

EXOSSOMOS COMO MÉTODO DE DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AO TRATAMENTO DE MELANOMA

LUCAS GOEDERT¹; RICHARD KOYA², SIWEN HU-LIESKOVAN², ANTONI RIBAS², TIAGO COLLARES¹

¹*Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil*

²*University of California Los Angeles, EUA*

– *goedertlucas@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Exossomos são pequenas vesículas endossomal-derivadas abrangendo 30-120 nm de diâmetro secretadas das células por meio de exocitose e, no contexto do câncer, são capazes de preparar nichos metastáticos e suprimir o sistema imune do hospedeiro. Apesar dessas características pró-tumorigênicas, os exossomos podem ser úteis para diversas aplicações biotecnológicas, como vacinas biológicas anticâncer, sistemas de *drug delivery*, diagnóstico e prognóstico do câncer e medicina personalizada (THÉRY, 2002). Devido a sua propriedade de transportar proteínas da célula parental e ácidos nucleicos ativos, há um crescente interesse de usar exossomos para rastrear alterações do metabolismo do câncer em diferentes condições, por exemplo, na administração de drogas durante o tratamento da doença (YANG, 2011).

Um dos tipos mais comuns de câncer que desenvolve resistência aos medicamentos durante o tratamento é o melanoma, o qual é o câncer de pele mais agressivo. A maioria dos medicamentos desenvolvidos contra o melanoma tem como alvo as mutações oncogênicas em BRAF (BRAF V600E) que estão presentes em quase 60% dos tumores de melanoma cutâneo (DAVIES, 2002). Resistência aos inibidores de BRAF V600E são classificados em dois grupos principais, Resistência Intrínseca e Resistência Adquirida, no qual a segunda é desenvolvida após o início do tratamento que acontece principalmente por reativação de proteínas da via de MAPK (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno) e superexpressão da via de RTK (Receptores de Tirosina Quinase) (SULLIVAN, 2013).

Vários métodos estão sendo estudados para superar a resistência à drogas em pacientes com melanoma, mas existe a necessidade essencial de detectar quando o mecanismo de resistência começa a emergir para que seja possível identificar qual abordagem escolher (JAZIREHI, 2013; LIU, 2013; MAO, 2013). Essa detecção precoce tem demonstrado ser uma tarefa difícil, especialmente durante os estágios avançados de melanoma, onde há vários nichos metastáticos.

Com este objetivo, o nosso projeto de pesquisa foi concebido para criar um método para acompanhar o status do tumor através de exossomos derivados de melanoma. Como a maioria dos tipos de melanoma superexpressam MART-1, sua expressão foi analisada, assim como as proteínas de PDGFR-B e outras, em linhagens de células de melanoma resistentes e sensíveis ao PLX4032 (inibidor de BRAF V600E

mutante) para entender o potencial das proteínas associadas aos exossomos no desenvolvimento de um método de detecção de resistência adquirida.

2. METODOLOGIA

As células foram cultivadas em meio depletado de exossomos por ultracentrifugação do FBS (Soro Fetal Bovino) durante 70 min a 100.000xg e filtrado por filtração a vácuo de 0,2 micrômetros. O meio foi composto por 10% de FBS, 1% de PSF (penicilina, estreptomicina e fungicida) e RPMI. As linhagens de melanoma sensíveis (M229, M238, M249) e resistentes (M229AR, M238AR, M249AR) ao PLX 4032 (vemurafenib) foram cultivadas até 75% de confluência. As linhagens celulares resistentes foram cultivadas em 1 μ M de PLX4032. O sobrenadante foi processado para se obter os exossomos de acordo com o seguinte protocolo de centrifugação diferencial: 1500x g - 10 min, 17000x g - 15min e 160.000xg - 1 hora.

Para confirmar esse protocolo de isolamento de exossomos foi feito uma Microscopia Eletrônica de Transmissão, seguido por Citometria de Fluxo contra CD63, um marcador molecular de exossomo. Na Microscopia Eletrônica foi utilizado Grades Revestidos de Carbono Formvar, no qual foi realizada a fixação por solução de 2% de Acetato de Uranilo. Para a Citometria de Fluxo foi usado o kit da Invitrogen *Human CD63 Isolation/Detection*, seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, foram realizados Western Blots para checar o perfil de expressão diferencial das proteínas MART-1 e CAV-1 envolvidas no processo de tumorigênese do melanoma, assim como o marcador exossomal CD63 e a proteína PDGFR-B responsável por um dos processos de resistência adquirida ao tratamento por inibidor de BRAF mutado (SULLIVAN, 2013). Os anticorpos primários foram incubados *overnight* em uma diluição de 1:1000 em solução de albumina à 4°C e o anticorpos secundários foram incubados na proporção de 1:5000 em solução de Albumina durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento promoveu uma população de exossomos uniforme com tamanho entre 70-100 nm podendo ser comprovado através da Microscopia Eletrônica e pela Citometria de Fluxo anti-CD63 (Figura 1).

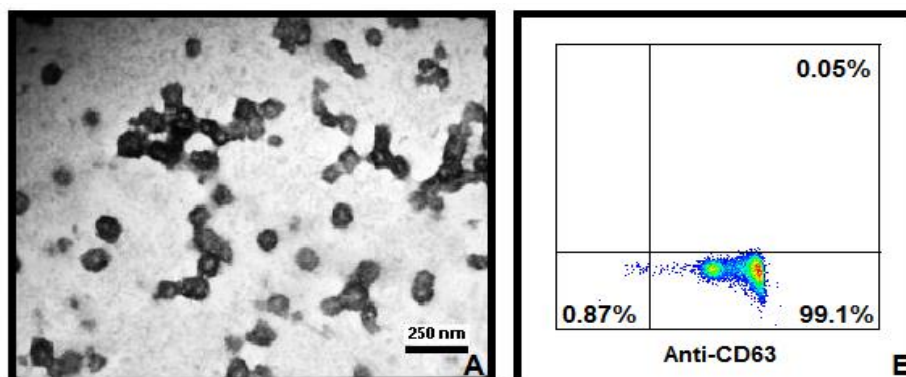


Figura 1: A) Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrando exossomos purificados. B) Citometria de Fluxo Anti-CD63 confirmando população de exossomos (99,1%).

Os resultados dos Western Blots com as linhagens celulares citadas anteriormente, comprovaram que o perfil das proteínas analisadas correspondem entre os exossomos e a célula parental (Figura 2). Dessa forma, demonstra-se que a expressão diferencial de proteínas entre as linhagens de células sensíveis e resistentes podem ser detectadas pelo perfil do exossomo como a expressão aumentada de PDGFR-B nas linhagens resistentes. Além disso, foi detectado a correspondência da expressão de CAV-1 que está aumentada na linhagem resistente, apesar de não se saber o papel da mesma no contexto da resistência adquirida ao inibidor de BRAF mutado PLX4032.

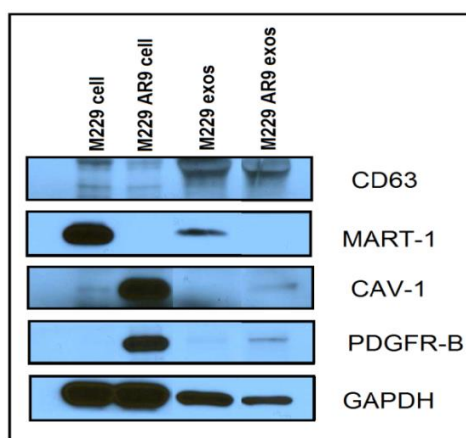


Figura 2: Western blot com os pares célula /exossomo. Foi aplicado 5ug de proteínas para as células e 15ug de exosomes .

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares com linhagens celulares mostram que os exossomos podem ser ferramentas úteis para prever o metabolismo das células durante a administração da droga PLX4032 e, em teoria, pode ser estendido para qualquer droga. Esse método pode ser aplicado para pacientes com vários sítios de metástase onde a biopsia não pode ser feita devido a localização dos mesmos.

Dessa maneira, a perspectiva de acompanhar o metabolismo das células de melanoma durante o tratamento por Inibidores de BRAF mutado através dos exossomos circulates permite identificar o prognóstico geral do paciente e devido a facilidade da coleta de sangue, esse método está apto a ser feito com a frequência desejada pelo médico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIES, H; BIGNELL, GR; COX, C; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v.417, p.949–954, 2002.

JAZIREHI, AR; ARLE, D. Epigenetic regulation of the TRAIL/Apo2L apoptotic pathway by histone deacetylase inhibitors: an attractive approach to bypass melanoma immunotherapy resistance. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v.2(1),p.55-74, 2013.

LIU, F; CAO, J; WU, J; SULLIVAN, K; et al. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133(8), p.2041-2049, 2013.

MAO, M; TIAN, F; MARIADASON, JM; TSAO, CC. Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. **Clinical Cancer Research**, v.19(3), p.657-667, 2013.

SULLIVAN, RJ; FLAHERTY, KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. **European Journal of Cancer**. 2013.

THÉRY, C; ZITVOGEL, L; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature immunology**, v.2, p.560-570, 2002.

YANG, C; ROBBINS, PD. The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis. **Clinical and Developmental Immunology**. Europa, V.2011, 2011.