento da expressão de MMP-2. Porém, em animais com duplo nocaute (*RECK*<sup>-/-</sup> e *MMP-2*<sup>-/-</sup>), o fenótipo foi parcialmente revertido (aumentou o tempo de sobrevivência dos embriões, mas não evitou a morte), confirmando que MMP-2 é um dos alvos fisiológicos de *RECK* (OH *et al.*, 2001).

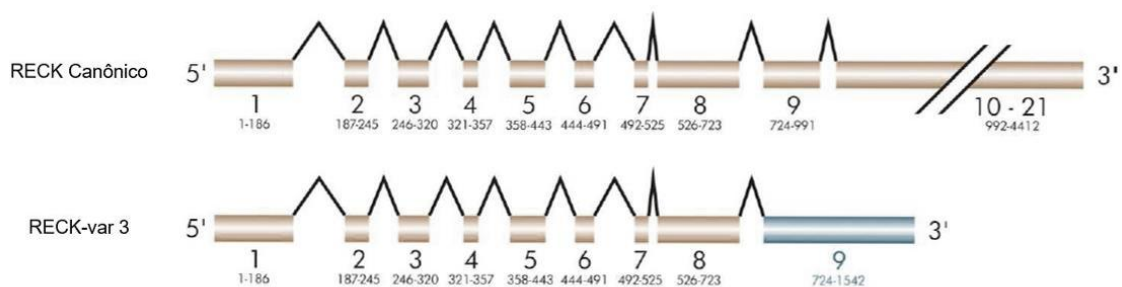
Em trabalhos do nosso grupo, foram analisados os níveis de mRNAs de *RECK*, TIMPs, MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP e a relação com a progressão tumoral. Foi observado *in vitro*, em diferentes linhagens de melanoma, incluindo dados de micro arranjos de pacientes com melanoma, além de dados relacionados à melanócitos normais, que a elevada expressão de *RECK* está associada à baixa expressão de genes marcadores de agressividade, como TIMP2 e MT1-MMP. Em conjunto, os dados evidenciam que a expressão desse grupo de genes (*RECK*, *TIMP-2* e *MT1-MMP* principalmente) contribuiu para a diferenciação entre melanócitos normais e células de melanoma, o que corrobora com a ideia de que

*RECK* apresenta um potencial para ser utilizado no diagnóstico da progressão de tumores (JACOMASSO *et al.*, 2014).

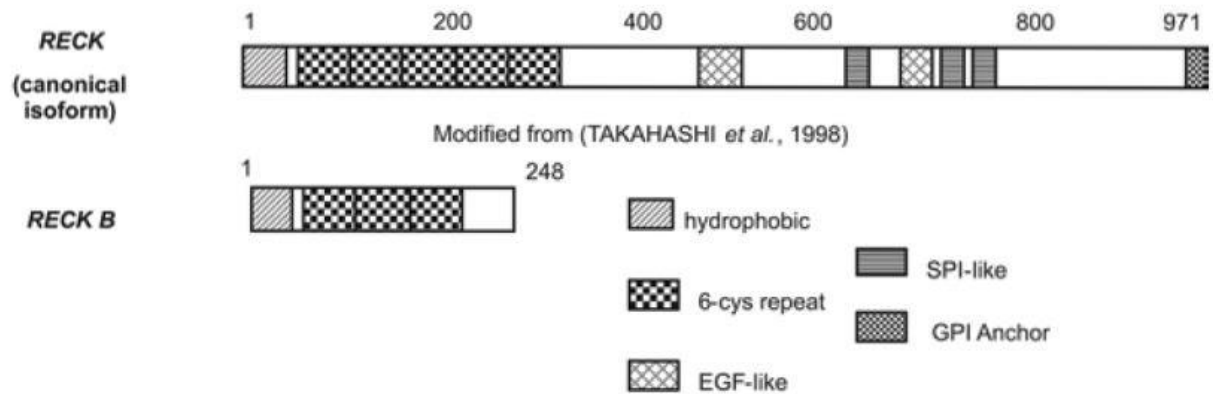
Vale ressaltar que dados da literatura na última década apontam que eventos de desregulação de *splicing* são cruciais na carcinogênese e muitos fatores de *splicing* parecem ser elementos chave durante a progressão tumoral (LUZ *et al.*, 2016). A partir do programa BLAT (BLAST-like Alignment Tool) foi possível identificar alguns transcritos alternativos de *RECK* que apresentam éxons diferenciais aos da forma canônica, como o *RECK-var 3*, *RECK-var 4* e *RECK-var 5* (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015; JACOMASSO *et al.*, 2019), sendo que a predição dos respectivos produtos proteicos sugere a tradução de proteínas alternativas com tamanhos também diferentes (caracterizadas em colaboração com o grupo da Dr.<sup>a</sup> Mari Cleide Sogayar, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). A análise da estrutura desses transcritos alternativos permitiu a predição de algumas características, como a deleção dos motivos *Kazal*, acompanhada ou não da perda da sequência de sinalização para o ancoramento GPI presente na forma de *RECK* canônica (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015). A Figura 6-A mostra a representação do transcrito *RECK-var 3*, que é um dos focos do presente trabalho, produzido por *splicing* alternativo do gene *RECK*, evidenciando os éxons 8 (compartilhado com todos os transcritos) e 9 (éxon variante). A Figura 6-B mostra a organização dos domínios preditos para o produto proteico codificado pelo transcrito alternativo *RECK-var 3* em comparação os domínios da proteína *RECK* canônica, e sugere que este transcrito alternativo possa dar origem a um produto com atividade diferente do produto codificado pelo transcrito canônico.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DE *RECK* E O VARIANTE DERIVADO DE SPLICING ALTERNATIVO *RECK-VAR 3*

A)



B)



FONTE: Adaptado de JACOMASSO, 2010; TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015.

NOTA: O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. Estes transcritos alternativos foram preditos a partir da análise de bancos de dados de seqüências de mRNA, através da ferramenta BLAT (BLAST-like Alignment Tool). A) Representação de mRNAs de splicing alternativo do gene *RECK* com foco nos éxons 8 e 9. O 8º éxon é compartilhado por todas as três variantes de *RECK*, mas o 9º éxon é único para cada variante, sendo gerado através de splicing alternativo. Em azul claro, a representação da diferença no 9º éxon da variante *RECK-var 3* para o *RECK* canônico. Éxons são representados por caixas e íntrons por linhas. B) As isoformas de alternativas de *RECK* apresentam algumas características semelhantes à proteína canônica, entre eles estão as repetições de seis cisteínas (Cys), os domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) e os domínios semelhantes a inibidores de serina proteases (SPI), sendo que um destes possui homologia completa com o motivo *Kazal*. Os números na porção superior correspondem à resíduos de aminoácidos onde os domínios começam e terminam.

Ainda, foi demonstrado que a maior expressão de *RECK* canônico em relação aos transcritos alternativos está associada a maior tempo de sobrevida dos pacientes com glioblastoma. Além disso, a superexpressão da isoforma *RECK-var 3* na linhagem U87MG de glioblastoma, promove o aumento do crescimento celular independente da ancoragem (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015). Em modelo de melanoma, nosso grupo mostrou que a razão entre os transcritos *RECK* e *RECK-var 3* é menor em linhagens derivadas de lesões metastáticas do que as derivadas de tumores primários e observou-se que alta expressão do transcrito alternativo *RECK-var 3*, em comparação com a forma canônica, está diretamente associada ao menor tempo de sobrevida de pacientes com melanoma. (JACOMASSO *et al.*, 2019), o que sugere que *RECK-var 3* tenha funções diferentes das do transcrito canônico na progressão maligna de tumores, e está relacionado a um fenótipo celular mais agressivo.

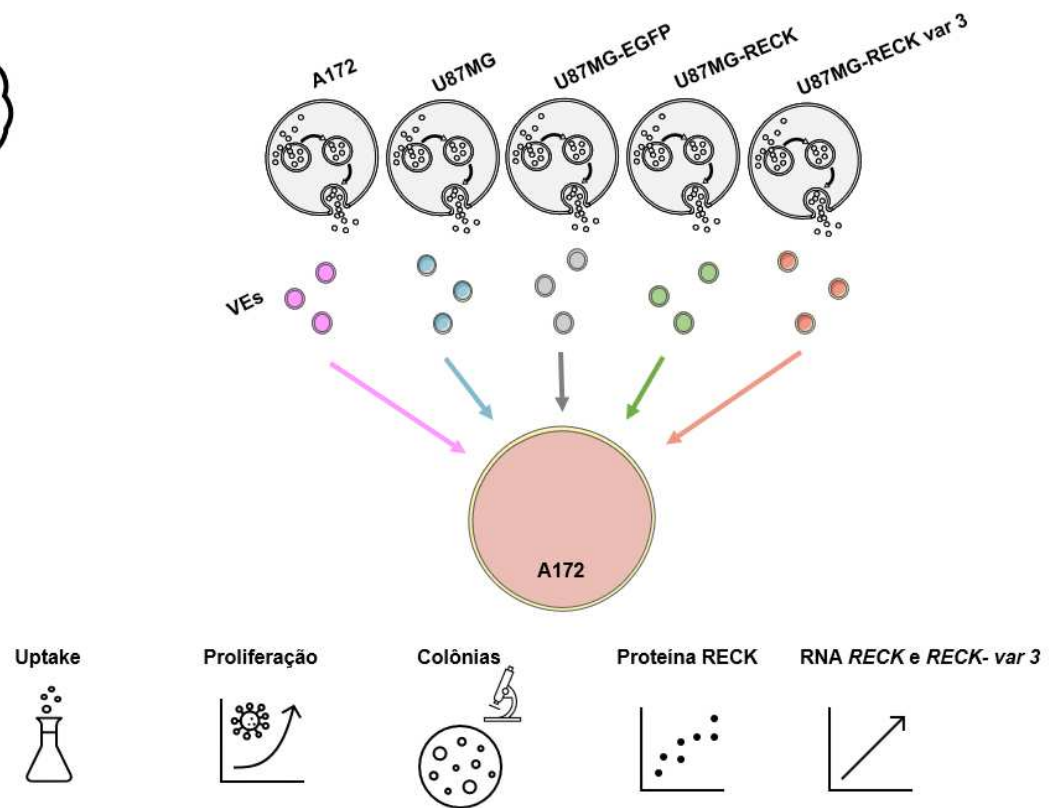
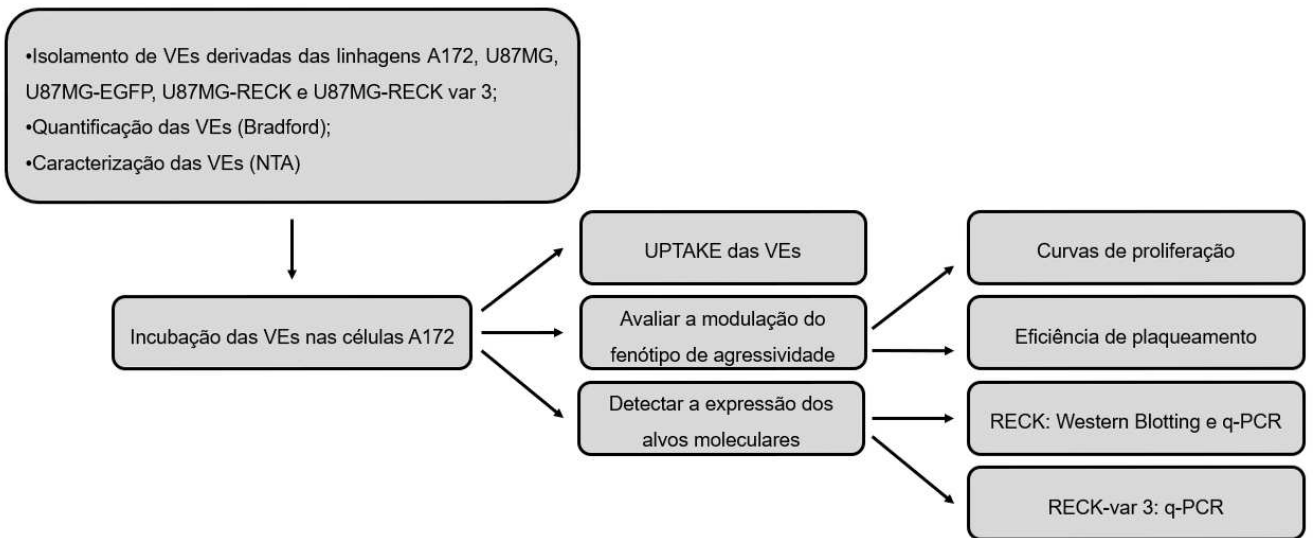
Em conjunto, os dados acima ressaltam a importância de ampliar a caracterização e o entendimento do papel de *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* em modelo tumoral. Especificamente nesse trabalho buscamos avaliar a

capacidade desses alvos em modular fenótipos de agressividade e resistência tumoral via secreção de VEs em linhagens de glioblastoma humano.

## 2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

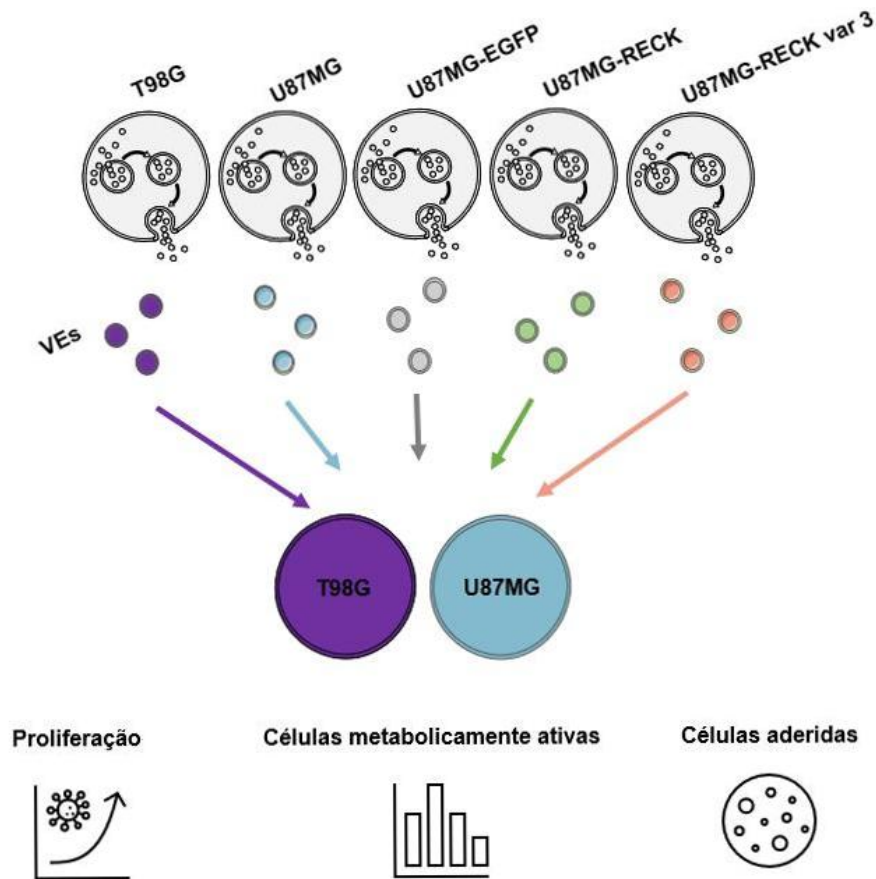
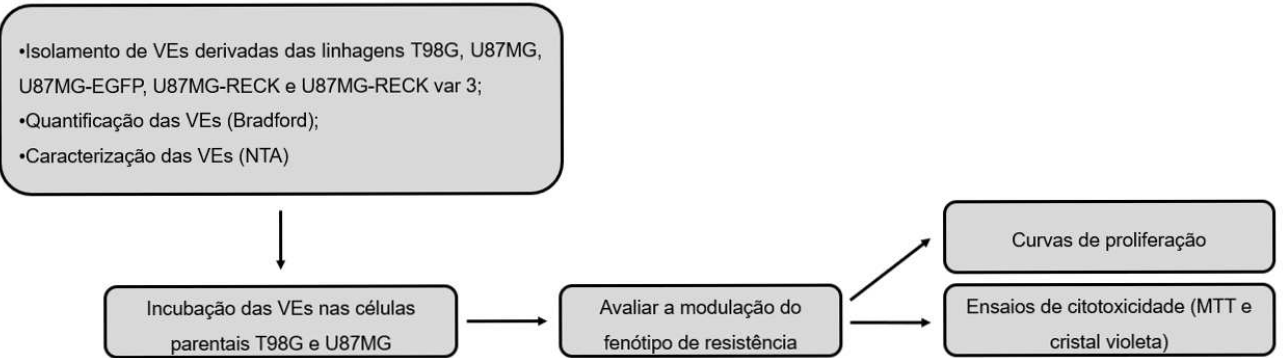
FIGURA 6 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL – MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE AGRESSIVIDADE

Modulação do fenótipo de **AGRESSIVIDADE**



FONTE: O Autor, 2020.

FIGURA 7 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL – MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

Modulação do fenótipo de **RESISTÊNCIA**

FONTE: O autor, 2020.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR

##### 3.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células

Os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo celular (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos e sob pressão de 1 atm. Materiais plásticos, como garrafas e placas de cultura foram esterilizados em micro-ondas seguindo protocolo estipulado no laboratório, à potência média por 45 minutos. Após a esterilização, o material foi seco em estufa a 50°C. O manejo das culturas de células foi realizado em condições de esterilidade, no interior de capela de fluxo laminar.

##### 3.1.2 Soluções

A solução salina fosfato tamponada (PBS) utilizada para lavagem das células em cultura foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes (NaCl 680 mmol/L, KCl 13,4 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5 mmol/L), e diluída para uso posterior com pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente.

Células aderentes foram soltas dos respectivos substratos utilizando-se solução de tripsina-EDTA (NaCl 137 mmol/L, KCl 54 mmol/L, glucose 5 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L e 50 mg/% de tripsina, pH 7,4). Esta solução é esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparato Sartorius, em câmara de fluxo laminar e armazenada a -20°C.

A solução estoque de temozolomida (TMZ), encontra-se na concentração de 0,1M diluída em DMSO e armazenada a -4°C. Para os experimentos com células foi utilizada a concentração final de 100 µM de temozolomida, também preparada em DMSO. Como controle foi utilizado: células na presença de DMSO (veículo da droga; volume proporcional à concentração de 0,1%).



### 3.1.3 Meios de cultura, linhagens celulares e condições de cultivo

O meio de cultura utilizado foi com DMEM alta glucose (Sigma-Aldrich), preparado e esterilizado por meio de filtração em membrana de 0,22µm. O meio DMEM-AG é suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 50 µg/mL do antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich).

Para o isolamento de vesículas extracelulares foi preparado meio de cultura DMEM-AG suplementado com 30% de SFB para que pudesse ser centrifugado em alta rotação e dessa forma depletar vesículas presentes no soro e no meio. O meio foi ultra centrifugado a 100.000 g por 5 horas e após, coletado apenas o sobrenadante livre de vesículas. Para confirmar que houve depleção de vesículas do meio, foram quantificados o “pellet” e o sobrenadante do meio (porção utilizada) pelo método de Bradford e, ambas as amostras foram avaliadas no Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Foi observada uma redução de 92% da concentração de partículas (VEs) no meio (amostra de sobrenadante). Após a confirmação de depleção, o meio foi diluído para uma concentração de 10% de SFB e usado no protocolo de isolamento das vesículas.

As linhagens celulares estudadas (A172, T98G, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), todas de glioblastoma humano grau IV.

Nos ensaios *in vitro*, as células desenvolvem-se como culturas aderentes e são cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis (Techno Plastic Products – TPP). As culturas foram mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. As subculturas foram realizadas de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprendê-las do substrato plástico.

## 3.2 PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Foram realizados dois protocolos adaptados para o isolamento de vesículas em linhagens celulares: um com as células cultivadas em aderência e outro, com as células cultivadas em suspensão. As linhagens de glioblastoma humano utilizadas foram: A172, T98G, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3. Após alguns testes, foi padronizado o primeiro protocolo, com células cultivadas em

aderência, devido ao fato de ser um modelo mais fiel ao cultivo dessas linhagens. Para isso, as células foram plaqueadas em placas P100, na concentração de  $1 \times 10^6$  células/placa (volume por placa: 5 mL) em meio de cultivo DMEM-AG 10% SFB. Após 24 horas da adesão celular, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM-AG 10% SFB depletado de vesículas do soro. Para obtenção do meio depletado de vesículas foi preparado meio DMEM-AG 30% de SFB e submetido à ultracentrifugação, 100.000 g, por 5 horas. Após esse período, a fração de cima do meio foi coletada e a de baixo (“pellet” contendo vesículas do soro) foi descartada. Na sequência, o meio foi diluído para 10% de SFB. As células foram incubadas com o meio depletado 10% de SFB por 48h em estufa de cultivo, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos às seguintes centrifugações diferenciais:

- 5 minutos a 2.500 g em centrífuga de eppendorf (para remover debris), descarta-se o pellet e utiliza-se o sobrenadante nas seguintes centrifugações;
- (2x) 30 minutos a 4.000 g, em 4°C, descarta-se o pellet e mantém-se o sobrenadante final refrigerado a 4°C até proceder a ultracentrifugação;
- Ultracentrifuga: Imac CP90β - HITACHI® por 90 minutos, a 100.000g, a 4°C.

Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e então realizada a ressuspensão do pellet em 40 - 60 µL de PBS 1X. Por fim, é realizada a quantificação de proteínas do pellet pelo método de Bradford. A concentração proteica de VEs no meio de cultivo foi bastante similar entre as linhagens, atingindo em torno de 0,022 µg/µL (ver Tabela 4). Essa concentração de VEs no meio de cultivo foi usada como condição padrão fisiológica e mantida nos experimentos posteriores.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Buscando avaliar qual o tipo de população majoritária de vesículas extracelulares que cada linhagem secreta (se seriam exossomos ou microvesículas) foi realizada a caracterização das amostras por Nanosight. Essa caracterização é

importante visto que vesículas extracelulares possuem origens diferentes na célula, o que pode refletir em um conteúdo vesicular também distinto. Após isolamento de vesículas pelo protocolo descrito no item 4.2, o ensaio de caracterização foi realizado com as seis linhagens de glioblastoma utilizadas nesse trabalho. Para isso, foi utilizado o equipamento de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), no Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz Paraná. O equipamento Nanosight permite a análise rápida e automatizada da distribuição de tamanho e concentração de partículas, com diâmetro entre 10 nm e 2 µm. Foi realizada a mesma diluição para todas as linhagens avaliadas (1:25) em PBS 1X filtrado, sendo o volume final de 1 mL injetado no equipamento em velocidade constante e pré-determinada.

### 3.4 UPTAKE DE VESÍCULAS

Após a caracterização do tipo de vesículas extracelulares secretadas pelas diferentes linhagens, foi realizado o ensaio de uptake, que permite a visualização da interação vesícula x célula de forma qualitativa. Com auxílio da microscopia confocal, foi possível observar se as vesículas eram capazes de entrar nas células de uma linhagem diferente e mostrou o local onde preferencialmente as vesículas se depositam. Nesse ensaio, células da linhagem A172 foram semeadas em placas P24, de 24 poços, com lamínulas de vidro depositadas no fundo dos poços (para posterior montagem das lâminas), na concentração de  $1,5 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante (DMEM-AG 10% de SFB) foi descartado as placas foram lavadas com PBS 1X e então as células foram marcadas com uma solução de DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões do DNA no núcleo das células. A placa foi incubada na presença do marcador por 15 minutos e após, o sobrenadante (com excesso de marcador) foi descartado. Em paralelo, os pellets de vesículas previamente isoladas das diferentes linhagens foram ressuspensos em PBS 1x contendo o marcador PKH26 (fluoróforo vermelho que se liga diretamente na membrana das vesículas). Incubou-se por 10 minutos e após, as vesículas foram ultra centrifugadas por 90 minutos,  $100.000 \text{ g}$  de 4 a  $10^\circ\text{C}$ . Descartou-se o sobrenadante com excesso de marcador e ressuspendeu-se o pellet no volume necessário para tratar as células. Tendo células e vesículas com seus respectivos fluoróforos, foi realizado o tratamento das células A172 com as vesículas isoladas das diferentes linhagens

(A172, T98G, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3) por 30 minutos. Para finalizar, os sobrenadantes foram descartados (contendo vesículas que não interagiram com as células), as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído 0,1% para a montagem das lâminas com glicerol. As lâminas ficaram armazenadas protegidas de luz até a leitura e captura das imagens por microscópio fluorescente confocal (A1R MP + Nikon®) em aumento de 60x.

### 3.5 CURVA DE PROLIFERAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE FENÓTIPO DE AGRESSIVIDADE

Considerando que a linhagem A172 apresenta capacidade proliferativa inferior às linhagens T98G e U87MG, decidiu-se avaliar se haveria modulação do fenótipo proliferativo dessas células após o contato/tratamento com vesículas extracelulares derivadas das células U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3. Para isso, as células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas P48, de 48 poços, e após 24 horas, os meios foram substituídos nas condições estipuladas de cada tratamento. Durante 6 dias as células foram contadas sendo que a cada 2 dias, na troca dos meios, as vesículas extracelulares foram repostas (com o objetivo de manter o efeito das vesículas sobre as células durante todo o período do experimento). Deve-se lembrar que a quantidade de vesículas utilizadas teve como base a quantificação de vesículas que cada linhagem de células liberou fisiologicamente durante a etapa de padronização e isolamento das VEs. Para a obtenção das vesículas o meio utilizado foi DMEM-AG 10% SFB depletado de vesículas (para descartar a possibilidade de quantificar vesículas derivadas do SFB).

### 3.6 EFICIÊNCIA DE PLAQUEAMENTO - ENSAIO CLONOGÊNICO

Para avaliarmos as características fenotípicas de cada uma das linhagens utilizadas, realizou-se o ensaio clonogênico, em que se observa a capacidade de formação de colônias de cada tipo celular. Para isso, as células foram plaqueadas em baixa densidade, em volume de 1 mL na concentração de  $1 \times 10^2$  células/poço em placas P6. Após o período de 24 horas para adesão das células ao poço, o meio foi trocado e substituído a cada 2 dias durante 10 dias e da mesma forma, as vesículas

usadas nas condições de tratamento também foram repostas. Como esse experimento tem como base o estabelecimento de baixa densidade celular, de forma a caracterizar a capacidade de formação de colônia, a concentração de vesículas no meio utilizada para esse ensaio foi 100X menor que a concentração padrão estabelecida anteriormente (atingindo 0,0002 $\mu$ g/ $\mu$ L). Para evidenciar a formação das colônias no fundo da placa, o procedimento foi seguido de uma coloração com cristal violeta, onde as colônias foram fixadas e coradas, possibilitando fotografar para a contagem das colônias.

### 3.7 MTT PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

Para determinar a modulação do fenótipo de resistência em linhagens de glioma tratadas com vesículas extracelulares a citotoxicidade celular foi avaliada pelo método de MTT (descrito anteriormente por REILLY et al., 1998). As células foram plaqueadas na concentração de  $8 \times 10^3$  células/poço em placas P96, de 96 poços, e incubadas durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para total adesão das células. Nesse ensaio, foram utilizadas apenas as linhagens T98G e U87MG. Após esse período, as células foram incubadas com diferentes condições (com ou sem vesículas, com ou sem Temozolomida) por 72 horas. Depois do período de incubação, o meio foi removido e as células foram incubadas com solução de MTT (500  $\mu$ g/mL em PBS 1X) por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de MTT foi removida e os cristais de formazan solubilizados em DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

### 3.8 CRISTAL VIOLETA PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

Para análise do fenótipo de resistência nas linhagens T98G e U87MG também foi utilizado o método de cristal violeta. Foram semeadas  $8 \times 10^3$  células/poço em placas P96, de 96 poços, deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para a adesão das células. Após este período, foi realizada a incubação nas mesmas condições do MTT durante 72 horas. Passado o tempo de tratamento, o sobrenadante com os tratamentos foi retirado, as células lavadas com

PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos. Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se aos poços a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,2% em etanol 2%) durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG et al., 1989). O cristal violeta foi retirado e foram realizadas em torno de dez lavagens com PBS 1X para a remoção do excesso de corante. Após as lavagens, foi realizada a eluição do conteúdo aderido às placas com uma solução de citrato de sódio (citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50%) durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.), a 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

### 3.9 CURVA DE PROLIFERAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

Como parte da segunda pergunta do trabalho, avaliou-se a possível modulação do fenótipo de resistência das linhagens T98G (mais resistente e não responsiva ao tratamento com TMZ) e U87MG (menos resistente, responsiva ao tratamento com TMZ) após o contato/tratamento com vesículas extracelulares derivadas das duas linhagens celulares e o tratamento com TMZ 100  $\mu$ M. As células foram plaqueadas em placas P48, de 48 poços, na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço e após 24 horas, os meios foram substituídos nas condições estipuladas. Durante 6 dias as células foram contadas sendo que a cada 2 dias, na troca dos meios, as vesículas extracelulares também foram repostas (com o objetivo de manter o efeito das vesículas sobre as células durante todo o período do experimento). A quantidade de vesículas utilizadas foi proporcional à quantificação de vesículas que as células liberam fisiologicamente, pelo cálculo realizado em relação ao número de células e quantidade de vesículas liberadas (nos experimentos de isolamento). Para a obtenção das vesículas o meio utilizado foi DMEM-AG 10% SFB depletado de vesículas (para descartar a possibilidade de quantificar vesículas derivadas do SFB).

### 3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

#### 3.10.1 Extração e quantificação de proteínas

As células foram plaqueadas em placas de 100mm (P100), na concentração de  $1 \times 10^6$  células/placa e incubadas por 24 horas em estufa, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para que fossem aderidas na placa. A seguir, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS resfriado. Em paralelo, foram isoladas vesículas extracelulares, das mesmas células usadas para extração de proteínas. Após a lavagem, adicionou-se tampão RIPA+ (10mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, 1Mm PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM β-glicerofosfato, 2,5mM Na<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) com PMSF às placas. O lisado foi transferido para tubo de 1,5mL e colocado imediatamente a 4°C e deixado por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos novos, mantendo sempre no gelo. A quantificação das proteínas totais foi realizada imediatamente após a extração pelo método de Bradford. Após, as amostras foram feitas alíquotas e armazenadas a - 80°C no ultra freezer.

#### 3.10.2 Imunodeteção de proteínas

Alíquotas de 100 µg de proteína foram utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE (com géis de concentração 8 a 12% de acordo com cada proteína a ser detectada), utilizando em média voltagem de 90V por 2 horas. Após, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF. Pode-se visualizar a transferência por meio de coloração da membrana com solução de Ponceau. A detecção das proteínas foi realizada a partir do anticorpo primário (Anti RECK). Para a revelação a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate – Thermo Scientific) durante 1 minuto, em temperatura ambiente. O excesso de substrato foi retirado, e a membrana posicionada na bandeja do equipamento Amersham Imager 600® para revelação e aparecimento das bandas. A quantificação foi realizada pelo método do software ImageJ 1.38e/Java 1.5 (desenvolvido por Wayne Rasband). O anticorpo primário utilizado para ensaio de Western Blotting foi: Anti RECK, 1:500

(Cell Signaling). Como anticorpo secundário foi utilizado: anticorpo poli clonal Anti-rabbit-IgG (Sigma Aldrich, HRP-linked Antibody). Estes anticorpos foram diluídos e armazenados de acordo com as instruções de cada fabricante.

### 3.11 qRT-PCR

Para extração de RNA foi utilizado o kit ilustra RNAspin Mini (GE-Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi realizada através da medida de absorbância em 260 e 280 nm (Nanodrop 1000 – Thermo Scientific), e o extrato foi armazenado à - 80 °C.

Posteriormente, foi realizada a síntese do cDNA a partir do RNA extraído, utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems). A reação foi realizada em termociclador por 10 minutos a 25 °C (temperatura de incubação); por 120 minutos a 37 °C (temperatura de síntese) e por 5 min a 85 °C (temperatura de inativação da enzima). O cDNA recém sintetizado foi armazenado a - 20 °C.

As reações de qRT-PCR foram realizadas em um termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) utilizando SYBER Green PCR Master Mix e primers específicos para os genes alvos conforme Tabela 1. A mistura de reação foi constituída por: 3 µL de cDNA 1:30; 3 µL de primer (combinação F (forward) e R (reverse)); e 6 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação ocorreu com 40 ciclos de amplificação. A expressão dos genes foi normalizada pelo gene de referência HPRT.

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS PROJETADOS COM PRIMERBLAST

GENE	SENTIDO F /R (Forward / Reverse)	SEQUÊNCIA
HPRT	F	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3'
	R	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'
RECK	F	5'-ATGCACTGTATAGACCTCCAGAAGTC-3'
	R	5'-CAGTCAATACTAAAGGATGTTCCATGA-3'
RECK-var 3	F	5'-TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA-3
	R	5'-CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC-3'

FONTE: O autor, 2020.



### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Para análises de múltiplas populações, foi utilizado o teste de variância ANOVA One-Way seguido pelo método Tukey t-test. Para a análise de duas populações foi utilizado o Teste-t de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

Como descrito anteriormente, glioblastomas são tumores com origem no SNC extremamente agressivos, com altas taxas de mortalidade e mau prognóstico. Apesar dos esforços na busca por estratégias terapêuticas de sucesso, há diversos mecanismos associados ao aumento da agressividade e da resistência tumoral aos tratamentos convencionais. Dentre esses mecanismos, destaca-se a liberação de VEs, capazes de mediar a comunicação celular no microambiente tumoral e assim modular fenótipos como agressividade e resistência.

Dessa forma, o foco do presente trabalho foi avaliar a modulação desses dois fenótipos a partir da internalização de VEs em uma linhagem receptora, explorando o potencial de *RECK* e *RECK-var 3* na capacidade de mediar essa modulação.

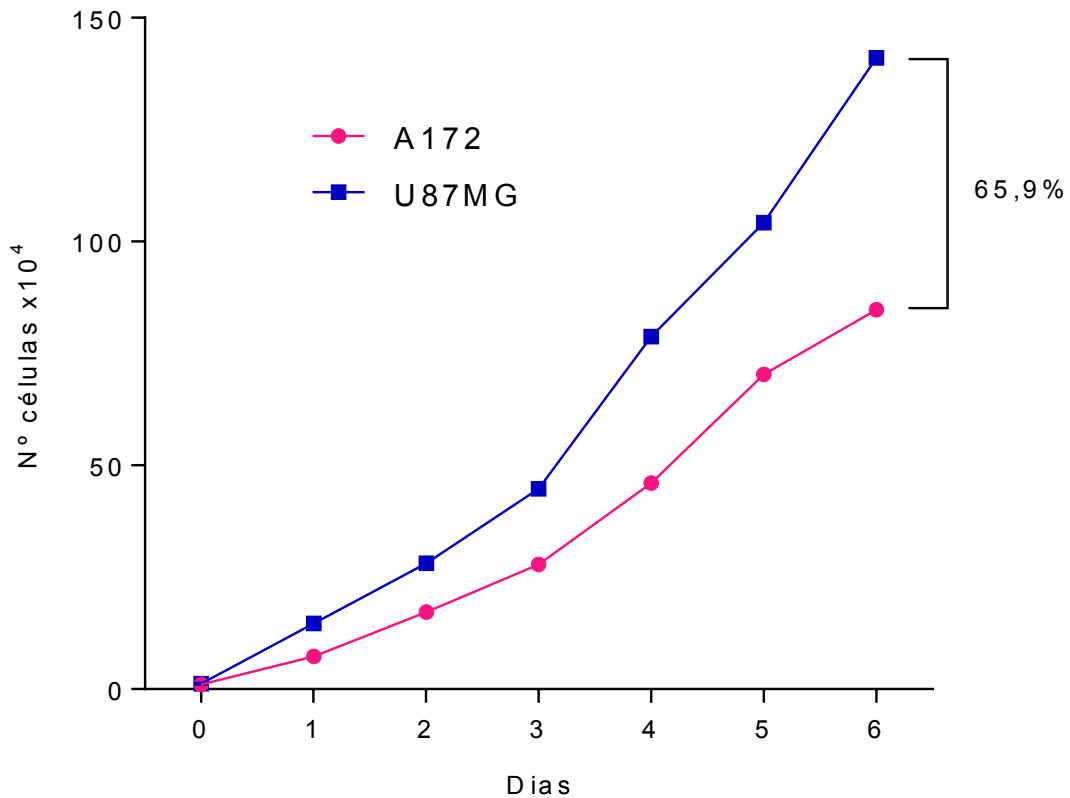
Usando como modelo linhagens de glioblastoma humano (grau IV), buscamos avaliar a capacidade de VEs derivadas das linhagens A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 em mediar o fenótipo de agressividade na linhagem A172 e, de forma complementar, avaliar a capacidade de VEs modularem a responsividade ao quimioterápico Temozolomida (TMZ), a partir de VEs derivadas das linhagens parentais U87MG e T98G, e das linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3.

### 5.1 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE AGRESSIVIDADE

Considerando que as linhagens de glioblastoma humano utilizadas no trabalho apresentam perfis de agressividade diferentes, optou-se por realizar inicialmente uma curva de proliferação celular para demonstrar a diferença na capacidade proliferativa entre as linhagens parentais escolhidas A172 e U87MG.

Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 8. Pode-se observar que a linhagem U87MG apresenta uma alta capacidade proliferativa em comparação à linhagem A172, onde é possível observar uma diferença de 65,9% no número de células entre as linhagens após o sexto dia em cultivo.

FIGURA 8 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGENS PARENTAIS A172 E U87MG



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Células de glioblastoma humano ( $1 \times 10^4$  células) foram cultivadas em meio DMEM -AG 10% SFB e mantidas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

A partir do perfil de crescimento obtido, foi possível calcular o tempo de dobramento de ambas as linhagens e visualizar a diferença na densidade celular (número de células/cm<sup>2</sup>) atingida no sexto dia (abaixo, na Tabela 2).

TABELA 2 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172 E U87MG

Linhagem	Tempo de dobramento (horas)	Densidade média no 6º dia (x10 <sup>4</sup> cél/cm <sup>2</sup> )
A172	26,5	101,2
U87MG	24	167,9

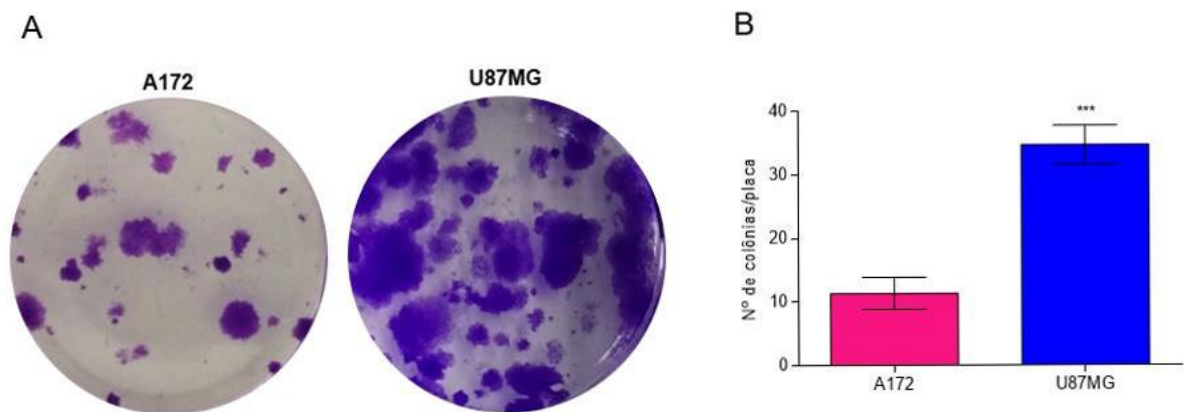
FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A partir da curva de crescimento demonstrada na Figura 8, foi determinado o tempo de dobramento para ambas as linhagens, entre os dias 3 e 5 do experimento. Para a contagem das

células, foram usadas placas de 48 poços, com área de crescimento celular de 0,84 cm<sup>2</sup>, logo a densidade celular no 6º dia foi calculada de acordo com essa área de crescimento.

Sabendo que a linhagem A172 apresenta um maior tempo de dobramento e uma menor densidade celular em comparação à linhagem U87MG, avaliou-se na sequência a capacidade de formação de colônias entre as duas linhagens a partir do ensaio de eficiência de plaqueamento em substrato sólido. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 9.

FIGURA 9 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS LINHAGENS A172 E U87MG EM SUBSTRATO SÓLIDO



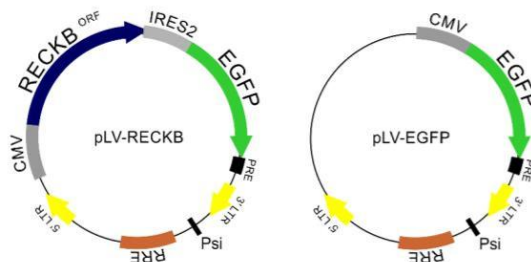
FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Células A172 e T98G foram cultivadas em baixa densidade ( $1 \times 10^2$  cél/cm<sup>2</sup>) em meio DMEM-AG com 10% de SFB, por 10 dias. A) Imagens representativas das colônias formadas em substrato sólido a partir das células A172 e U87MG, no 10º dia de cultivo. A imagem é representativa de três ensaios independentes realizados em triplicata. B) Gráfico representativo da contagem das colônias formadas após coloração com cristal violeta. O gráfico apresenta média +/- desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística obtida é referente a comparação com a capacidade de formar colônias entre as linhagens A172 e U87MG (\*\*\*)  $p < 0,05$ ).

Observou-se que células A172 apresentaram uma menor capacidade de formar colônias em comparação com a linhagem U87MG nessas condições experimentais. Em paralelo, o mesmo ensaio foi realizado com as duas linhagens em condição de meio sem soro, porém, o carenciamento total impediu o crescimento das células e não houve a formação de colônias em nenhuma das linhagens.

Em conjunto, os resultados obtidos a partir da curva de proliferação e da eficiência de plaqueamento em substrato sólido, mostram que a linhagem A172 apresenta uma capacidade proliferativa inferior à linhagem U87MG. Dessa forma, considerando a linhagem A172 como nosso modelo de estudo, decidiu-se avaliar a possível modulação do fenótipo de agressividade das células A172 após interação com vesículas extracelulares derivadas das células parentais mais agressivas e com maior capacidade proliferativa (U87MG). Ainda, sabendo que a linhagem A172 é capaz de expressar mais *RECK* canônico (amplamente descrito como um marcador de bom prognóstico para diferentes tipos de tumores) que a linhagem U87MG, decidimos avaliar se o gene *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* (papel oposto ao *RECK* canônico) poderiam ter um papel importante na modulação do fenótipo de agressividade dessas linhagens mediado por VEs. Assim, células U87MG superexpressando nossos alvos de interesse: U87MG-EGFP (célula controle), U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 também foram utilizadas nos experimentos a seguir, sendo caracterizada a liberação de VEs de cada uma das linhagens e seu papel na modulação do fenótipo de agressividade da linhagem A172. A superexpressão do quadro aberto de leitura (open Reading frame – ORF) do transcrito alternativo *RECK-var 3* foi obtida clonando a sequência amplificada desta ORF em um vetor lentiviral de superexpressão p156RRL-sinPPT-CMVIns3-IRES2-EGFP-PRE, gerando o plasmídeo chamado de pLV-RECKB. Como controle foi gerado um vetor sem nenhuma inserção no sítio de restrição. Este plasmídeo controle foi chamado de pLV-EGFP. Os plasmídeos utilizados são representados esquematicamente na Figura 10. A preparação dos vetores e todo o procedimento de produção de partículas lentivirais e infecção das células foi realizado em colaboração com o grupo da Profa. Mari C. Sogayar, da Universidade de São Paulo.

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES UTILIZADOS PARA GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE RECK E RECK-VAR 3



FONTE: Jacomasso, 2014.

NOTA: Esquemas dos plasmídeos utilizados no silenciamento dos transcritos do gene RECK ou na superexpressão do quadro aberto de leitura do transcrito alternativo RECK-var 3. RRE, Rev Responsive Element; LTR, Long Terminal Repeats; CMV, promotor de citomegalovirus; PGK, promotor da fosfoglicerato quinase; PuroR, gene de resistência a puromicina. EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein; IRES2, internal ribosome entry site; PRE, posttranscriptional regulatory element.

#### 4.1.1 Isolamento e caracterização de vesículas extracelulares

Inicialmente foi realizada a padronização do isolamento de vesículas extracelulares das diferentes linhagens de glioblastoma humano utilizadas nesta etapa do trabalho: A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3. A caracterização dessas vesículas foi realizada considerando o tamanho e concentração de VEs que cada uma das linhagens é capaz de liberar a partir da padronização para o isolamento e quantificação de VEs com centrifugações diferenciais, seguidas da ressuspensão dos pellets de vesículas e posterior quantificação proteica.

Após o isolamento das vesículas extracelulares, foi possível analisar a média da quantificação proteica dos extratos vesiculares de cada uma das linhagens utilizadas até o presente momento e determinar a quantidade de proteína de VE secretada pelas diferentes células durante o período de 48h. O resultado está demonstrado na Tabela 3 a seguir e observa-se que a quantificação proteica das vesículas secretadas foi similar entre as diferentes linhagens.

TABELA 3 –QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS EXTRATOS DE VESÍCULAS OBTIDOS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3

<b>Linhagem</b>	<b>Quantificação proteica µg/µL</b>	<b>Quantidade total de proteína de VEs (µg)</b>
A172	2,28	91,2
U87MG	2,73	109,2
U87MG-EGFP	2,63	105,2
U87MG-RECK	2,34	93,6
U87MG-RECK var 3	2,71	108,4

FONTE: O autor, 2020.

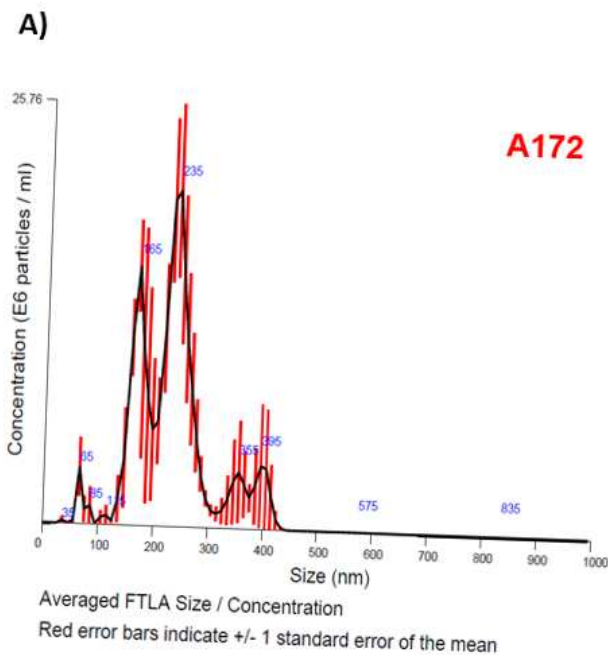
NOTA: A partir do método de Bradford foi possível quantificar a nível proteico os extratos de VEs obtidos de cada uma das linhagens utilizadas até o momento: A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3. Para isso, partindo do plaqueamento de  $1 \times 10^6$  células/placa

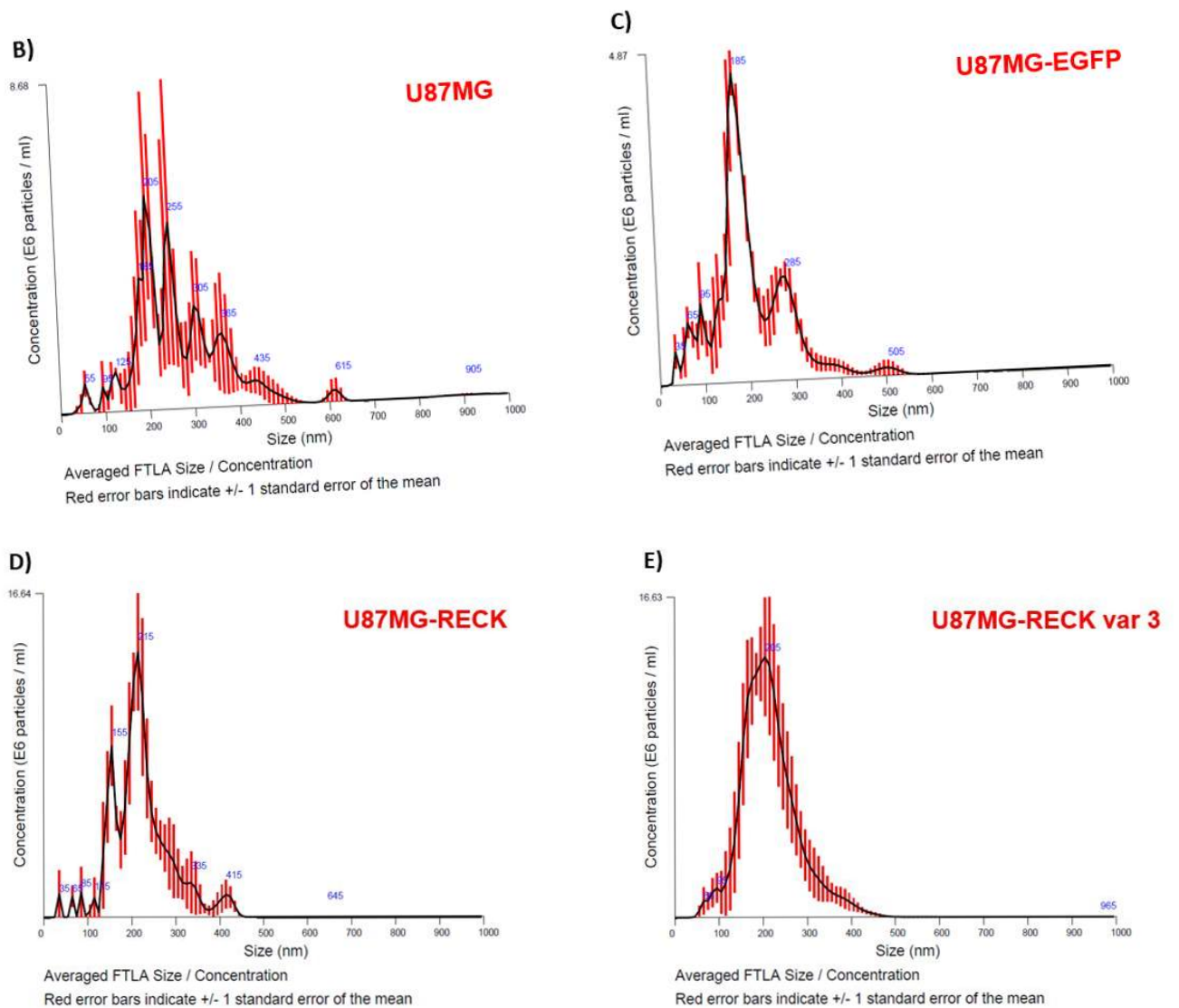
durante 48 horas para liberação de VEs no meio de cultura, após centrifugações diferenciais do sobrenadante, o pellet de VEs foi suspenso em cerca de 40  $\mu\text{L}$  de PBS 1X e a quantificação das proteínas foi determinada em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os resultados demonstrados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Para a caracterização da população de vesículas liberadas por cada uma das linhagens foi utilizado o equipamento de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), no Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz Paraná, onde foi possível detectar a concentração e tamanho das partículas em cada uma das amostras. O resultado está representado na Figura 11.

Observa-se que o tamanho médio das partículas obtidas, para todas as linhagens de glioblastoma, variou entre 200 – 240 nm, o que é característico de uma população majoritária de microvesículas liberadas por essas células, sendo: 231 nm as vesículas da A172, 246 nm as vesículas da U87MG, 201 nm as vesículas da U87MG-EGFP, 241 nm as vesículas da U87MG-RECK e 227 nm as vesículas da U87MG-RECK var 3.

FIGURA 11 - GRÁFICOS REPRESENTATIVOS DA CARACTERIZAÇÃO POR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA) DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DAS DIFERENTES LINHAGENS





FONTE: O autor, 2020.

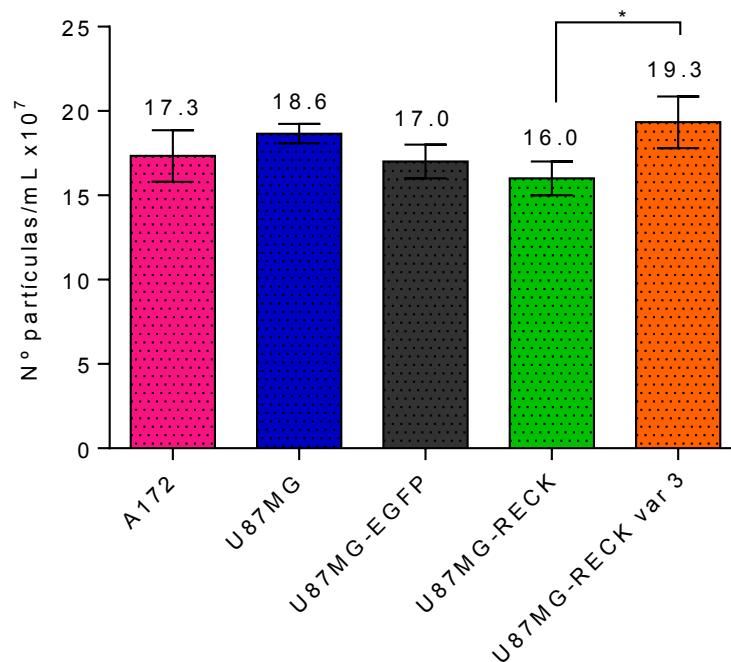
NOTA: Gráficos representativos da caracterização por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) das vesículas extracelulares. A barra vermelha representa a média da captura dos picos de três leituras realizadas no período de 3 minutos no equipamento NTA. A) A172 (tamanho médio: 231 nm); B) U87MG (tamanho médio: 246 nm); C) U87MG-EGFP (tamanho médio: 201 nm); D) U87MG-RECK (tamanho médio: 241 nm) e E) U87MG-RECK var 3 (tamanho médio: 227 nm). Os dados representam três experimentos independentes, realizados em duplicata.

Embora a maioria da população de vesículas em todas as linhagens seja muito similar, composta por microvesículas, vale destacar que o gráfico representativo das vesículas derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3 parece ser mais homogêneo que os demais, onde é possível observar a formação de um único pico contendo a população de microvesículas (Figura 11 E).



Além da determinação do tamanho médio das vesículas, a análise por NTA fornece o valor da concentração de partículas em cada amostra analisada. A Figura 12 mostra a comparação da concentração de partículas secretadas pelas diferentes linhagens.

FIGURA 12 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DA CONCENTRAÇÃO DE PARTÍCULAS OBTIDAS DE CADA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA (A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3) AVALIADAS POR NTA



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Gráfico representativo da caracterização por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) das vesículas extracelulares. A quantificação é realizada a partir da captura das amostras em fluxo contínuo, durante 3 minutos. Os valores obtidos são referentes à três experimentos independentes, realizados em duplicata da concentração de partículas obtidas de cada linhagem a partir do ensaio no NTA. As significâncias estatísticas obtidas são referentes às linhagens U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 de  $*p < 0,05$ .

Quando se compara a concentração de partículas das diferentes linhagens com as partículas derivadas das células A172, não temos nenhuma diferença. As médias de concentração obtidas foram: 17,3 na A172, 18,6 na U87MG, 17 na U87MG-EGFP, 16 na U87MG-RECK e 19,3 na U87MG-RECK var 3 ( $\times 10^7$  partículas/mL). A única diferença estatística encontrada foi na comparação entre a concentração de vesículas derivadas das linhagens U87MG-RECK e U87MG-RECK

var 3, sendo que as células com superexpressão do transcrito variante de *RECK* (*RECK-var3*) são capazes de secretar em torno de 12% mais vesículas em comparação com a linhagem que superexpressa a forma canônica de *RECK*.

Com base nos cálculos mencionados anteriormente, foi determinada a quantidade de vesículas a serem utilizadas em cada experimento posterior, a partir da determinação da concentração de VEs secretadas no meio em 48 horas de cultivo, ou seja, determinamos o quanto de vesículas foram liberadas fisiologicamente por essas células em um determinado período. Na Tabela 4 podemos comparar a quantidade total de proteína obtida das VEs secretadas, assim como a determinação da quantidade de proteína/partícula obtida de cada linhagem. Percebe-se que a quantidade de proteína/partícula é bastante similar entre as diferentes linhagens. Vale ressaltar que para a obtenção das vesículas o meio utilizado foi DMEM-AG 10% soro fetal bovino (SFB) depletado de vesículas (para descartar a possibilidade de quantificar vesículas derivadas do SFB). Para isso, o meio DMEM-AG foi preparado em concentração de 30% de SFB, ultracentrifugado e então diluído para uma concentração de 10% de SFB.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DE VESÍCULAS OBTIDAS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3

Linhagem	Quantidade total de proteína de VEs (µg)	Nº partículas (x 10 <sup>7</sup> )	Relação (µg proteína/10 <sup>7</sup> partículas)
A172	91,2	17,3x10 <sup>7</sup>	5,3
U87MG	109,2	18,6x10 <sup>7</sup>	5,9
U87MG-EGFP	105,2	17x10 <sup>7</sup>	6,2
U87MG-RECK	93,6	16x10 <sup>7</sup>	5,8
U87MG-RECK var 3	108,4	19,3x10 <sup>7</sup>	5,6

FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Análise comparativa entre as diferentes linhagens em relação à quantidade de células cultivadas por 48 horas para liberação de VEs no meio, com a concentração proteica obtida (método de Bradford) e a relação com o número de partículas (NTA) em cada amostra. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 4.1.2 Determinação do uptake de vesículas extracelulares

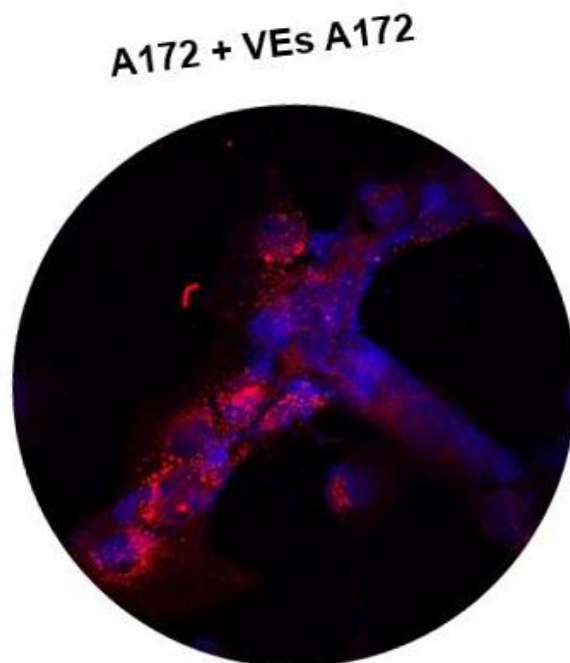
Após as definições de isolamento e caracterização das vesículas derivadas das diferentes linhagens de glioblastoma, tornou-se necessário avaliar os efeitos fenotípicos promovidos pela interação entre a linhagem de células receptoras com

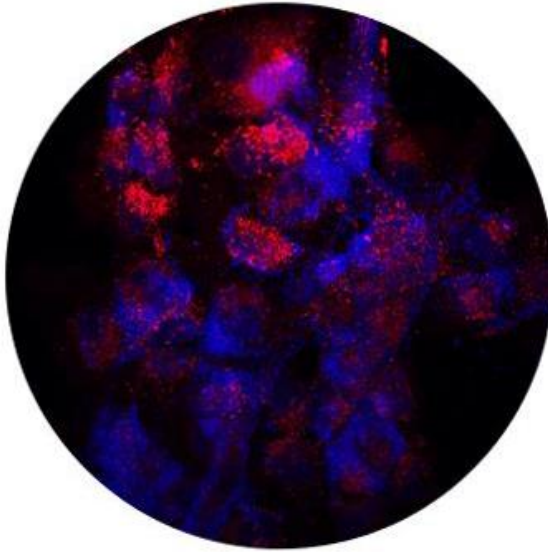
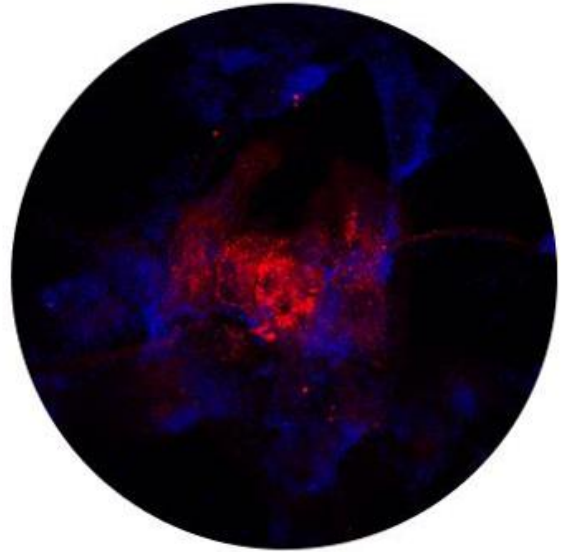
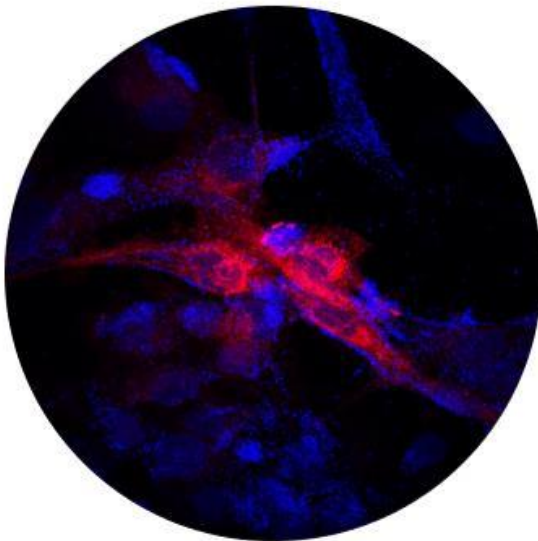
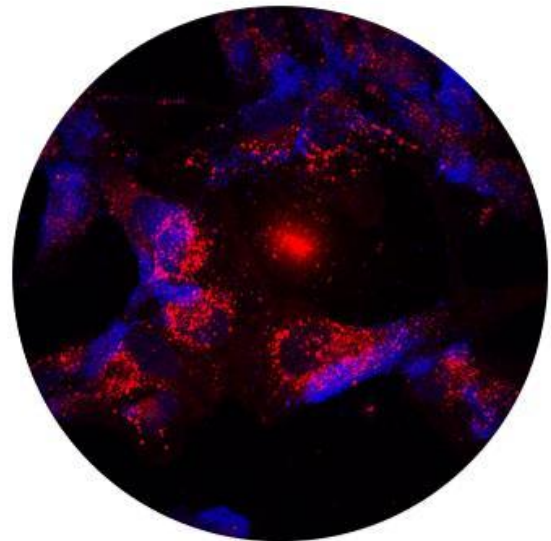
vesículas isoladas de linhagens distintas. Dentre as linhagens utilizadas neste trabalho, as células A172 foram consideradas as menos agressivas (embora também sejam de grau IV), pois seu tempo de dobramento (Figura 8, Tabela 2) e sua capacidade de crescimento em substrato sólido (Figura 9) são inferiores à linhagem U87MG. Para avaliar a capacidade de interação das diferentes VEs nas células, foi realizado o ensaio de uptake (captação) de vesículas extracelulares utilizando a linhagem A172 como receptora. As VEs foram derivadas das diferentes linhagens: A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3.

O objetivo principal desse ensaio foi observar se a interação das células A172 com as vesículas derivadas delas mesmas seria igual ou não à interação dessas células com as vesículas originadas das demais linhagens (U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3). Os resultados estão representados na Figura 13.

Observa-se que a internalização das VEs derivadas das diferentes linhagens celulares na linhagem A172 foi bastante similar em todas as condições testadas, independente da linhagem que deu origem às vesículas.

FIGURA 13 - UPTAKE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM CÉLULAS DA LINHAGEM A172



**A172 + VEs U87MG****A172 + VEs U87MG-EGFP****A172 + VEs U87MG-RECK****A172 + VEs U87MG-RECK var 3**

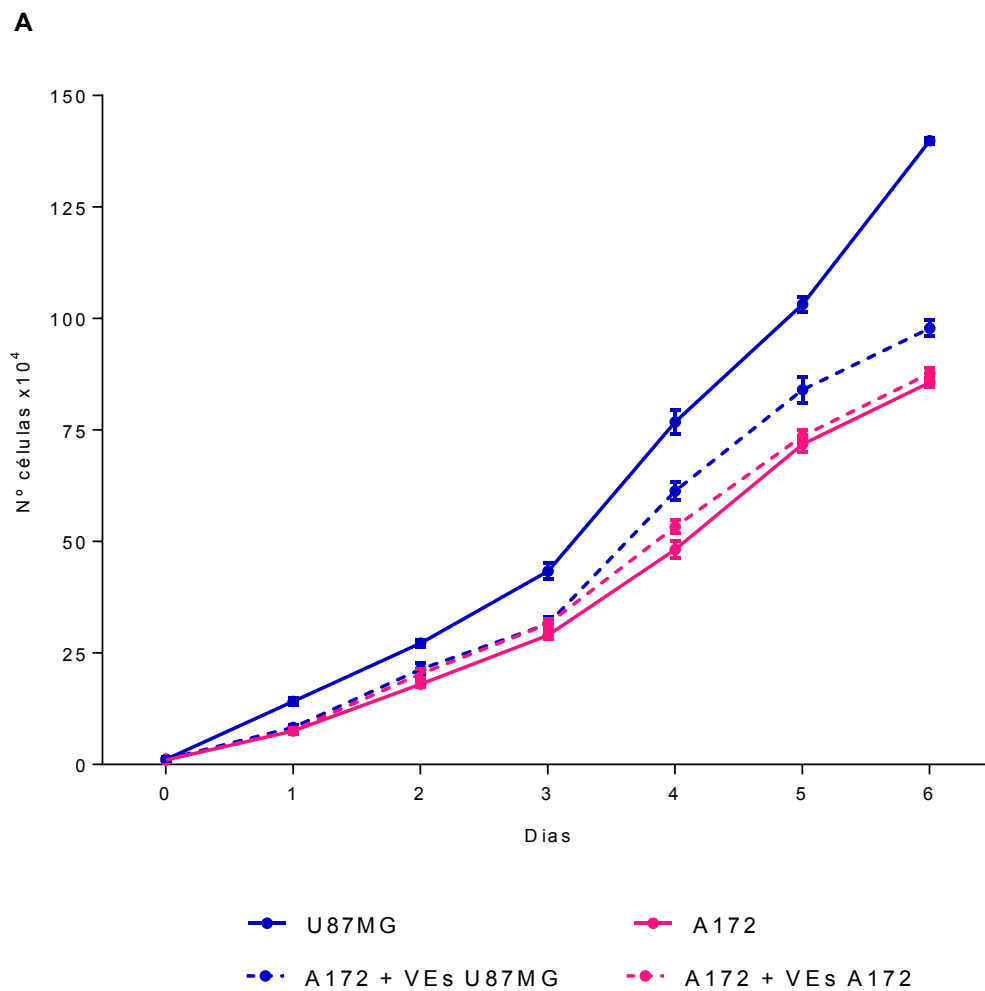
FONTE: O autor 2020.

NOTA: Imagens representativas da marcação fluorescente de células receptoras A172 (núcleo marcado com DAPI) incubadas previamente com VEs derivadas das linhagens A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 (marcadas com PKH26), durante 30 minutos. As imagens foram obtidas por microscopia confocal, com aumento de 60x a partir do merge das duas marcações. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

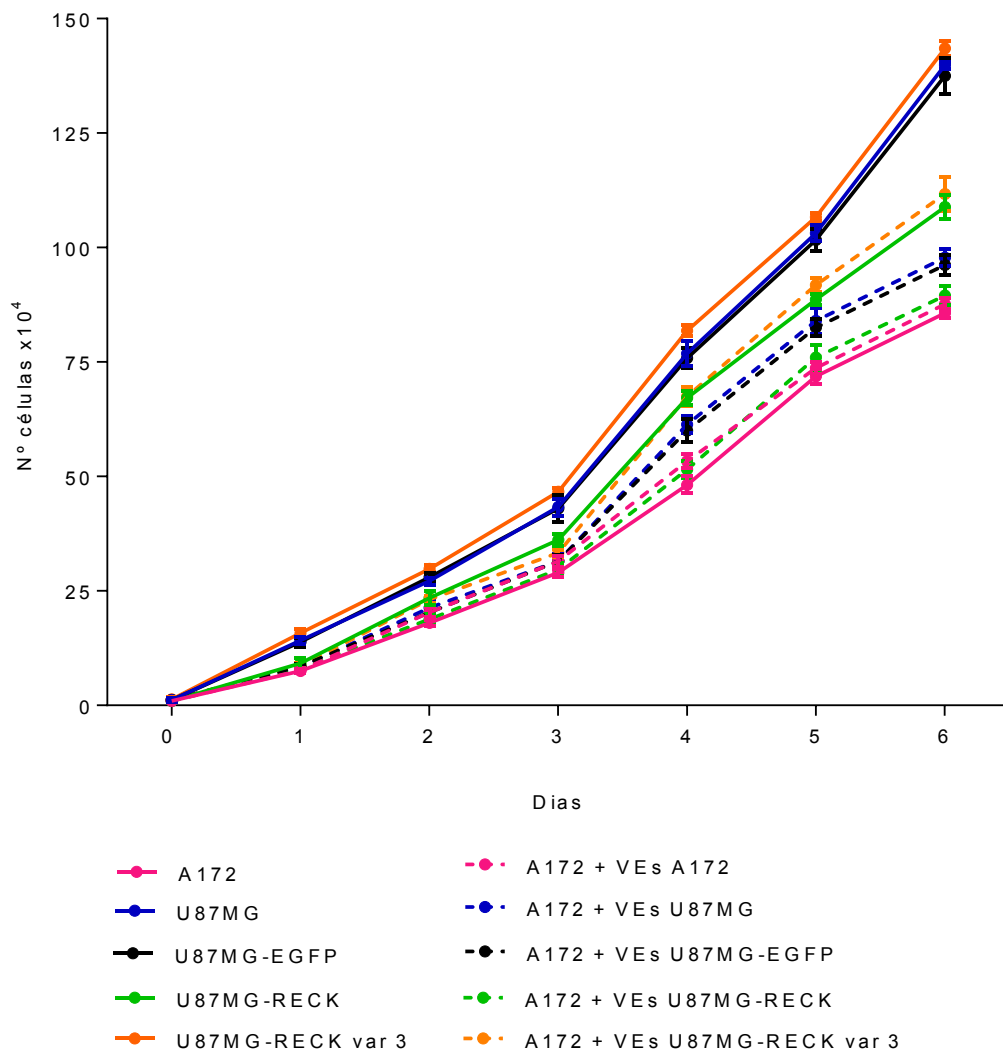
#### 4.1.3 Avaliação da modulação do perfil de proliferação via VEs

Para avaliar a modulação do perfil de agressividade da linhagem A172 mediado por VEs originadas das diferentes linhagens celulares, iniciamos a avaliação a partir de uma curva de proliferação com as linhagens parentais (A172 e U87MG) e, vesículas derivadas de cada uma das linhagens indicadas foram incubadas com as células receptoras A172, para compararmos a possível modulação do perfil proliferativo dessa linhagem escolhida como modelo. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 14-A.

FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM A172 NA PRESENÇA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE DIFERENTES LINHAGENS



B



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A) Células parentais de glioblastoma humano A172 e U87MG na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMEM-AG 10% SFB. A linhagem A172 também foi incubada com vesículas derivadas dela mesma ou com vesículas derivadas da linhagem U87MG. As células foram mantidas nessas condições por 6 dias, com renovação de meio ou meio/vesículas a cada dois dias. B) Células A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMEM-AG 10% SFB e a linhagem A172 também foi incubada com vesículas derivadas dela mesma ou vesículas derivadas das demais linhagens. As células foram mantidas nessas condições por 6 dias, com renovação de meio ou meio/vesículas a cada dois dias. No dia indicado, as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Na Figura 14-A observa-se que as células A172 quando cultivadas na presença das vesículas extracelulares obtidas da linhagem U87MG apresentaram maior proliferação em comparação às células A172 cultivadas somente em meio DMEM-10% SFB ou com vesículas derivadas da própria A172.

Como mostra a Tabela 5, o tempo de dobramento da linhagem A172 é maior e a densidade celular é mais baixa em comparação à linhagem U87MG. Observou-se que após incubação das células A172 com vesículas derivadas da linhagem U87MG, o tempo de dobramento da célula A172 receptora diminuiu em torno de 1 hora, enquanto a densidade celular calculada no 6º dia do experimento passou de 102,4 para 116,6, evidenciando um aumento de 13,8% em comparação à condição de células A172 com vesículas derivadas da própria A172.

TABELA 5 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172 E U87MG E A172 COM AS RESPECTIVAS VESÍCULAS

Linhagem	Tempo de dobramento (horas)	Densidade média no 6º dia ( $\times 10^4$ cél/cm <sup>2</sup> )
A172	26	102,4
U87MG	24	166,6
A172 + VEs A172	26	103,2
A172 + VEs U87MG	25	116,6

FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A partir da curva de crescimento demonstrada na figura 14-A, foi determinado o tempo de dobramento para ambas as linhagens, entre os dias 3 e 5 do experimento, e da linhagem A172 incubada com ambas as vesículas. Para a contagem das células, foram usadas placas de 48 poços, com área de crescimento celular de 0,84 cm<sup>2</sup>, logo a densidade celular no 6º dia foi calculada de acordo com essa área de crescimento.

Na sequência, as linhagens previamente estabelecidas com superexpressão de *RECK* e *RECK-var3* (U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3), assim como a linhagem controle contendo o vetor de expressão vazio (U87MG-EGFP) foram utilizadas. Do mesmo modo, vesículas derivadas de cada uma das linhagens indicadas foram incubadas com as células receptoras A172, para compararmos a possível modulação do perfil proliferativo dessa linhagem escolhida como modelo. Vale ressaltar que buscamos avaliar o papel de vesículas derivadas de células superexpressando os alvos de interesse *RECK* e *RECK-var 3*, com o intuito de avaliar se a modulação do fenótipo de agressividade mediada por *RECK* e *RECK-*

*var-3* pode estar sendo promovido via vesículas extracelulares. Os resultados obtidos estão representados na Figura 14-B. Inicialmente, observa-se que o perfil de proliferação das linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK var 3 é muito similar. Por outro lado, células U87MG-RECK apresentam um perfil de crescimento inferior as linhagens descritas anteriormente, mas maior em comparação ao perfil de crescimento da linhagem A172.

A Tabela 6 traz os resultados calculados para o tempo de dobramento e densidade celular das condições observadas na Figura 14-B.

Quando as células A172 foram incubadas com vesículas derivadas das linhagens U87MG e U87MG-EGFP demonstrou-se um aumento em torno de 11% no número de células após o sexto dia em cultura, comparando com a incubação de vesículas derivadas da própria A172 (onde não há diferença significativa em comparação à proliferação da A172 sem VEs). Células A172 incubadas com vesículas derivadas da linhagem U87MG-RECK apresentaram perfil de proliferação similar à proliferação das células A172 com vesículas derivadas dela mesma. Contudo, quando as células A172 foram incubadas com vesículas derivadas de U87MG-RECK var 3 esse aumento no perfil de proliferação foi ainda mais significativo, atingindo um aumento de 28% em comparação à incubação com vesículas derivadas da própria A172 e 15% de aumento em comparação à incubação com vesículas derivadas da U87MG e U87MG-EGFP.

TABELA 6 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E A172 COM AS RESPECTIVAS VESÍCULAS

<b>Linhagem</b>	<b>Tempo de dobramento (horas)</b>	<b>Densidade média no 6º dia (x10<sup>4</sup> cél/cm<sup>2</sup>)</b>
A172	26	102,4
U87MG	24	166,6
U87MG-EGFP	24	164,3
U87MG-RECK	26	129,8
U87MG-RECK var 3	23	171,4
A172 + VEs A172	26	103,9
A172 + VEs U87MG	25	116,6
A172 + VEs U87MG-EGFP	25	114,3
A172 + VEs U87MG-RECK	26	106,5
A172 + VEs U87MG-RECK var 3	24,5	133,3

FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A partir da curva de crescimento demonstrada na figura 14-B, foi determinado o tempo de dobramento para todas as linhagens, entre os dias 3 e 5 do experimento, e da linhagem A172



incubada com todas as diferentes vesículas. Para a contagem das células, foram usadas placas de 48 poços, com área de crescimento celular de 0,84 cm<sup>2</sup>, logo a densidade celular no 6º dia foi calculada de acordo com essa área de crescimento.

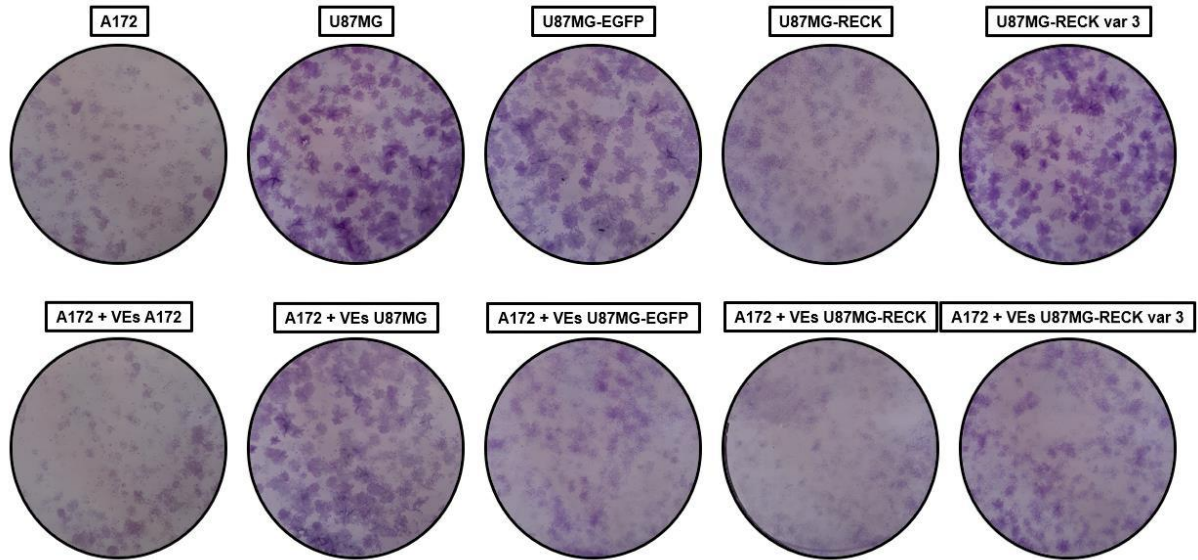
A Tabela 6, mostra que células A172 após incubação com vesículas derivadas da U87MG e U87MG-EGFP tiveram diminuição no tempo de dobramento em cerca de 1 hora, enquanto a densidade celular calculada no 6º dia do experimento aumentou em cerca de 12% com ambas as vesículas (derivadas de U87MG e U87MG-EGFP), em comparação com a curva de proliferação da linhagem A172 com vesículas derivadas dela mesma. Ao serem incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK não houve alteração no tempo de dobramento celular, e o aumento na densidade celular calculada no 6º dia foi de apenas 2,4%. Já quando as células A172 foram incubadas com vesículas derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3, o tempo de dobramento celular reduziu em 2,5 horas e a densidade celular no final do sexto dia aumentou em 28% em comparação à curva de proliferação da A172 com VEs derivadas da própria A172.

Esses resultados mostram que o perfil de proliferação das células A172 está sendo modulado por vesículas extracelulares derivadas das linhagens mais proliferativas, em especial o efeito das VEs derivadas das linhagens U87MG- RECK var 3 foi ainda mais intenso em comparação com VEs derivadas das células controle U87MG e U87MG-EGFP. De forma interessante, a superexpressão de RECK na linhagem U87MG promoveu a liberação de VEs com menor capacidade de alterar o perfil proliferativo das células A172 receptoras.

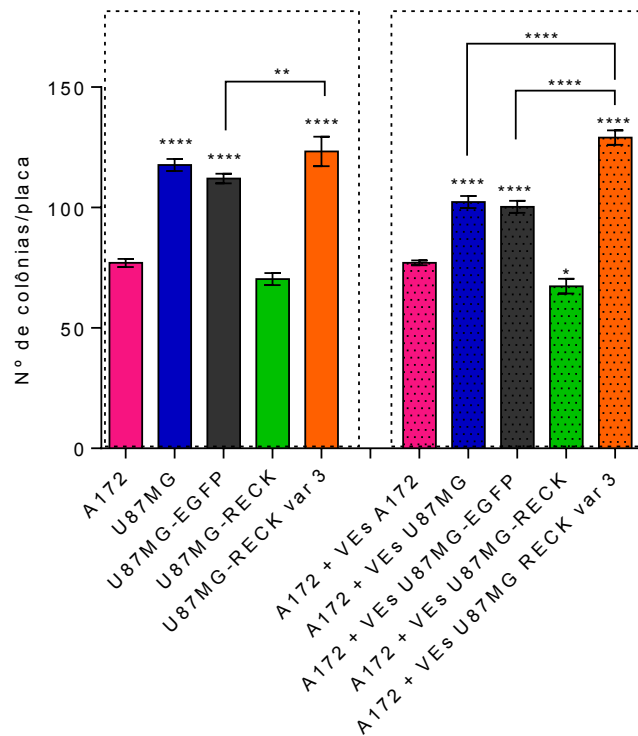
Na sequência foi realizado o ensaio de eficiência de plaqueamento e formação de colônia em substrato sólido utilizando as diferentes linhagens de glioblastoma e ainda utilizando as células A172 incubadas com vesículas isoladas de cada uma das linhagens. Os resultados estão representados nas Figuras 15 (A e B) e 16.

FIGURA 15 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM SUBSTRATO SÓLIDO DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E DAS CÉLULAS A172 INCUBADAS COM AS DIFERENTES VESÍCULAS

A)



B)



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A) Imagens representativas das colônias coradas com cristal violeta para contagem em cada uma das condições citadas, após 10 dias de cultivo. As imagens são representativas de três experimentos independentes realizados em triplicata. B) Gráfico representativo do número de colônias após 10 dias de cultivo sob as diferentes condições avaliadas. Os resultados apresentados

são a média +/- desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística obtida é referente a comparação com a capacidade de formar colônias entre as linhagens A172 e U87MG (\* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Primeiramente, na Figura 15-A, é possível observar imagens representativas das colônias coradas com cristal violeta de cada uma das condições utilizadas nesse ensaio, permitindo a contagem do número de colônias das linhagens A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 e da linhagem A172 incubada com as vesículas derivadas de cada uma delas. É visível a olho nu a diferença na capacidade de formação de colônias quando comparamos a linhagem A172 com as demais, tanto no número das colônias como também na densidade delas (visto pela intensidade da coloração das colônias).

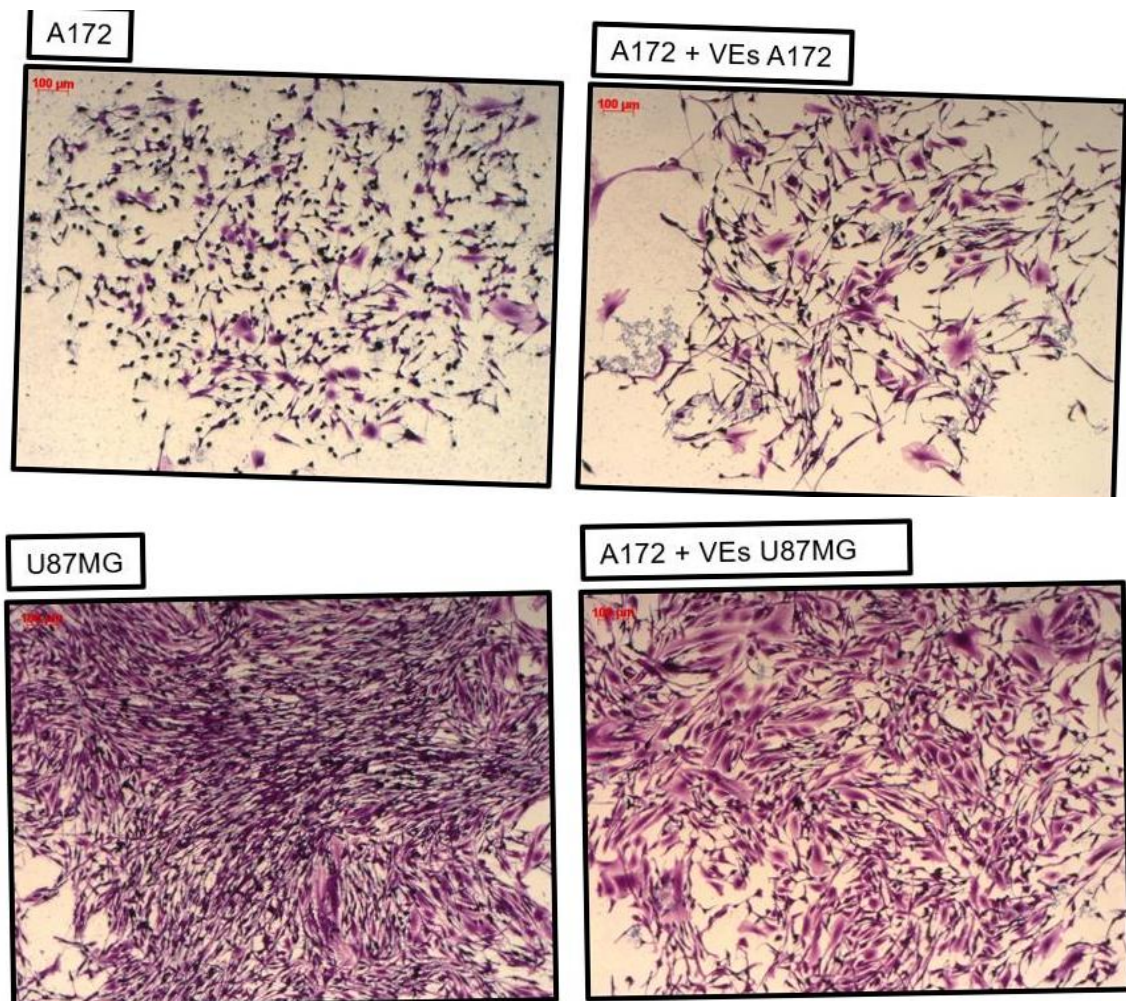
No gráfico representado na Figura 15-B, está demonstrada a contagem das colônias indicando as diferenças na capacidade de cada linhagem em formar colônias em substrato sólido. Observa-se que a linhagem A172 foi capaz de formar em média 73 colônias/placa, uma capacidade muito inferior quando comparado as linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK-var3 que apresentaram em torno de 117, 112 e 123 colônias/placa. A capacidade de formação de colônia da linhagem U87MG-RECK foi muito similar ao da linhagem A172, apresentando cerca de 73 colônias/placa em média. Vale ressaltar que esse resultado distingue do perfil de proliferação observado entre as linhagens, em que a linhagem U87MG-RECK apresentou maior capacidade proliferativa que a linhagem A172 (Figura 14-B).

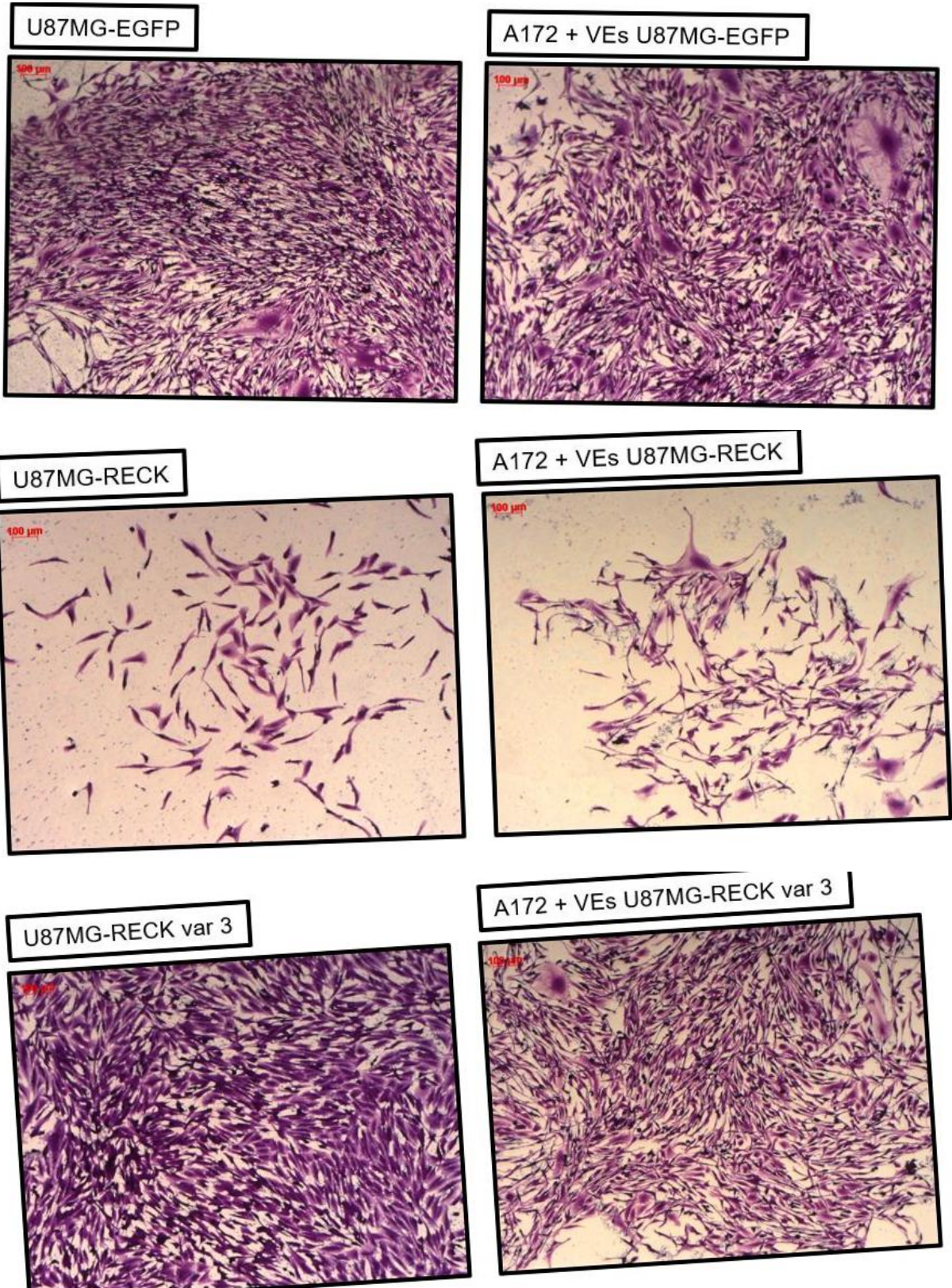
Em relação ao efeito das diferentes VEs na capacidade de formação de colônia, observa-se que a linhagem A172 após incubação com VEs derivadas das linhagens U87MG e U87MG-EGFP apresentou um aumento da capacidade de formação de colônias em comparação com a condição das células tratadas com VEs derivadas da própria linhagem, atingiram 100-102 colônias/placa em comparação com a condição controle obtendo 73 colônias/placa em média. De forma interessante, a capacidade de formação de colônia foi ainda maior após as células A172 serem incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3 (comparado ao efeito de VEs da própria A172), em que as células foram capazes de formar cerca de 129 colônias/placa. Esse resultado sugere um papel fundamental do transcrito RECK-var 3 na modulação da agressividade de células A172 nesse modelo de crescimento em substrato sólido. Já quando as células A172 foram

incubadas com vesículas derivadas da linhagem U87MG-RECK, houve uma redução na capacidade de formação de colônias em cerca de 14% comparado à incubação com VEs da própria linhagem A172, diferente do que foi demonstrado no perfil de crescimento (Figura 14-B), em que VEs derivadas de U87MG-RECK promoveram o aumento do número de células A172 em torno de 2,4%. Nossos resultados demonstram que além de VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK-var 3* serem capazes de modular o aumento do número de colônias na linhagem A172, VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK* apresentaram papel oposto, promovendo a diminuição do número de colônias nas mesmas células.

Por fim, não há diferença na formação de colônias quando as células foram incubadas com vesículas derivadas da própria linhagem A172 comparado à condição de células A172 isoladas.

FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DAS COLÔNIAS DAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK E U87MG-RECK VAR 3 E DAS CÉLULAS A172 INCUBADAS COM AS VESÍCULAS DERIVADAS DE CADA UMA DELAS





FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Imagens representativas das colônias coradas com cristal violeta para contagem em cada uma das condições citadas, após 10 dias de cultivo, obtidas em microscópio em aumento de 5x. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Na Figura 16, as imagens à esquerda representam colônias formadas por cada uma das linhagens após 10 dias de cultivo. Observa-se uma grande diferença nas colônias formadas pelas células A172 em comparação com as colônias formadas pelas linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK var 3 em relação à densidade celular e a quantidade de colônias. Também podemos observar que a linhagem U87MG-RECK apresentou menor capacidade na formação de colônias em comparação às demais, inclusive à A172 (essa diferença não havia sido vista no perfil de crescimento, Figura 14-B, entre U87MG-RECK e A172). As imagens à direita representam a linhagem A172 incubada com as diferentes VEs onde observa-se uma mudança na morfologia celular e densidade das colônias. Nota-se que ao serem cultivadas com VEs derivadas da própria linhagem A172, não há alterações significativas nas colônias. Já quando as células A172 foram incubadas com VEs derivadas das linhagens U87MG, U87MG-EGFP e principalmente U87MG-RECK var 3, há um aumento visível na densidade das colônias formadas, além da morfologia celular tornar-se mais semelhante à das células de origem das VEs com perfil de proliferação maior que a A172. Por outro lado, células A172 incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK apresentaram menor capacidade de formar colônias em substrato sólido e estas, apresentam baixa densidade celular e o número de colônias formadas aparenta ser menor que as demais condições analisadas.

Com esses resultados, observa-se que VEs derivadas de células com modulação da expressão de *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de modular o fenótipo de agressividade celular observado no ensaio de crescimento em substrato sólido, apresentando um perfil oposto de modulação.

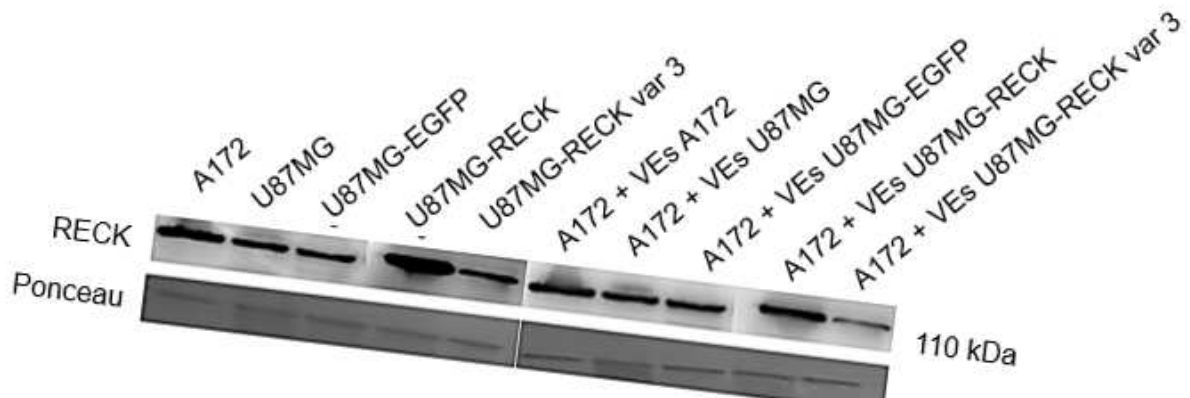
#### 4.1.4 Detecção de alvos moleculares

##### 4.1.4.1 Western Blotting

A fim de detectar alvos intracelulares envolvidos na modulação do fenótipo de agressividade via incorporação de VEs na linhagem A172, utilizamos extratos celulares proteicos das diferentes linhagens (A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3) e extratos proteicos da linhagem A172 incubada com

as diferentes vesículas para detecção da expressão de RECK entre as diferentes condições analisadas (Figura 17).

FIGURA 17 - DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECK NAS LINHAGENS A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK, U87MG-RECK VAR 3 E NA LINHAGEM A172 APÓS INCUBAÇÃO COM AS DIFERENTES VESÍCULAS



FONTE: O autor, 2020.

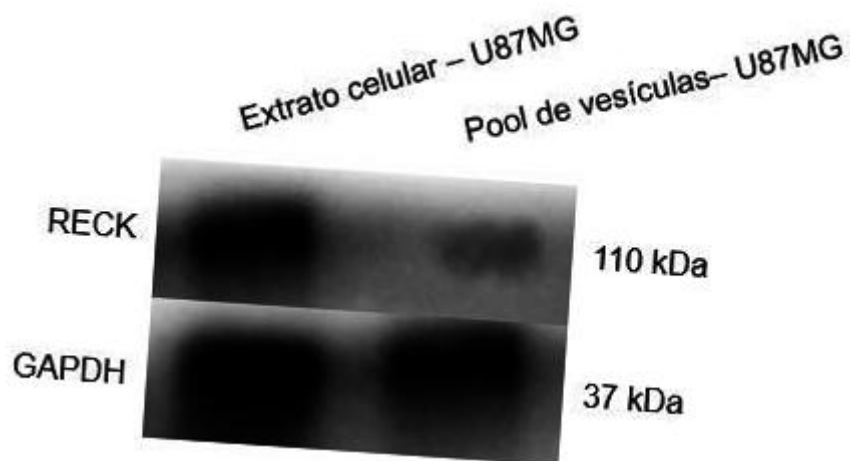
NOTA: A figura mostra a expressão da proteína RECK nas linhagens A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 e nas células A172 incubadas com as diferentes vesículas. Extratos de proteína total foram obtidos e as amostras foram submetidos à SDS-Page, seguido de detecção por Western-Blotting. Como controle interno, utilizamos a coloração com Ponceau para visualizar a quantidade de proteína em cada uma das condições experimentais. O resultado da expressão da proteína RECK por Western Blotting é representativo de um experimento único.

Observa-se na Figura 17 a diferença na expressão proteica RECK entre as diferentes linhagens utilizadas nesse estudo. Considerando a linhagem A172 sem VEs como controle, percebe-se que elas expressam mais RECK em comparação com a linhagem parental U87MG, confirmando dados anteriores do nosso grupo. A superexpressão de RECK na linhagem U87MG-RECK foi confirmada, evidenciando a maior expressão de RECK em comparação com as linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK var 3 após a quantificação. Ainda, quando as células A172 foram incubadas com VEs derivadas da linhagem superexpressando RECK os resultados sugerem um aumento na expressão de RECK endógeno nas células A172 receptora. Esse aumento não parece acontecer quando VEs derivadas das linhagens U87MG, U87MG-EGFP foram utilizadas. De forma curiosa, esse resultado prévio sugere que VEs derivadas da linhagem superexpressando RECK-var 3 possam promover a redução da expressão de RECK endógeno nas células

receptoras. Esse dado representa um único experimento, e precisa ser confirmado com novas repetições.

Sabendo que as VEs derivadas das células U87MG-RECK foram capazes de modular a expressão de *RECK* endógeno na linhagem A172, buscamos avaliar a presença da proteína RECK no conteúdo vesicular, de forma a investigar se a proteína RECK pode estar sendo transportada diretamente via vesículas, ou se outro componente vesicular possa estar aumentando a expressão de RECK endógeno nas células receptoras. Para isso, foi realizado um ensaio preliminar por Western Blotting (utilizando anticorpo específico para a proteína *RECK*, canônica) na linhagem U87MG a partir de um extrato celular e de um pool de vesículas (foram agrupadas 10 amostras previamente coletadas de VEs para um maior rendimento que permitisse a marcação dos anticorpos visto que a concentração de VEs é baixa para ser detectada a partir de uma única amostra) derivadas dessa mesma linhagem. Foi possível detectar a presença da proteína RECK em ambos os extratos (Figura 18). Vale destacar que essa é a primeira vez que foi detectada a presença da proteína *RECK* em vesículas extracelulares (mesmo que em um pool).

FIGURA 18 - DETECÇÃO DE *RECK* (110 KDA) NA LINHAGEM U87MG E EM POOL DE VESÍCULAS DERIVADAS DA MESMA



FONTE: O autor, 2017.

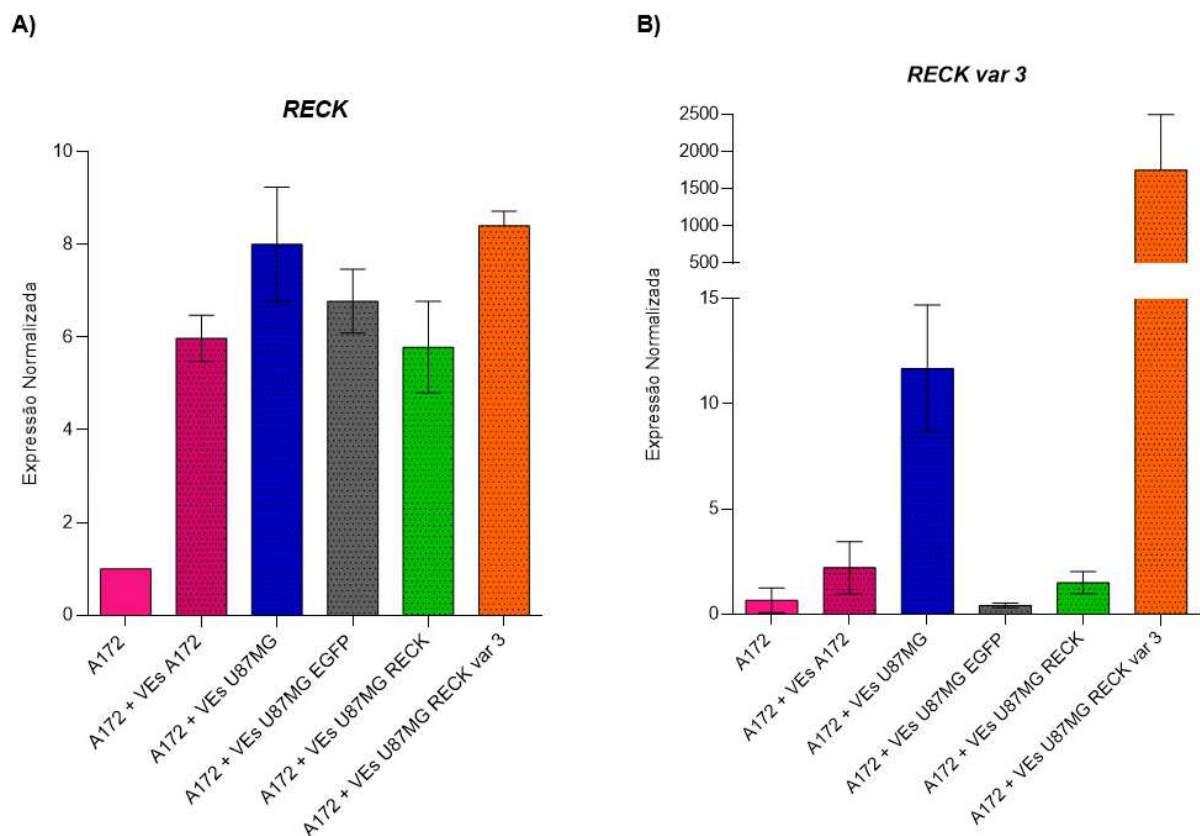
NOTA: A figura mostra a expressão da proteína RECK na linhagem U87MG em um extrato celular (80 µg de proteína) e em um pool de vesículas obtidas das mesmas células (cerca de 60 µg de proteína). Os extratos de proteína total foram obtidos e as amostras foram submetidos à SDS –Page, seguido de detecção por Western-Blotting. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno da quantidade de proteína por condição experimental.



#### 4.1.4.2 qRT-PCR

Para evidenciar o envolvimento dos alvos *RECK* e *RECK-var 3* na modulação do fenótipo de agressividade na linhagem A172, foi realizada a detecção de ambos os transcritos, pelo ensaio de qRT-PCR. As condições avaliadas incluíram inicialmente a linhagem parental A172, seguido da linhagem A172 incubadas com as vesículas derivadas de cada das linhagens utilizadas: U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECKvar3. Foram avaliadas as expressões dos genes *RECK* e *RECK-var 3* em todas essas condições testadas. Os resultados estão representados a seguir na Figura 19.

FIGURA 19 –DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO DE *RECK* E *RECK-VAR 3* NA LINHAGEM A172 E NA LINHAGEM A172 APÓS INCUBAÇÃO COM VESÍCULAS DERIVADAS DE A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK, U87MG-RECK VAR 3



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Expressão dos transcritos *RECK* (A) e *RECK-var 3* (B) por qRT-PCR na linhagem A172 isolada e incubada com vesículas derivadas de cada uma das linhagens (A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3). A expressão dos genes foi normalizada pelo gene HPRT a partir da expressão endógena dos transcritos *RECK* e *RECK-var 3* na linhagem A172. O resultado é representativo de um experimento único, realizado em duplicata.

A Figura 19-A demonstra a expressão do transcrito *RECK* endógeno na linhagem A172 controle em comparação com a expressão nas células A172 incubadas com as diferentes VEs. Nossos resultados demonstram que somente a incubação com VEs, independente da célula de origem, parece aumentar a expressão de *RECK* na linhagem A172 em relação à condição controle (células A172 sem contato com VEs), em torno de 7 vezes. Por ser um único experimento independente, esse resultado precisa ser confirmado. Ainda, nota-se que se esse aumento de transcrito for verdadeiro, o mesmo perfil de modulação não foi observado para a proteína RECK nas mesmas condições experimentais (Figura 17).

A Figura 19-B demonstra a expressão endógena do transcrito *RECK-var 3* na linhagem A172 em comparação com a expressão nas células A172 incubadas com as diferentes VEs. Nossos dados iniciais sugerem que a expressão de *RECK-var 3* na linhagem A172 aumentou em torno de 60% após incubação com VEs derivadas da linhagem U87MG em comparação à incubação com VEs derivadas da própria A172. Essa modulação não foi observada com VEs derivadas da linhagem U87MG-EGFP, mas por ser um único experimento, ainda deve ser confirmado esse resultado. De forma interessante, VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK-var 3* foram capazes de aumentar a expressão do mesmo, na linhagem A172 receptora, em cerca de 2000 vezes.

Em conjunto, nossos dados mostram que as vesículas derivadas das células com superexpressão de *RECK* e *RECK-var3* estão sendo capazes de modular de forma diferencial o fenótipo da célula receptora A172, e que a modulação da expressão de *RECK* e *RECK-var3* foi detectada nas células receptoras após internalização das vesículas, sugerindo que a modulação de fenótipo das células A172 possa estar sendo mediado, pelo menos em parte, de forma distinta e oposta pelos alvos RECK e RECK-var3.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA

Vale lembrar que a elevada expressão de *RECK* é amplamente associada a um melhor prognóstico dos pacientes, incluindo pacientes com glioma, e considerando que vesículas extracelulares são capazes de modular diferentes aspectos da agressividade e resistência tumoral, decidimos avaliar se *RECK* e/ou *RECK-var 3* poderiam estar modulando uma importante característica associada ao

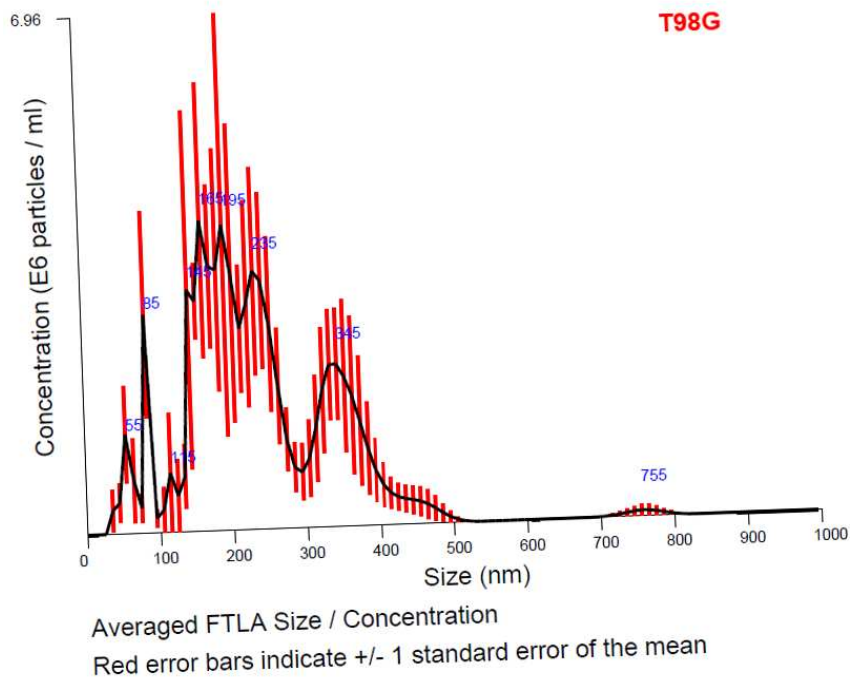
prognóstico dos pacientes, que é a responsividade ao quimioterápico temozolomida (TMZ), mediados por vesículas derivadas das células U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3.

Para responder a essa pergunta, foram utilizadas as linhagens parentais T98G (resistente ao tratamento convencional com TMZ) e U87MG (sensível ao tratamento com TMZ), e as linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3, e a responsividade ao tratamento com o quimioterápico padrão TMZ foi avaliada. Na sequência, as VEs derivadas dessas diferentes linhagens foram utilizadas e a modulação do fenótipo de resistência à TMZ foi descrito.

Inicialmente, o isolamento e caracterização do perfil secretório de VEs derivadas da linhagem T98G foi obtido. As vesículas extracelulares foram obtidas seguindo o mesmo padrão de centrifugações diferenciais e a quantificação proteica de vesículas obtidas da linhagem T98G foi de 2,8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , semelhante ao que foi demonstrado na obtenção das vesículas das demais linhagens (Figura 11). A caracterização das vesículas obtidas das células T98G foi realizada por NTA (Figura 20).

FIGURA 20 - CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS DERIVADAS DA LINHAGEM T98G POR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (NTA)

A)



## B)

<b>Linhagem</b>	<b>Quantidade total de proteína de VEs (µg)</b>	<b>Nº partículas (x 10<sup>7</sup>)</b>	<b>Relação (µg proteína/ 10<sup>7</sup> partículas)</b>
T98G	112	19x10 <sup>7</sup>	5,9
U87MG	109,2	18,6x10 <sup>7</sup>	5,9

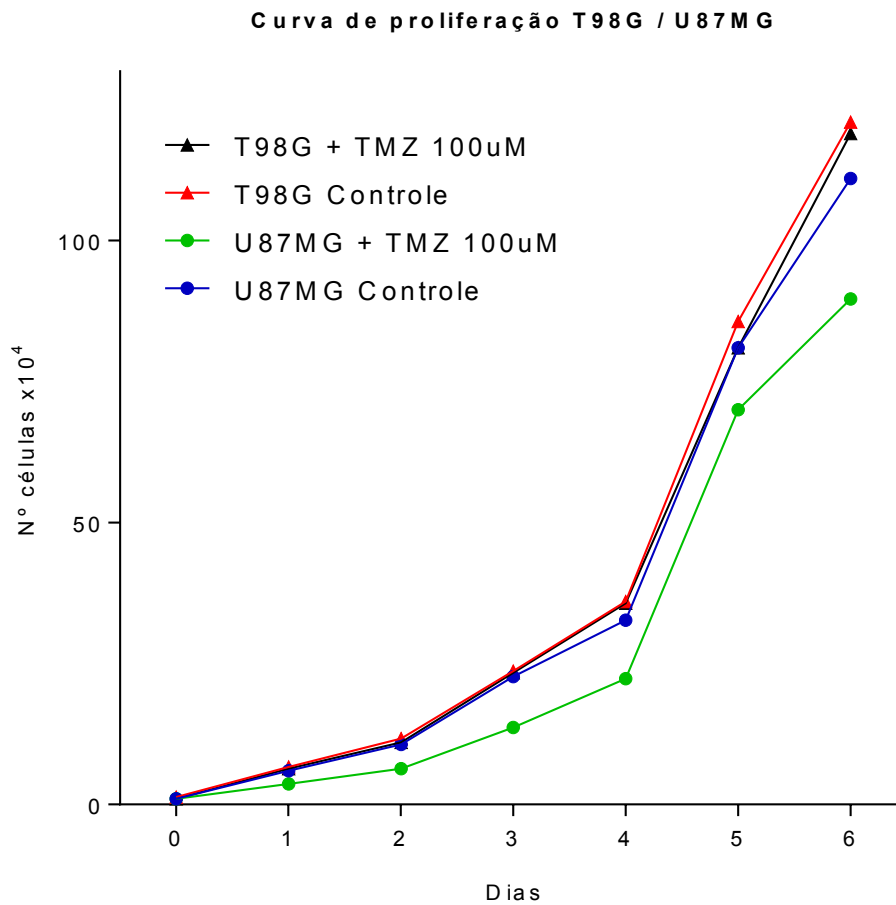
FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A) Gráfico representativo da caracterização por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) das vesículas extracelulares derivadas da linhagem T98G (tamanho médio 237 nm). A barra vermelha representa a média da captura dos picos de três leituras realizadas no período de 3 minutos no equipamento NTA. Os dados representam três experimentos independentes, realizados em duplicata. B) Tabela comparativa entre as linhagens T98G e U87MG em relação à quantidade de células cultivadas por 48 horas para liberação de VEs no meio, com a concentração proteica obtida (método de Bradford) e a relação com o número de partículas (NTA) em cada amostra. Também está demonstrado o tamanho médio da população majoritária das VEs em cada linhagem. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Observa-se que a população majoritária das partículas obtidas dessa linhagem também é composta por microvesículas, com um tamanho médio de 237 nm. A concentração das partículas foi de 19x10<sup>7</sup>/mL. Ambos os resultados (concentração e tamanho de partícula) foram muito semelhantes à linhagem U87MG e as demais linhagens modificadas (U87MG-GFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3, observadas nas Figuras 11 e 12. Os dados indicados na Figura 20-B são comparativos da quantidade total de proteína de VEs liberadas, o Nº de partículas e a determinação da quantidade de proteína/partícula obtida em cada uma das linhagens analisadas. Não há diferença significativa dos valores obtidos para VEs derivadas da linhagem T98G e as demais células.

Antes de avaliarmos a modulação do fenótipo de resistência tumoral via VEs, demonstramos na Figura 21 a curva padrão de proliferação das linhagens T98G e U87MG nas condições controle (DMSO, veículo da droga) e TMZ (100 µM) ao longo de 6 dias de cultivo. Observa-se que a linhagem T98G apresenta resistência ao tratamento com TMZ, pois a curva de proliferação nessa condição é semelhante à própria curva controle. Já a linhagem U87MG ao ser tratada com TMZ ao longo dos 6 dias de experimento, apresentou uma redução na proliferação celular.

FIGURA 21 – CURVA PADRÃO DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGEM T98G E U87MG TRATADAS COM DMSO E TMZ



FONTE: O autor, 2020.

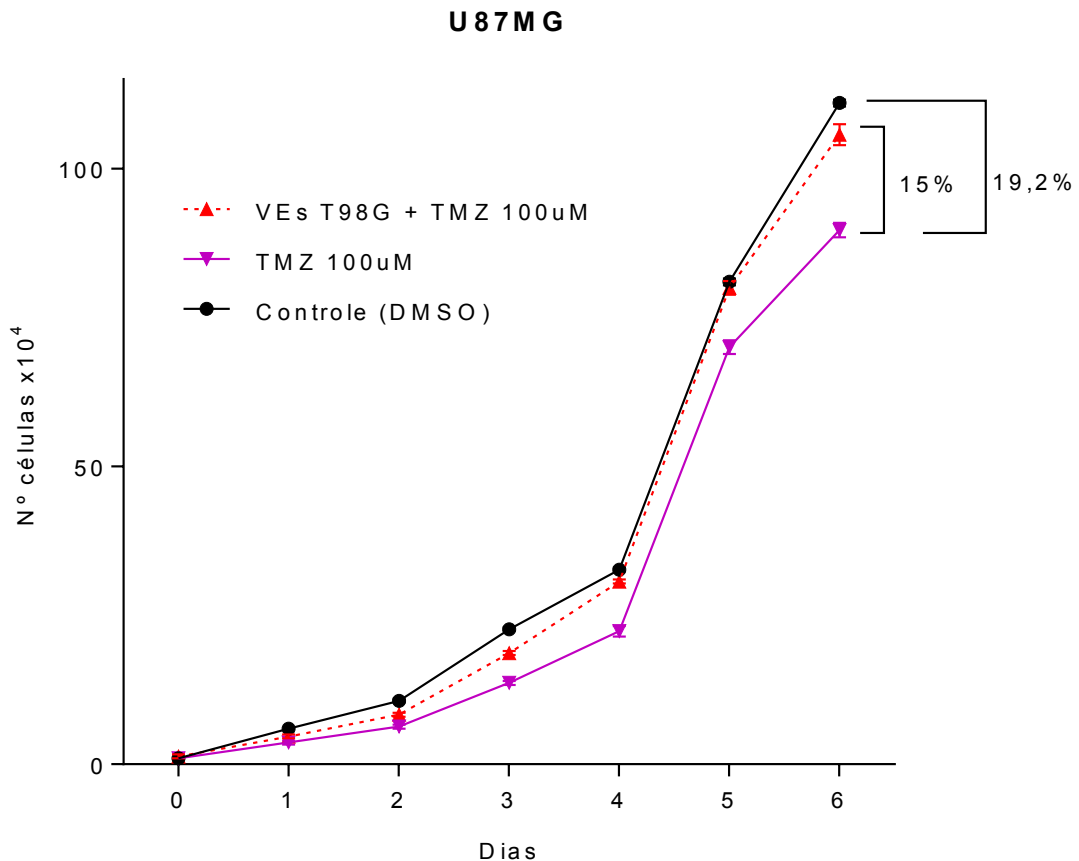
NOTA: Células parentais de glioblastoma humano U87MG e T98G na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMSO (controle) e tratadas com TMZ 100 µM. As condições foram mantidas assim e avaliadas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Na sequência, para avaliar a modulação do fenótipo de resistência tumoral mediado por VEs derivadas das células com superexpressão de *RECK* ou *RECK-var 3*, foram realizados os seguintes ensaios: curva de proliferação e ensaios colorimétricos para avaliar a citotoxicidade da TMZ nas células U87MG e T98G em diferentes condições de tratamento.

Inicialmente, nas Figuras 22 e 23 indicam as curvas de proliferação da linhagem U87MG tratada em diferentes condições, sendo a Figura 22 a demonstração detalhada das condições que apresentaram diferença significativa no

perfil de proliferação dessas células e a Figura 23 detalha o experimento completo, com todas as condições de tratamento utilizadas.

FIGURA 22 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM U87MG TRATADA COM TMZ E TMZ + VES DERIVADAS DA LINHAGEM T98G



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Células parentais de glioblastoma humano U87MG na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMSO (controle), tratadas com TMZ 100 µM e incubadas com VEs derivadas da linhagem T98G + TMZ. As condições foram mantidas assim e avaliadas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Observa-se que as células U87MG tratadas com TMZ apresentam uma redução no número de células ao longo dos dias de cultivo em comparação à condição controle, alcançando uma diferença de 19,2% no número de células no sexto dia de cultivo (Figura 22). Porém, ao serem pré-incubadas com vesículas derivadas da linhagem T98G e posteriormente tratadas com a TMZ, o número de

células da linhagem U87MG foi semelhante à condição controle (observa-se uma diferença de 15% em relação ao tratamento com TMZ isolada), mostrando que as vesículas derivadas de uma linhagem resistente foram capazes de modular o perfil de resistência das células U87MG receptoras.

A tabela 7 mostra que células U87MG após incubação com vesículas derivadas da linhagem T98G e então tratadas com TMZ tiveram uma redução no tempo de dobramento em 1 hora (semelhante ao tratamento com controle, DMSO). Em relação à densidade celular calculada no 6º dia do experimento, comparando o tratamento com TMZ com a condição de TMZ + incubação com VEs da linhagem T98G, houve um aumento de 16% no número de células. Isso demonstra que vesículas derivadas de uma linhagem resistente ao tratamento convencional são capazes de aumentar a resistência da linhagem U87MG antes sensível ao tratamento.

TABELA 7 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM U87MG SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO

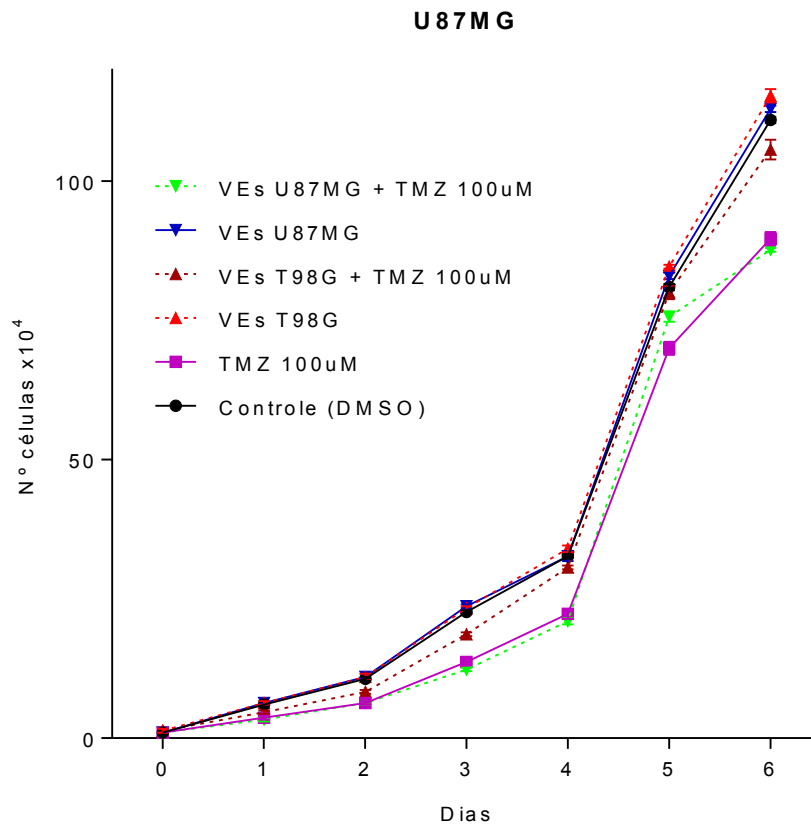
<b>Condição de tratamento U87MG</b>	<b>Tempo de dobramento (horas)</b>	<b>Densidade média no 6º dia célx10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup></b>
Controle (DMSO)	24	132,2
TMZ 100 µM	25	105,6
VEs T98G + TMZ 100 µM	24	126,2

FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A partir da curva de crescimento, demonstrada na figura 21, foi determinado o tempo de dobramento para a linhagem U87MG sob diferentes condições de tratamento, entre os dias 3 e 5 do experimento. Para a contagem das células, foram usadas placas de 48 poços, com área de crescimento celular de 0,84 cm<sup>2</sup>, logo a densidade celular no 6º dia foi calculada de acordo com essa área de crescimento.

A figura 23 mostra o panorama geral da linhagem U87MG tratada com todas as condições além das demonstradas na figura 22. Não houve diferença significativa na proliferação celular nas demais condições em que a linhagem U87MG foi incubada com VEs derivadas dela mesma, com VEs derivadas dela mesma + TMZ e nem com VEs derivadas da linhagem T98G sem tratamento.

FIGURA 23 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM U87MG EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO



FONTE: O autor, 2020.

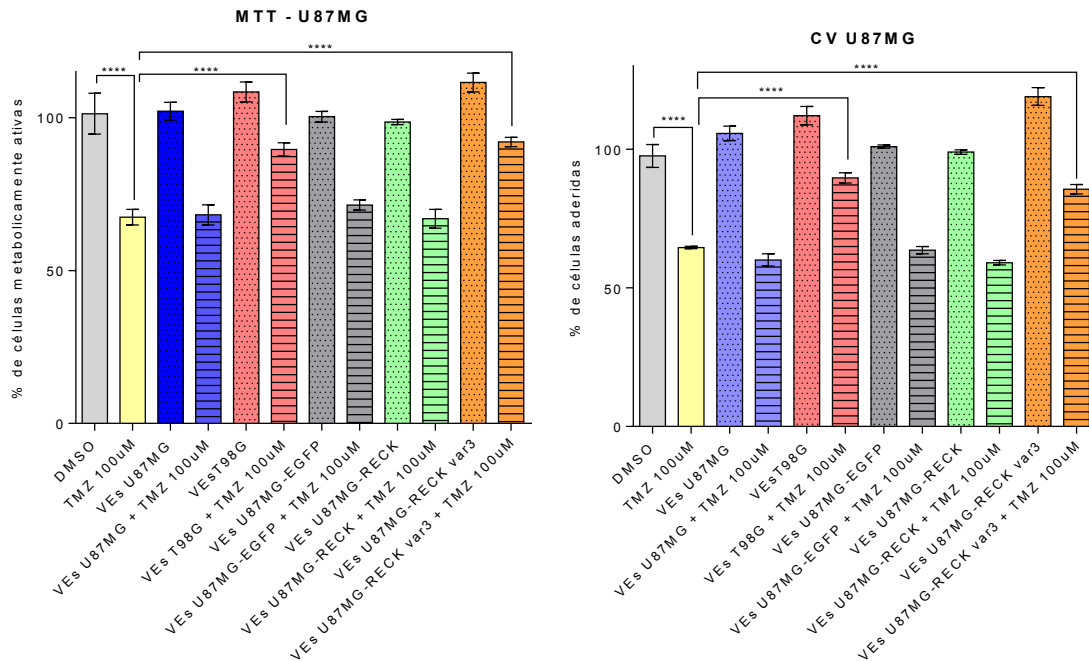
NOTA: Células parentais de glioblastoma humano U87MG na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMSO (controle), tratadas com TMZ 100  $\mu$ M, incubadas com VEs derivadas da linhagem T98G + TMZ, incubadas com VEs derivadas delas mesmas + TMZ e incubadas só com vesículas delas mesmas. As condições foram mantidas assim e avaliadas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Considerando os resultados obtidos a partir das curvas de proliferação sob diferentes condições e baseado em resultados prévios obtidos em nosso grupo, foi escolhido o tempo de 72 horas de tratamento para avaliação do efeito de VEs derivadas das células com superexpressão de *RECK* e *RECK-var 3* na modulação do perfil de responsividade à TMZ, foram realizados ensaios de citotoxicidade, em que os parâmetros de atividade metabólica celular e capacidade de adesão foram avaliados. Os resultados obtidos utilizando a linhagem U87MG após incubação com



as diferentes vesículas extracelulares e diferentes condições de tratamento estão demonstrados na Figura 24.

FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM U87MG



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Gráficos representativos da avaliação de citotoxicidade pelos métodos de MTT e cristal violeta na linhagem U87MG em diferentes condições no tempo de 72 horas. A condição controle foi feita utilizando apenas o veículo da TMZ, DMSO (0,1%). O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão das porcentagens de células metabolicamente ativas e células aderidas, respectivamente. Os dados são referentes a três experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições experimentais são referentes ao controle, DMSO (\*\*\*\* $p < 0,001$ ).

Observa-se que a incubação da linhagem U87MG apenas com as diferentes VEs (originadas de diferentes células secretoras) não teve nenhum efeito ou alteração nos padrões de citotoxicidade (como o perfil metabólico e a capacidade de adesão celular). Na sequência o efeito das VEs na capacidade de modulação do fenótipo de resistência frente ao tratamento com TMZ foi avaliado.

Corroborando com dados da literatura que demonstram ser a U87MG uma linhagem responsiva ao tratamento com TMZ, os dados obtidos mostram uma diminuição na atividade metabólica das células U87MG em torno de 33% e uma redução na porcentagem de células aderidas de 35,5% após o tratamento com TMZ em comparação a condição controle. Em relação às condições em que a linhagem

U87MG foi incubada com VEs observa-se que VEs derivadas da própria U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK, não alteram a responsividade à TMZ. Porém, quando estas células foram incubadas com vesículas derivadas das linhagens T98G e U87MG-RECK var 3 seguido do tratamento com TMZ, houve um aumento na resistência da U87MG ao tratamento, já que a porcentagem de células metabolicamente ativas foi de 89% e 92%, respectivamente para as vesículas da T98G e da U87MG-RECK var 3, e a porcentagem de células aderidas nessas mesmas condições foi de 89% e 85%, respectivamente.

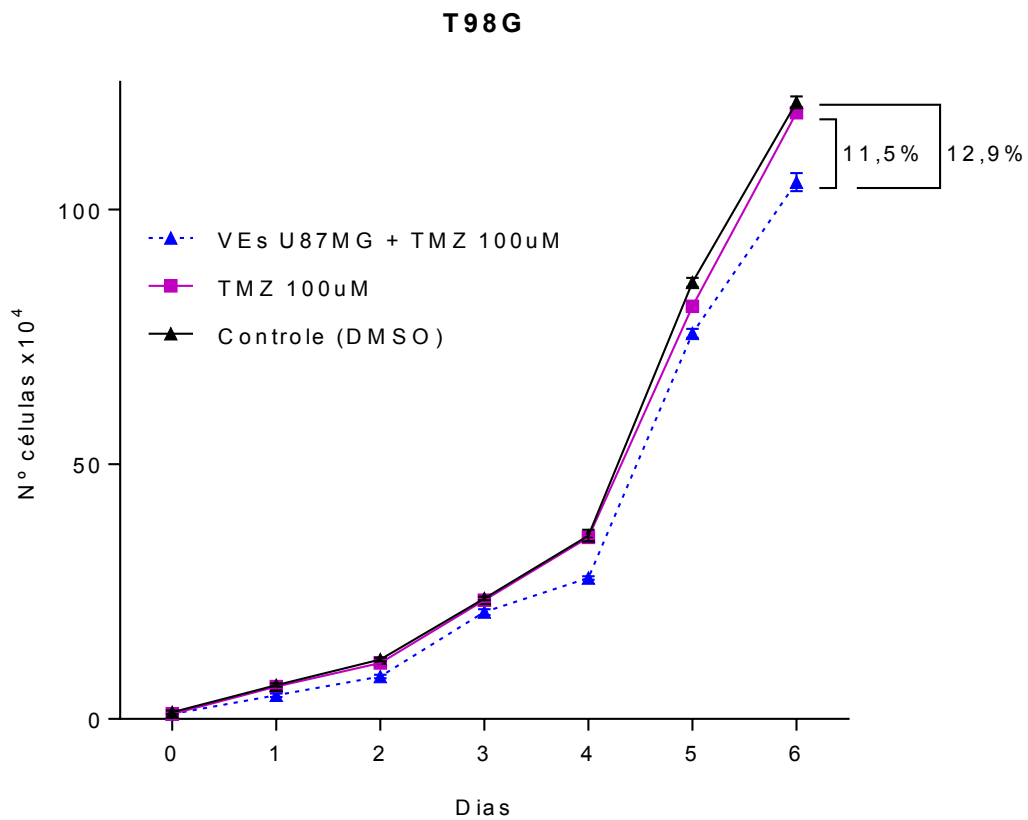
Já a incubação apenas com VEs derivadas das linhagens T98G e U87MG-RECK var 3 não gerou nenhuma alteração nas células U87MG comparada à incubação com VEs derivadas da própria linhagem (Figura24).

De fato, dados da literatura demonstram que as linhagens parentais U87MG e T98G possuem diferentes perfis de responsividade ao tratamento com TMZ. Sendo assim, na sequência, buscamos avaliar a modulação do fenótipo de resistência/sensibilidade à TMZ, via VEs derivadas das linhagens com superexpressão de *RECK* ou *RECK-var 3*, também na linhagem T98G.

As Figuras 25 e 26 demonstram as curvas de proliferação da linhagem T98G, onde na Figura 25 tem a demonstração detalhada das condições que apresentaram diferença significativa na proliferação dessas células e a Figura 26 mostra o experimento completo, com todas as condições de tratamento utilizadas.

A análise da curva de proliferação da linhagem T98G (Figura 25) mostra que não há diminuição da taxa de proliferação celular quando essas células foram tratadas com TMZ em comparação com a condição controle, evidenciando a característica de resistência dessas células ao tratamento convencional. Todavia, quando as células foram incubadas com vesículas derivadas da linhagem U87MG e então tratadas com TMZ, observou-se uma sensibilização da linhagem T98G ao tratamento de cerca de 11,5% (lembrando que a linhagem U87MG tratada com TMZ apresenta uma redução no número de células no 6º dia em torno de 20%) após tratamento com TMZ. Esse resultado sugere que vesículas derivadas de células sensíveis ao tratamento são capazes de modular o fenótipo de responsividade em células antes resistentes, o que pode estar diretamente relacionado com alvos moleculares presentes no interior das vesículas.

FIGURA 25 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM T98G TRATADA COM TMZ E TMZ + VES DA LINHAGEM U87MG



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Células parentais de glioblastoma humano T98G na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMSO (controle), tratadas com TMZ 100 µM e incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG + TMZ. As condições foram mantidas assim e avaliadas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

A tabela 8 mostra que após a linhagem T98G ser incubada com vesículas derivadas da linhagem U87MG e então tratadas com TMZ o tempo de dobramento das células aumentou em 2 horas. Comparando essas mesmas condições, houve uma redução de 11,5% no número de células no sexto dia de cultivo. Isso demonstra que vesículas derivadas de uma linhagem responsiva ao tratamento convencional também são capazes de diminuir a resistência da linhagem T98G ao tratamento com TMZ.

TABELA 8 – ANÁLISE DO TEMPO DE DOBRAMENTO E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM U87MG SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO

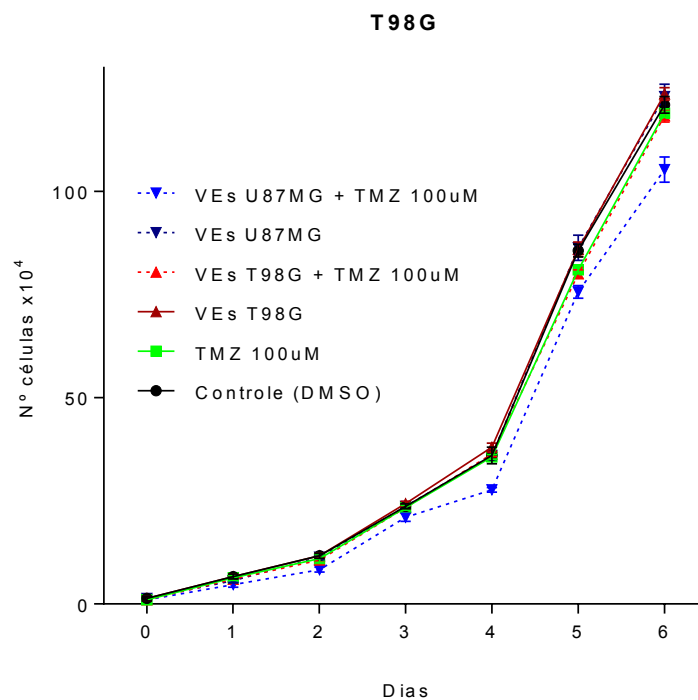
Condição de tratamento T98G	Tempo de dobramento (horas)	Densidade média no 6º dia $\text{célx}10^4/\text{cm}^2$
Controle (DMSO)	22	144
TMZ 100 $\mu\text{M}$	22	141,6
VEs U87MG + TMZ 100 $\mu\text{M}$	24	127,4

FONTE: O autor, 2020.

NOTA: A partir da curva de crescimento, demonstrada na figura 23, foi determinado o tempo de dobramento para a linhagem T98G sob diferentes condições de tratamento, entre os dias 3 e 5 do experimento. Para a contagem das células, foram usadas placas de 48 poços, com área de crescimento celular de 0,84  $\text{cm}^2$ , logo a densidade celular no 6º dia foi calculada de acordo com essa área de crescimento.

A Figura 26 mostra o panorama geral da linhagem T98G tratada com todas as condições. Também não houve diferença significativa na proliferação celular nas demais condições de tratamento, onde a linhagem T98G foi incubada com VEs derivadas dela mesma, com VEs derivadas dela mesma + TMZ e nem com VEs derivadas da linhagem U87MG.

FIGURA 26 - CURVA DE PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM T98G EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO



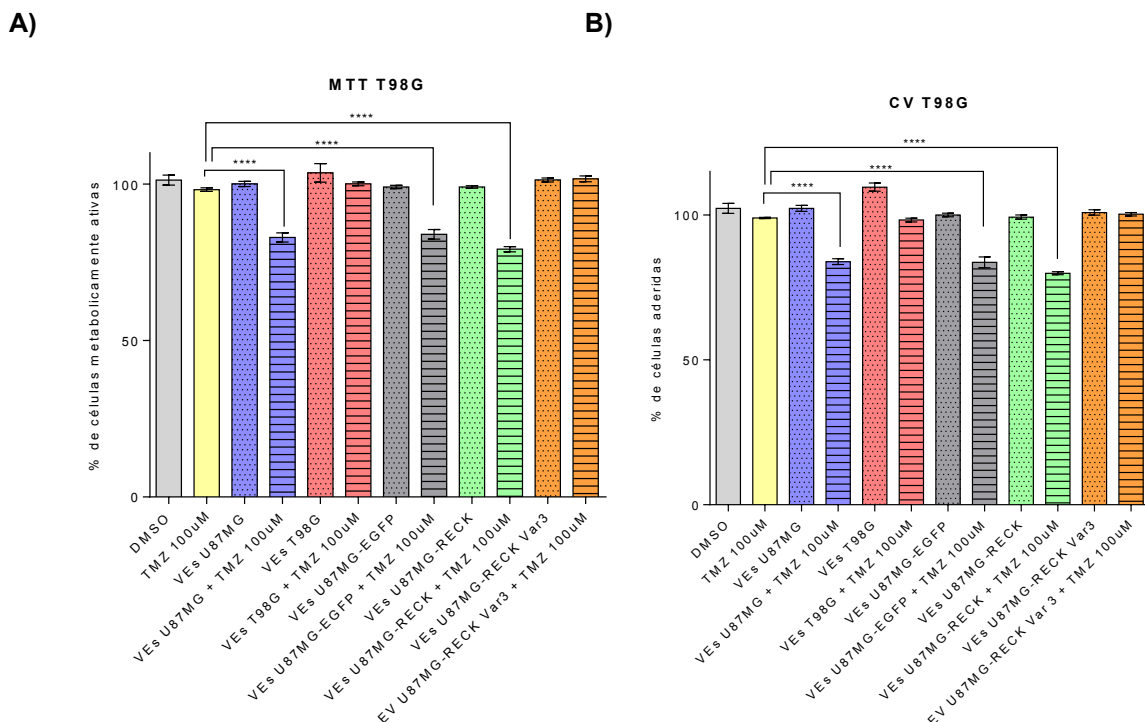
FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Células parentais de glioblastoma humano T98G na concentração de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram cultivadas em meio DMSO (controle), tratadas com TMZ 100  $\mu$ M, incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG + TMZ, incubadas com VEs derivadas delas mesmas + TMZ e incubadas só com vesículas delas mesmas. As condições foram mantidas assim e avaliadas por até 6 dias. A cada 2 dias as células foram coletadas, fixadas e contadas usando câmara de Neubauer em microscópio invertido, aumento de 10x. Os resultados representam a média do número de células viáveis de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Por fim, buscamos avaliar o efeito das VEs derivadas das diferentes linhagens (com superexpressão de RECK e RECK-var 3) na linhagem T98G (resistente à TMZ, observado na Figura 21), a partir de ensaios de citotoxicidade, avaliando os parâmetros de atividade metabólica celular e capacidade de adesão.

Nossos dados corroboram dados da literatura que mostram que a linhagem T98G não é responsiva ao tratamento convencional com TMZ, observando que a condição controle e tratado com TMZ não apresentam diferença significativa na porcentagem de células metabolicamente ativas, tampouco na porcentagem de células aderidas (Figura 27).

FIGURA 27 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE NA LINHAGEM T98G



FONTE: O autor, 2020.

NOTA: Influência das VEs na responsividade à TMZ da linhagem T98G. A condição controle foi feita utilizando apenas o veículo da TMZ, DMSO (0,1%) O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio

padrão das porcentagens de células metabolicamente ativas (A) e células aderidas (B). Os dados são referentes a três experimentos independentes, realizados em triplicata. As significâncias estatísticas das condições são referentes ao controle, DMSO (\*\*\*\* $p < 0,001$ ).

Inicialmente, os resultados demonstram que a incubação com VEs, independente da célula de origem, em geral não alterou os parâmetros de citotoxicidade analisados na linhagem T98G.

Observa-se que quando células T98G foram incubadas com VEs derivadas das linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK (todas responsivas ao tratamento com TMZ), e posteriormente tratadas com TMZ, houve uma sensibilização das células T98G ao tratamento. No gráfico A, observa-se uma redução da porcentagem de células metabolicamente ativas de 16% na presença de VEs derivadas da U87MG, 15% na presença de VEs derivadas da U87MG-EGFP e 19% na presença de VEs derivadas da U87MG-RECK. Na Figura 27-B, observa-se esse mesmo padrão, onde há uma redução na porcentagem de células T98G aderidas de 16%, 15% e 18% na presença das VEs derivadas de U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-RECK respectivamente.

Vale destacar que o tratamento das células T98G com VEs derivadas das células com superexpressão do transcrito canônico de *RECK* (células U87MG-RECK) não foram capazes de aumentar a sensibilidade das células T98G ao tratamento com TMZ de forma significativa em comparação às VEs derivadas das linhagens U87MG e U87MG-EGFP.

De forma interessante, podemos observar que VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK-var 3* foram capazes de reverter o efeito de sensibilização à TMZ gerado nas células T98G pelas VEs derivadas de U87MG em combinação ao tratamento com TMZ, demonstrando que o *RECK-var 3* tem papel importante na modulação da responsividade à TMZ, e que parecer ser de forma oposta ao RECK canônico. Podemos concluir que a superexpressão de *RECK-var3* na linhagem U87MG foi capaz de gerar vesículas extracelulares que mantiveram o fenótipo de resistência à TMZ nas células receptoras equivalente as vesículas derivadas das células T98G.

## 5 DISCUSSÃO

Dentre os tumores cerebrais, com origem no SNC, os gliomas representam a maioria e são ainda classificados de acordo com suas características morfológicas e grau de agressividade (I a IV), (ABTA, 2020), sendo os tumores de grau IV também conhecidos por glioblastomas (GB) (MALLICK *et al.*, 2016; PREUSSER *et al.*, 2011; MAROSI, 2012).

Apesar de serem tumores com baixa incidência, os GB possuem progressão rápida e mau prognóstico. A alta agressividade desse tipo de tumor está relacionada à diversos aspectos, como a heterogeneidade das células que compõe o microambiente tumoral, a sua grande capacidade de invasão e migração e aos vários mecanismos de resistência celular frente aos tratamentos convencionais (ORZA *et al.*, 2013). Dessa forma, o entendimento de possíveis mecanismos envolvidos na agressividade tumoral e na capacidade de resistência de células de glioblastoma ao quimioterápico padrão (TMZ) é fundamental para que haja sucesso no tratamento, principalmente a partir da investigação e descoberta de possíveis alvos moleculares envolvidos na modulação desses perfis (GEDEON *et al.*, 2014; SAYEGH *et al.*, 2014).

Uma das características da comunicação celular que tem relação direta com a modulação de fenótipos como a responsividade das células aos tratamentos convencionais, é a capacidade das células de produzirem e liberarem vesículas extracelulares (VEs). Estas por sua vez, são capazes de transportar biomoléculas capazes de mediar a comunicação celular no microambiente (DONGMEI SUN, 2010). VEs derivadas de células tumorais podem modular diferentes fenótipos em células receptoras (THERY *et al.*, 2002; KHARAZIHA *et al.*, 2012) e assim, em modelo tumoral, além de serem capazes de modular fenótipos como progressão e invasão, podem ser consideradas importantes alvos de diagnóstico e/ou prognóstico de tumores (NAKANO *et al.*, 2015; GOURLAY *et al.*, 2016). Da mesma forma, tem sido avaliado o papel de VEs na compreensão da biologia tumoral como um todo, no diagnóstico da doença e na formulação de estratégias terapêuticas (YEKULA *et al.*, 2020; KATAKOWSKI *et al.*, 2016). Entre as biomoléculas que podem estar presentes no conteúdo de vesículas extracelulares, vale destacar a importância de avaliar a presença de miR-21 ou um de seus alvos moleculares

supressores de tumor, já que ele está envolvido na progressão de tumores, associado à proliferação, apoptose e invasão celular (FENG *et al.*, 2016).

O gene *RECK*, um de nossos objetos de interesse no presente trabalho, é um alvo direto de miR-21. O transcrito canônico foi descrito pela primeira vez como um gene supressor tumoral devido a sua capacidade de inibir metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas remodeladoras de matriz extracelular e classicamente envolvidas no processo invasivo de células tumorais (TAKAHASHI *et al.*, 1998), diminuindo assim a agressividade, capacidade de migração e invasão de células tumorais (NODA *et al.*, 2003).

Dentre os transcritos de *RECK*, derivados de *splicing* alternativo, destaca-se de interesse nesse trabalho o transcrito *RECK-var 3*, pois já foi demonstrado em modelo de GB humano que a superexpressão de *RECK-var 3* que este parece ter função oposta ao de *RECK* canônico, estando relacionado com um fenótipo mais agressivo (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2015).

De acordo com esse cenário, tendo em vista o papel oposto de *RECK* e seu transcrito *RECK-var 3* na tumorigênese, o presente trabalho buscou avaliar se *RECK* e/ou *RECK-var 3* seriam capazes de modular os fenótipos de agressividade e resistência tumoral, mediados por vesículas extracelulares, com o objetivo de melhor compreender o papel do gene *RECK* e seus transcritos alternativos no processo de transformação maligna em modelo de glioblastoma humano.

O modelo celular utilizado foi validado, evidenciando as diferenças no fenótipo de proliferação em linhagens de glioblastoma humano. Demonstrou-se que a linhagem A172 possui menor capacidade proliferativa, atingindo cerca de 65,9% de diferença no número de células no sexto e último dia de experimento em comparação com a linhagem U87MG (Figura 8). Da mesma forma, foi avaliado o perfil de ambas as linhagens no ensaio de eficiência de plaqueamento (Figura 9) onde observa-se também uma grande diferença na capacidade de formação de colônias entre as linhagens U87MG e A172.

Esse resultado pode ser comparado com o trabalho de Correa *et al* (2006) em que foi demonstrada a menor capacidade de formação de colônias em meio semissólido da linhagem A172 em comparação com a linhagem T98G (esta, com perfil muito semelhante ao da linhagem U87MG). Em nosso grupo de estudo, também já foi observado que o perfil de proliferação das linhagens U87MG e T98G é



muito similar, possuem alta capacidade de formação de colônias em substrato sólido e de proliferação celular (PINO GOMES, 2018).

A partir de nossos resultados preliminares com as curvas padrão de proliferação celular e ensaios de eficiência de plaqueamento em baixa densidade, consideramos a linhagem A172 como nosso modelo de estudo para avaliar a possível modulação do fenótipo de agressividade após internalização de diferentes VEs. De fato, o conteúdo interno das VEs reflete o fenótipo e genótipo da célula secretora (GODLEWSKI *et al.*, 2015) e diversos trabalhos têm avaliado o papel de VEs derivadas de células tumorais na comunicação celular e na modulação de fenótipos associados à tumorigênese.

As células parentais da linhagem U87MG foram consideradas nosso padrão de células mais agressivas e com maior capacidade proliferativa. Para avaliar se o gene *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var 3* poderiam estar modulando o fenótipo de agressividade, via VEs, células derivadas da linhagem U87MG com a superexpressão de *RECK* e *RECK-var3* foram também utilizadas no estudo.

Para isso, o isolamento de VEs das linhagens A172, U87MG, U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3 foi padronizado e as VEs foram caracterizadas de acordo com o tamanho e concentração que cada uma das linhagens é capaz de liberar.

Foi demonstrado que a relação entre  $\mu\text{g}$  de proteína de VEs por N<sup>o</sup> de partículas secretadas foi bastante similar entre as diferentes linhagens, atingindo em torno de 5-6,  $\mu\text{g}$ /partícula dependendo da linhagem (Tabela 4). Observou-se também que o tamanho médio das partículas para todas as linhagens foi de aproximadamente 200 nm, caracterizando assim a população majoritária das VEs obtidas das diferentes linhagens de GB como microvesículas (Figura 11).

Além do NTA, a caracterização de VEs pode ser realizada também por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). No trabalho de Setti e colaboradores (2015) os dois métodos (NTA e TEM) foram utilizados e observou-se na linhagem U87MG uma população majoritariamente composta por VEs com tamanho maior que 150 nm, corroborando nossos dados mostrando um tamanho de partícula compatível com a presença de microvesículas em sua maioria. É interessante destacar que nesse trabalho foi feita ainda a marcação de CD63 para detectar a presença de exossomos na população de VEs obtidas em geral, o que não foi avaliado em nosso trabalho pois o foco não foi separar subpopulações de vesículas

e sim avaliar o papel delas como um todo na modulação dos fenótipos de agressividade e resistência.

Na literatura, uma série de trabalhos refere-se à VEs como exossomos ou apenas como vesículas, embora não demonstrem uma caracterização específica de tamanho de partícula ou de marcadores específicos para exossomos (como o marcador CD63), como no caso de Van der Vos, *et al* (2016), descrevendo de maneira geral o uso de vesículas extracelulares derivadas de linhagens tumorais, sem especificar se é uma população majoritariamente composta por exossomos ou por microvesículas. Ainda em modelo de GB, utilizando a linhagem U87MG, foi demonstrado via NTA e TEM (com marcação de CD63) que a população das VEs obtidas após centrifugações diferenciais possuía tamanhos que variaram entre 50 e 200 nm. O gráfico representativo do NTA mostra uma média geral de 200 nm, corroborando com os dados encontrados em nosso trabalho (DUSOSWA *et al.*, 2019).

Não só o conteúdo vesicular transferido de uma célula à outra, mas a capacidade de internalização das VEs por uma célula receptora pode variar de acordo com o contexto e modelo tumoral. Nesse sentido, devido à heterogeneidade do microambiente tumoral, em alguns casos a liberação e internalização de VEs em células receptoras pode ocorrer de formas distintas (FEDELE *et al.*, 2019). Contudo, no presente trabalho nossos resultados demonstram que a internalização das VEs derivadas das diferentes linhagens celulares foi bastante similar em todas as condições testadas, independente da célula de origem (Figura 13). A internalização das diferentes VEs parece ter um padrão intracelular de localização citoplasmática e não na membrana das células receptoras.

Esse resultado corrobora com o que foi observado por Simon *et al* (2018) em que foi demonstrada a internalização de VEs transportando um alvo de interesse (bevacizumab) em células de GB LN18 e U87MG de forma homogênea e similar em ambas as linhagens.

De forma interessante, Hallal e colaboradores (2019) demonstraram o uptake de VEs derivadas de células primárias de GB (células-tronco tumorais e células diferenciadas) em astrócitos primários humanos como células receptoras. Além da captação das VEs ocorrer de maneira homogênea e similar às nossas condições (VEs derivadas de diferentes células sendo captadas pela mesma linhagem receptora de maneira similar), esse trabalho demonstra a capacidade de

VEs derivadas de linhagens com características agressivas em modular esse fenótipo de maior agressividade nas células receptoras.

Em relação à capacidade de modulação de fenótipo de agressividade mediado por VEs, nosso trabalho mostrou de forma muito evidente que células A172 incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG apresentaram maior capacidade de proliferação (Figura 14-A) e maior capacidade de formação de colônias em substrato sólido (Figura 15-A), comparado ao perfil das células A172 cultivadas somente em meio ou com VEs derivadas da própria linhagem. Essa capacidade de VEs derivadas de uma célula mais agressiva ser capaz de induzir modulação no fenótipo de células receptoras tem sido bastante abordada na literatura, como citado acima (HALLAL *et al.*, 2019).

Dados do nosso grupo tem mostrado que *RECK* e *RECK-var 3* parecem ter um papel distinto na tumorigênese. Corroborando nossos resultados iniciais, foi mostrado que a linhagem U87MG superexpressando os transcritos *RECK* e/ou *RECK-var 3* tem um perfil de proliferação bastante diferente. Comparando as linhagens A172 e U87MG-*RECK*, o perfil de proliferação das linhagens apresenta uma diferença de cerca de 20% no número de células no sexto dia (Figura 14-B). Já a comparação do perfil de proliferação das linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-*RECK var 3* (que entre elas é bem similar) com a A172 essa diferença é bastante significativa, quase 40% de diferença no número de células no sexto dia (Figura 14B).

Em relação à capacidade das diferentes VEs serem capazes de modular o fenótipo de agressividade, nossos resultados mostram que quando as células A172 foram incubadas com VEs derivadas das linhagens U87MG e U87MG-EGFP observou-se um aumento no perfil proliferativo em torno de 11% (Figura 14-B). Porém, o mesmo aumento não foi observado quando VEs derivadas da linhagem U87MG-*RECK* foram utilizadas, apresentando um perfil de proliferação similar à proliferação das células A172 cultivadas na presença de VEs derivadas da própria linhagem (condição controle). De forma muito interessante, VEs derivadas de U87MG-*RECK var 3* promoveram um aumento de 24% no perfil de proliferação das células A172 em comparação à incubação com VEs derivadas da própria A172 e, ainda, pode-se destacar que esse aumento foi 11% superior em comparação com os dados obtidos para as VEs derivadas da U87MG e U87MG-EGFP (Figura 14-B).

Os resultados obtidos até então, mostram que VEs são capazes de modular o fenótipo de agressividade nas células A172, e que *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de alterar essa modulação, via secreção diferencial de vesículas extracelulares.

Outro parâmetro de agressividade analisado neste estudo foi a capacidade de formação de colônia em substrato sólido (também chamado de eficiência de plaqueamento). Observou-se que a capacidade de formação de colônias da linhagem U87MG-*RECK* é muito similar que a da linhagem A172 (Figura 15-B). Já as linhagens U87MG, U87MG-EGFP e U87MG-*RECK var 3* apresentam uma diferença significativa na formação de colônias em substrato sólido em relação à A172, onde a capacidade de formação de colônias é praticamente 40% maior (Figura 15-B). No trabalho de Trombetta-Lima e colaboradores (2015) foi observado que a linhagem U87MG-*RECK var 3* apresenta maior capacidade de formação de colônias em meio semissólido de agarose quando comparada às linhagens controles U87MG parental e U87MG-EGFP, o que de certa forma, corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Sobre o papel das diferentes VEs na capacidade de formação de colônias da linhagem A172, observou-se que VEs derivadas da superexpressão de *RECK* na linhagem U87MG foram capazes de diminuir a capacidade de formação de colônias das células A172. VEs derivadas de células U87MG e U87MG-EGFP foram capazes de aumentar essa capacidade da A172 em cerca de 30 colônias, enquanto VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK-var 3* induziram a formação de cerca de 55 colônias a mais, comparado às VEs derivadas da própria linhagem A172 (Figura 15-B). As colônias formadas a partir dessas 3 linhagens citadas, apresentaram maior densidade celular e sugere-se a alteração da morfologia celular na linhagem A172 após a incubação com as VEs (Figura 16).

Vale destacar que o efeito das VEs derivadas das células U87MG-*RECK* na modulação do fenótipo das células A172 foi distinto se compararmos a capacidade de indução de proliferação (Figura 14-B) e o efeito observado na modulação da capacidade de formação de colônias (Figura 15), pois VEs derivadas de U87MG-*RECK* não alteraram o fenótipo proliferativo das células A172, mas reduziram a sua capacidade de formação de colônias, mostrando que o efeito da modulação no fenótipo pode ser dependente das condições experimentais e de densidade celular plaqueada. Juntos, nossos dados sugerem que condições mais “restritivas” de

cultivo permitiram evidenciar o efeito da modulação do fenótipo celular mediado pelas VEs derivadas das células superexpressando RECK canônico.

Em conjunto, nossos dados mostram que células de glioblastoma humano com expressão distinta de *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de secretar VEs com capacidades distintas de modular o fenótipo de agressividade em células receptoras.

Para confirmar que a expressão de *RECK* endógeno estaria sendo modulada nas células receptoras a partir da incubação com as diferentes VEs, e que *RECK* e *RECK-var 3* estão diretamente envolvidos na modulação do fenótipo de agressividade na linhagem A172, realizamos análises da expressão proteica de RECK e a expressão gênica no nível de mRNA de RECK e RECK-var 3 na linhagem A172 incubada com as diferentes VEs.

Inicialmente, observa-se que o fato de incubarmos as células A172 com as diferentes VEs, independente da linhagem de origem, parece aumentar a expressão de *RECK* endógeno na linhagem A172 (Figura 19-A), mas esse resultado não reflete nos níveis proteicos, em que apenas VEs derivadas da linhagem superexpressando RECK foram capazes de aumentar a expressão do mesmo nas células A172 em quase 2x (Figura 17). De forma curiosa, VEs da linhagem que superexpressa RECK-var 3 também aumentaram a expressão de *RECK* canônico endógeno em nível de mRNA, porém, em nível proteico, essas mesmas VEs parecem inclusive diminuir a expressão de RECK na linhagem A172. Ambos os resultados, proteína e mRNA, apresentados são representativos de um experimento único e devem ser repetidos para a confirmação do efeito das VEs de U87MG-RECK var 3.

Nossos dados mostram ainda que houve um aumento da expressão (em torno de 10-12x) do transcrito *RECK-var 3* (Figura 19-B) nas células A172 após a incubação com VEs derivadas da linhagem U87MG em comparação com a incubação de VEs derivadas da própria linhagem. Porém, a incubação das células A172 com VEs derivadas da linhagem que superexpressa RECK-var 3 foi capaz de aumentar praticamente 2000x a expressão do mesmo transcrito alternativo comparado ao efeito de VEs derivadas da própria A172.

Em conjunto, nossos dados mostram que as vesículas derivadas das células com superexpressão de *RECK* e *RECK-var3* estão sendo capazes de modular de forma diferencial o fenótipo da célula receptora A172, e que a modulação da expressão de *RECK* e *RECK-var3* foi detectada nas células receptoras após

internalização das vesículas, induzindo uma modulação de fenótipo de forma distinta e oposta.

Além de *RECK* e/ou *RECK-var 3* terem papéis importantes na modulação dos fenótipos de agressividade e resistência, a presença de outros alvos no conteúdo das VEs, sejam eles diretamente associados a *RECK* ou não, também pode desempenhar esse papel de modulação fenotípica.

A exemplo disso, Colangelo e Azzam (2020) avaliaram a capacidade de VEs derivadas de células de GB (T98G e U87MG) em aumentar a liberação de MMPs por astrócitos. Observaram que VEs derivadas das células tumorais expressam CD147, proteína que sinaliza para que haja a liberação de MMP-9, associada à maior capacidade de invasão. A incubação destas VEs em astrócitos normais, os tornou mais agressivos e com maior capacidade invasiva, pois passaram a liberar MMP-9 em resposta à CD147 presente nas VEs. Os resultados sugerem um papel importante de CD147 na modulação do microambiente tumoral, aumentando a capacidade de invasão celular a partir de VEs derivadas de GB.

Sabendo que além do fenótipo de agressividade, VEs também podem modular a responsividade de células tumorais à tratamentos convencionais, buscamos avaliar se VEs derivadas das diferentes linhagens de GB seriam capazes de modular o fenótipo de resistência tumoral frente ao tratamento com Temozolomida (TMZ). Para isso, utilizamos as linhagens parentais T98G (resistente ao tratamento convencional com TMZ) e U87MG (sensível ao tratamento com TMZ), e as linhagens U87MG-EGFP, U87MG-RECK e U87MG-RECK var 3, e a responsividade ao tratamento com TMZ foi avaliada.

O isolamento e caracterização de VEs derivadas da linhagem T98G, mostrou que a quantificação proteica do conteúdo vesicular e o número de partículas obtidos foram semelhantes aos obtidos com as demais linhagens (obtido em torno de 112µg de proteína e  $19 \times 10^7$  partículas/mL), sendo a população majoritária das partículas também composta por microvesículas (tamanho médio em torno de 200 nm) (Figuras 20-A e 20-B).

Verificamos que o tratamento das células U87MG com TMZ promove a redução no número de células ao longo dos dias de cultivo em comparação à condição controle (DMSO), chegando a uma diferença de 19,2% entre as duas condições (Figura 22). Ainda, nossos resultados mostram que o tratamento com TMZ promoveu uma diminuição na atividade metabólica das células U87MG (em

torno de 33%) e uma redução na porcentagem de células aderidas (em torno de 35,5%) (Figura 24). De forma interessante, quando VEs derivadas da linhagem T98G foram incubadas junto as células U87MG e na sequência as células foram tratadas com TMZ, observou-se um aumento na resistência ao tratamento, sendo o número de células no sexto dia da curva de crescimento 15% maior em relação ao número de células após tratamento com TMZ isolada (Figura 22), assim como foi observado um aumento na porcentagem de células metabolicamente ativas e na porcentagem de células aderidas nessas mesmas condições (Figura 24).

Esse resultado se torna muito interessante pois demonstra que VEs derivadas de uma linhagem resistente foram capazes de modular o perfil de resistência das células U87MG, antes responsivas ao tratamento.

Na literatura existem exemplos que mostram a modulação do fenótipo de resistência mediada por VEs. Em modelo de glioma, foi visto que VEs liberadas por essas células podem transportar fatores associados à mecanismos de resistência. Utilizando linhagens de células-tronco tumorais de GB, o tratamento com TMZ aumentou a liberação de VEs sem alterar o tamanho das partículas, derivadas dessas células, com características pró-tumorais envolvidas no processo de adesão celular (André-Grégoire *et al.*, 2018).

A avaliação da modulação do fenótipo de resistência associada à VEs também foi demonstrada no trabalho de Shao *et al.* (2015), observando que os níveis de mRNA de MGMT em VEs derivadas de células de GB eram mais elevados em linhagens resistentes em comparação com linhagens sensíveis à TMZ. Nesse caso, os níveis de MGMT foram considerados indicativos de resistência tumoral.

Em nosso trabalho, quando as células U87MG foram incubadas na presença de VEs derivadas da própria linhagem U87MG e das linhagens U87MG-EGFP e U87MG-RECK e posteriormente tratadas com TMZ, não foi observada nenhuma alteração na responsividade ao fármaco. Por outro lado, quando VEs derivadas das linhagens U87MG-RECK var 3 foram utilizadas, observou-se um aumento da resistência da linhagem U87MG ao tratamento com TMZ, evidenciado pelo aumento da porcentagem de células metabolicamente ativas e a porcentagem de células aderidas após tratamento nessas mesmas condições (Figura 26). Esses resultados foram semelhantes ao que foi observado na condição em que as VEs derivadas da linhagem T98G foram utilizadas.

Um exemplo interessante relacionando VEs com a modulação do fenótipo de resistência tumoral é a pesquisa de Yu *et al.*, (2018), em que mostra que células de glioma são capazes de estimular astrócitos normais à transformação em astrócitos reativos. A partir dessa transformação, os astrócitos passam a liberar exossomos contendo mRNA de MGMT no seu interior. Dessa forma, células de glioma antes MGMT-negativas fazem a captação desses exossomos derivados de astrócitos reativos (com MGMT presente no conteúdo vesicular) e adquirem um fenótipo resistente ao tratamento com TMZ por meio da tradução do mRNA de MGMT dos exossomos.

Na sequência, a capacidade de modulação da responsividade das células resistentes (T98G) também foi investigada. Os nossos resultados mostram que não houve diminuição na proliferação celular quando a linhagem T98G foi tratada com TMZ. Contudo, quando as células T98G foram incubadas com VEs derivadas da linhagem U87MG e então tratadas com TMZ, as células T98G foram sensibilizadas ao tratamento quimioterápico, evidenciado pela redução de cerca de 12,9% da proliferação celular (Figura 25), e cerca de 20% na porcentagem de células metabolicamente ativas e na porcentagem de células aderidas (Figura 27). Vale lembrar que a linhagem U87MG ao ser tratada com TMZ na mesma concentração acaba reduzindo sua capacidade proliferativa em cerca de 20%. Sendo assim, esse resultado sugere que VEs derivadas de células sensíveis ao tratamento (U87MG) também são capazes de modular o fenótipo de resistência tumoral, aumentando a sensibilidade das células receptoras ao tratamento, e isso pode estar diretamente associado à presença de alvos moleculares no interior das VEs que desempenham esse papel de modulação.

Quando as células T98G foram incubadas com VEs derivadas das linhagens U87MG-EGFP e U87MG-RECK (ambas responsivas ao tratamento com TMZ), estas também foram capazes de promover uma sensibilização da T98G à TMZ, pois houve uma redução da porcentagem de células metabolicamente ativas de cerca de 17% bem como a redução na porcentagem de células aderidas de 16,5% comparado ao efeito de VEs derivadas da própria T98G, semelhante ao efeito das VEs derivadas da linhagem U87MG (Figura 27). Esse resultado sugere que o efeito de sensibilização da linhagem T98G ao tratamento não é resultado da expressão de superexpressão de RECK canônico nas células U87MG-RECK. Entretanto, a superexpressão de *RECK-var 3* nas células U87MG foi capaz de alterar as



características das vesículas secretadas por essa linhagem de forma que estas não possuem a capacidade de sensibilizar as células T98G ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, podemos sugerir que VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK-var 3 foram capazes de “reverter” o efeito gerado pelas VEs derivadas da linhagem U87MG nas células T98G, em combinação ao tratamento com TMZ, demonstrando que o transcrito *RECK-var 3* tem papel importante na modulação da responsividade, pois as células se mantiveram resistentes ao tratamento com TMZ nessa condição.

De maneira geral, podemos concluir que VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3 foram capazes de induzir um fenótipo de resistência à TMZ equivalente as VEs derivadas da própria linhagem T98G avaliada.

Em um trabalho revisado por Mondal e colaboradores (2017) são descritas algumas moléculas que podem estar presentes no conteúdo de VEs e terem papéis importantes na modulação de alguns fenótipos tumorais, como o aumento da resistência, aumento da capacidade de invasão e metástase, entre outros. Correlacionando com os resultados obtidos em nosso trabalho, podemos sugerir que a modulação da resistência/sensibilidade ao tratamento com TMZ pode estar ocorrendo devido à presença de RECK e RECK-var 3 nas VEs ou simplesmente a presença de alguma outra molécula que tenha relação com um deles, como MGMT, TIMPs ou o próprio miR-21 (SHAO *et al.*, 2015; AKERS *et al.*, 2013; SKOG *et al.*, 2008).

Com base em todos os resultados obtidos nesse trabalho, podemos resumir que VEs de maneira geral estão sendo capazes de modular o fenótipo de agressividade na linhagem A172. De forma mais acentuada, observou-se que VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK-var 3* realizaram esse papel de aumento do perfil de agressividade de maneira mais acentuada, enquanto VEs derivadas da linhagem superexpressando *RECK* parecem desempenhar papel oposto na modulação deste fenótipo. Da mesma forma, a comparação do efeito das VEs derivadas de diferentes linhagens frente a responsividade ao tratamento das células U87MG e T98G com TMZ também demonstrou que *RECK* e *RECK-var 3* são capazes de mediar essa resistência, via a secreção de VEs diferenciais, desempenhando um papel fundamental na modulação do fenótipo de resistência tumoral frente ao tratamento convencional. Nesse sentido, observamos que VEs derivadas de U87MG-RECK demonstraram efeito semelhante ao de VEs derivadas

de U87MG e U87MG-EGFP, indicando que a sensibilização da linhagem T98G ao tratamento não é dependente da expressão de RECK em si. Por outro lado, VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3 parecem desempenhar papel similar ao de VEs derivadas da linhagem T98G, sugerindo o papel de *RECK-var 3* na modulação da resistência tumoral.

## 6 CONCLUSÃO

Sabendo que a busca por alvos moleculares envolvidos em mecanismos de resistência e agressividade é um passo essencial para melhorar as terapias atuais no combate ao câncer, buscamos caracterizar o papel de *RECK* e/ou *RECK-var 3* na capacidade de modulação dos fenótipos de agressividade e resistência tumoral via secreção de VEs.

No presente trabalho, foi possível:

- Caracterizar vesículas extracelulares (VEs) derivadas de linhagens parentais de GB humano e de linhagens que expressam de forma diferencial o gene *RECK* e seu transcrito alternativo *RECK-var3*, mostrando que a população majoritária é composta por microvesículas de tamanho médio 200nm.
- VEs foram capazes de modular o fenótipo de agressividade tumoral na linhagem receptora A172, evidenciado pelo aumento do perfil de proliferação celular e aumento da capacidade dessas células em formar colônias em meio sólido.
- O fenótipo de agressividade nas células A172 foi intensificado a partir de VEs derivadas das células U87MG-*RECK-var 3* e, de forma inversa, VEs derivadas de células com superexpressão de *RECK* canônico tiveram o efeito oposto, principalmente evidenciado a partir da diminuição da capacidade de formação de colônia em meio sólido.
- A proteína RECK pode ser detectada no conteúdo vesicular e dados preliminares sugerem que RECK e RECK-var3 possam estar sendo modulados endogenamente nas células receptoras a partir da interação com as diferentes VEs.
- VEs derivadas da linhagem T98G e da linhagem U87MG-RECK-var3 aumentaram a resistência das células U87MG ao tratamento com TMZ.
- VEs derivadas da linhagem U87MG foram capazes de sensibilizar a linhagem T98G ao tratamento com TMZ, da mesma forma que VEs derivadas da

linhagem superexpressando *RECK*. Por outro lado, VEs derivadas da linhagem U87MG-RECK var 3 não apresentam o mesmo efeito, mantendo as células T98G resistentes ao tratamento com TMZ.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABTA. **American Brain Tumor Association**. Disponível em < <http://www.abta.org/about-us/news/brain-tumor-statistics/>> Acesso em dez 2020.

AKERS J. et al. **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies**. *Journal of neuroncology*, vol 113, p. 1-11, 2013.

ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. New York: Garland Science. 2008.

ANDRÉ-GRÉGOIRE, G. et al. **Temozolomide affects Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells**. *Biochimie*, vol. 155, p. 11-15, 2018.

ARSCOTT, W. et al. **Ionizing Radiation and Glioblastoma Exosomes: Implications in Tumor Biology and Cell Migration**. *Translational Oncology*, vol. 6, p. 638-648, 2013.

BARCISZEWSKA, A. M. et al. **A new epigenetic mechanism of temozolomide action in glioma cells**. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, 2015.

BASBAUM, C. B., WERB, Z. **Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface**. *Curr Opin Cell Biol*, v. 8, n. 5, p. 731-8, Oct 1996.

BEHNAN, J. et al. **The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours**. *Brain, a Journal of Neurology*, vol. 142, 2019.

BEIER; SCHULZ; BEIER, **Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected**. *Molecular Cancer*, 10:128, 2011.

BERANEK, D. T. **Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents**. *Mutation Research*, V. 231, n. 1, p. 11-30, 1990.

BLASIAK et al. **An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme—Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective**. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, 2018.

BOVENBERG, M.S; DEGELING, M.H; TANNOUS, B.A. **Advances in stem cell therapy against gliomas**. *Trends in Molecular Medicine*, V. 19, n. 5, p. 281-291, 2013.

BULLOCK, M. et al. **Pleiotropic actions of miR-21 highlight the critical role of deregulated stromal microRNAs during colorectal cancer progression.** *Cell Death and Disease*, vol. 4, 2013.

CABRINI et al. **Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review).** *International Journal of Oncology*, p. 417-428, 2015.

CAFFO, M. et al. **Gliomas Biology: Angiogenesis and Invasion. Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications,** p. 37–103, 2013.

CARRO MS et al. **The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumors.** *Nature*, vol 463, p. 318–325, 2010.

COLANGELO, N. and AZZAM, E. **Extracellular vesicles originating from glioblastoma cells increase metalloproteinase release by astrocytes: the role of CD147 (EMMPRIN) and ionizing radiation.** *Cell communication and signaling*, 18:21, 2020.

CORREA TC et al. **Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness.** *J Cell Biochem*, vol 99, p. 156-167, 2006.

DINAKARPANDIAN e NAGASE. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochim Biophys Acta*, p. 267-83, 2000.

DONGMEI S. et al. **A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes.** *The American Society of Gene & Cell Therapy*, vol.18, n 9, p. 1606-1614, 2010.

DUSOSWA, S. et al. **Glycan modification of glioblastoma-derived extracellular vesicles enhances receptor-mediated targeting of dendritic cells.** *Journal of Extracellular Vesicles*, vol. 8, 2019.

EVANS SM. *et al.* **Initial evidence that blood-borne microvesicles are biomarkers for recurrence and survival in newly diagnosed glioblastoma patients.** *Journal of Neuro-oncology*, vol 127, p. 391-400, 2016.

FEDELE, M. et al. **Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma.** *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, 2019.

FENG, J. et al. **Difference in the Inhibitory Effect of Temozolomide on TJ905 Glioma Cells and Stem Cells.** *Frontiers in Neurology*, vol. 8, article 474, 2016.

FURUMOTO, K. et al. **RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs.** Hepatology, v. 33, n. 1, p. 189-95, Jan 2001.

GABRIELY, G. et al. **MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators.** Mol Cell Biol, v. 28, n. 17, p. 5369-80, Sep 2008.

GANGODA L. et al. **Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic?.** Proteomics, vol 15, p. 260-271, 2015.

GEDEON, P.C et al. **Antibody-based immunotherapy for malignant glioma.** Seminars in Oncology, V. 41, n. 4, p. 496-510, 2014.

GODLEWSKI J. et al. **Belonging to a network—microRNAs, extracellular vesicles, and the glioblastoma microenvironment.** Neurooncology, vol 17, p. 652-662, 2015.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. **Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão.** Estudos Avançados, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

GOMEZ, D. E. et al. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** Eur. J Cell Biol, v. 74, n. 2, p. 111-22, Oct 1997.

GOURLAY J. et al. **The emergent role of exosomes in glioma.** Journal of clinical neuroscience, 2016.

HALLAL, S. et al. **Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells Stimulate Normal Astrocytes to Acquire a Tumor-Supportive Phenotype Via p53 and MYC Signaling Pathways.** Molecular Neurobiology, vol 56, p. 4566-4581, 2019.

HUI, W. et al. **MicroRNA-195 Inhibits the Proliferation of Human Glioma Cells by Directly Targeting Cyclin D1 and Cyclin E1.** Plos One, v.8, n.1, p.1-10, 2013.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer.** Disponível em:<<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em nov. 2020.

JACOMASSO, T. **Caracterização do perfil de expressão de MMPs e de seus inibidores, TIMPs e RECK, em linhagens representativas dos diferentes estágios de progressão do melanoma humano.** Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, Curitiba, 2010.

JACOMASSO, T. et al. **The alternatively spliced RECK transcript variant 3 is a predictor of poor survival for melanoma patients being upregulated in aggressive cell lines and modulating MMP gene expression in vitro.** Melanoma Research, 2019.

JACOMASSO, T. et al. **Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma: inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2.** Melanoma Research, vol 24, p. 32-39, 2014.

JIN, F. et al. **Difference in the Inhibitory Effect of Temozolomide on TJ905 Glioma Cells and Stem Cells.** Frontiers in Neurology, v.8, sept. 2017.

KAHLERT, C. et al. **Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis.** Journal of Molecular Medicine, vol. 91, p. 431-437, 2013.

KANG, H. G. et al. **RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness.** J Orthop Res, v. 25, n. 5, p. 696-702, May 2007.

KATAKOWSKI e CHOPP. **Exosomes as Tools to Suppress Primary Brain Tumor.** Cell Mol Neurobiol, 2016.

KHARAZIHA P. et al. **Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle.** Biochimica et Biophysica Acta, vol 1826, p. 103-111, 2012.

KHASRAW, M; BELL, D; WHEELER, H. **Long-term use of temozolomide: could you use temozolomide safely for life in gliomas?** Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia, V. 16, n. 6, p. 854-855, 2009.

KNIZHNIK, A.V. et al. **Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage.** Plos One, v.8, n.1, p.1-12, 2013.

KOHSAKA, S; TANAKA, S. **Chemotherapeutic Agent for Glioma.** INTECH open science open minds, Chapter, V. 19, p. 415-438, 2013.

KÖNNECKE, H.; BECHMANN, I. **The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas.** Clinical and Developmental Immunology, v. 2013, 2013.

KREBS, C.; WEINBERG, J.; AKESSON, E. **Introdução ao Sistema Nervoso e à Neurofisiologia Básica.** Neurociências ilustrada, p. 1–22, 2013.

LEE, S. Y. **Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme.** Genes and Diseases, v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016.

LIMA, F.R et al. **Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead.** *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 1826, n. 2, p. 338-349, 2012.

LIU, L. et al. **Functional CYP1A1 genetic variants, alone and in combination with smoking, contribute to development of head and neck cancers.** *European Journal of Cancer*, v. 49, n. 9, p. 2143–2151, 2013.

LOCHHEAD P. e CHAN A. **Statins and colorectal cancer.** *Clin Gastroenterol Hepatol.* v. 11, p.109-114, 2013.

LONG, N. K. et al. **Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas.** *Oral Oncol*, May 14, 2008.

LUZ F. et al. **Aberrant Splicing in Cancer: Mediators of Malignant Progression through an Imperfect Splice Program Shift.** *Oncology*, 2016.

MALLICK, S. et al. **Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm.** *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, vol. 28, p. 199–210, 2016.

MAROSI, C. **Complications of chemotherapy in neuro-oncology.** *Handbook of Clinical Neurology. Handbook of clinical Neurology*, V. 105, p. 873-885, 2012.

MATOS, B. et al. **Dynamic expression of 11 miRNAs in 83 consecutive primary and corresponding recurrent glioblastoma: correlation to treatment, time to recurrence, overall survival and MGMT methylation status.** *Radiology and oncology*, vol. 52(4), p. 422-432, 2018.

MENG. N. et al. **RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator.** *Cellular and Molecular Biology*, p. 1003-1010, 2008.

MIKI, T. et al. **The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways.** *J Biol Chem*, v. 282, n. 16, p. 12341-52, 2007.

MONDAL, A. et al. **Extracellular Vesicles as Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma.** *Frontiers in Oncology*, vol. 7, article 144, 2017.

MONFARED, H. et al. **Potential Therapeutic Effects of Exosomes Packed With a miR-21-Sponge Construct in a Rat Model of Glioblastoma.** *Frontiers in Oncology*, vol. 9, article 782, 2019.

MORIOKA, Y. et al. **The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts.** *Oncogene*, Jan 26, 2009.

NAJBAUER, J; NRALJIK, N; NÉMETH, P. **Glioma stem cells: markers, hallmarks and therapeutic targeting by metformin**. Pathology Oncology Research, V. 20, n. 4, p. 789-797, 2014.

NAKADA, M.; OKADA, Y.; YAMASHITA, J. **The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion**. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, v. 8, p. e261–e269, 2018.

NAKANO I. *et al.* **Extracellular vesicles in the biology of brain tumor stem cells – Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker development**. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2015.

NODA, M. *et al.* **RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling**. Cancer Metastasis Rev, v. 22, n. 2-3, p. 167-75, Jun-Sep 2003.

NODA, M., TAKAHASHI, C. **Recklessness as a hallmark of aggressive cancer**. Cancer Sci, v. 98, n. 11, p. 1659-65, Nov 2007.

OH, J. *et al.* **The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis**. Cell, v. 107, n. 6, p. 789-800, Dec 14, 2001.

OHL, F. *et al.* **Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?** J Mol Med, v. 83, n. 12, p. 1014-24, 2005.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 17, p. 1842–1850, 2013.

ORZA, A. *et al.* **Reversing chemoresistance of malignant glioma stem cells using gold nanoparticles**. International Journal of Nanomedicine, v.3, n.8, p.689-702, 2013.

OSHIMA, T. *et al.* **Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinases and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in patients with colorectal cancer: MMP-2 gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer**. Oncol Rep, v. 19, n. 5, p. 1285-91, May 2008.

PERSAUD-SHARMA, D. *et al.* **Disparities in Brain Cancer in the United States: A Literature Review of Gliomas**. Medical Sciences, v. 5, n. 3, p. 16, 2017.

PESTA, M. *et al.* **Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC**. Anticancer Res, v. 29, n. 11, p. 4535-9, Nov 2009.



PINO GOMES, R. **Mecanismos de citotoxicidade mediados pela combinação de temozolomida e sinvastatina em células de glioblastoma humano.** Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica, Curitiba, 2018.

PREUSSER, M et al. **Current concepts and management of glioblastoma.** *Annals of Neurology.* V. 70, n. 1, p. 9-21, 2011.

RAPOSO e STOORVOGEL. **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles and friends.** *The Journal of Cell Biology,* vol. 200, n 4, p. 373-383, 2013.

RICKLEFS, F. et al. **Extracellular Vesicles from High-Grade Glioma Exchange Diverse Pro-oncogenic Signals That Maintain Intratumoral Heterogeneity.** *Cancer Research,* vol. 76, 2016.

ROVIRA, J. et al. **Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica.** *Nefrologia,* vol. 37(2), p. 126-137, 2017.

SANTIAGO-DIEPPA D.R. et al. **Extracellular vesicles as a platform for 'liquid biopsy' in glioblastoma patients.** *Expert Rev Mol Diagn.,* vol 14, p. 819-825, 2014.

SAYEGH, E.T et al. **Vaccine therapies for patients with glioblastoma.** *Journal of Neuro-oncology,* V. 119, n. 3, p. 531-546, 2014.

SETTI M., et al. **Extracellular vesicle-mediated transfer of CLIC1 protein is a novel mechanism for the regulation of glioblastoma growth.** *Oncotarget,* vol. 6, n 31, 2015.

SHAO H, Chung J, Lee K, Balaj L, Min C, Carter BS, et al. **Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma.** *Nat Commun* 2015.

SHI R. et al. **Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients.** *Oncotarget,* vol 6, n 29, 2015.

SIMON, T. et al. **Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles.** *Oncogene,* vol 39, p. 4477-4490, 2020.

SIMON, T. et al. **Shedding of bevacizumab in tumour cells derived extracellular vesicles as a new therapeutic escape mechanism in glioblastoma.** *Molecular Cancer,* 17:132, 2018.

SKOG J. et al. **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers.** *Nature cell biology,* 1470-1476, 2008.

SOBOL; WILSON. **Mammalian DNA  $\beta$ -polymerase in base excision repair of alkylation damage.** *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology,* vol. 68, p. 57-74, 2001.

SONG, S. Y. et al. **Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer.** Eur J Cancer, v. 42, n. 1, p. 101-8, Jan 2006.

TAKAGI, S., SIMIZU, S., OSADA, H. **RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription.** Cancer Res, v. 69, n. 4, p. 1502-8, Feb 15, 2009.

TAKAHASHI, C. et al. **Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 95, n. 22, p. 13221-6, Oct 27, 1998.

THAKKAR, J. P. et al. **Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma.** Cancer epidemiology, biomarkers and prevention, vol. 23, 2014.

THERY et al. **Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines.** Journal of Extracellular Vesicles, vol. 7, 2018.

TROMBETA-LIMA, M. **Isolamento, expressão, e caracterização de três variantes de splicing do gene supressor de tumor RECK em modelo de astrocitoma humano.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Departamento de Bioquímica. São Paulo, p, 205, 2014.

TROMBETTA-LIMA et al. **Isolation and characterization of novel RECK tumor suppressor gene splice variants.** Oncotarget, 2015.

UENO, M. et al. **Transporters in the brain endothelial barrier.** Current Medicine Chemical, v.17, p.1125–1138, 2010.

VAN DER VOS, K. E., et al. **Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain.** Neuro-Oncology, v. 18, p. 58-69, 2016.

VERHAAK RG *et al.* **Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.** Cancer Cell, vol 19(17), p.98–110, 2010.

VERINGA, S.J.E. et al. **In Vitro Drug Response and Efflux Transporters Associated with Drug Resistance in Pediatric High-Grade Glioma and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma.** Plos One, v.8, n.4, 2013.

WELLER, M et al. **MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?** Nature reviews Neurology, V. 6, n. 1, p. 39-51, 2010.

XU, H. et al. **Exosomal communication in glioma – a review.** JBUON, vol. 21(6): 1369, 2014.

YAN Y. et al. **Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 35:23, 2016.

YEGANEH, B. et al. **Targeting the Mevalonate Cascade as a New Therapeutic Approach in Heart Disease, Cancer and Pulmonary Disease.** Pharmacol Ther., v. 143, p. 87-110, 2014.

YEKULA, A., et al. **Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment.** Frontiers in Immunology, vol. 10, article 3137, 2020.

YIM & CHOI. **Extracellular vesicles as a novel carrier for therapeutic molecules.** BMB reports, vol 49, p. 586-586, 2016.

YOSHIMOTO, K. et al. **Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma.** Frontiers in Oncology, v. 2, n. December, p. 1–8, 2012.

YU, T. et al. **Delivery of MGMT mRNA to glioma cells by reactive astrocyte-derived exosomes confers a temozolomide resistance phenotype.** Cancer letters, vol 433, p. 210-220, 2018.

ZENG, A. et al. **miR-129-5p targets Wnt5a to block PKC / ERK / NF-  $\kappa$  B and JNK pathways in glioblastoma.** Cell Death and Disease, p. 1–16, 2018.

ZENG, A.L., et al. **Tumor exosomes from cells harboring PTPRZ1–MET fusion contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma.** Oncogene, v. 36, p. 5369-5381, 2017.

ZHANG, J et al. **Autophagic lysosomal reformation depends on mTOR reactivation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced autophagy.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol 70, p. 76–81, 2015.

ZHANG, J. et al. **Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance.** Current Molecular Pharmacology, vol 5, p. 102-114, 2012.

ZHANG, S. et al. **MicroRNA-21 Inhibitor Sensitizes Human Glioblastoma U251 Stem Cells to Chemotherapeutic Drug Temozolomide.** J Mol Neuroscience, vol. 47, p. 346-356, 2012.

ZHOU, Q.; GUO, P.; KRUIH, G. D. **Predicting Human Tumor Drug Concentrations from a Preclinical Pharmacokinetic Model of Temozolomide Brain Disposition** Predicting Human Tumor Drug Concentrations from a Preclinical Pharmacokinetic Model of Temozolomide Brain Disposition. 2007.

ZIYAN, W. et al. **MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration.** Medical Oncology, vol. 28, p. 1469-1474, 2011.

ZONG, H. et al. **The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements.** Expert Rev Mol Diagn, vol 4, p. 383-94, 2012.