

Inês Margarida Grácio Vieira

Biologia dos Exossomas e Respetivo Papel no Desenvolvimento de Metástases

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês Margarida Grácio Vieira

Biologia dos Exossomas e Respetivo Papel no Desenvolvimento de Metástases

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Margarida Grácio Vieira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010142549, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(Inês Margarida Grácio Vieira)

Dedicatória

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.*

*Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

Ricardo Reis

Agradecimentos

O percurso académico de qualquer estudante é constituído por metas e repleto de conquistas e derrotas, dúvidas e certezas. Tudo o que alcancei até hoje não seria possível sem o apoio de todos aqueles que sempre me acompanharam. Por este motivo, não posso deixar de agradecer:

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, ao seu corpo docente, direção e administração, pela oportunidade de aprendizagem que me foi facultada e por todo o apoio durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, orientador desta Monografia, pela oportunidade de desenvolver esta temática e pela ajuda prestada na sua redação.

À minha família, pela paciência e compreensão que sempre demonstraram.

Aos meus amigos, pelos conselhos sábios e pela revisão do meu trabalho.

A todos, muito obrigada!

Índice

Índice de Figuras.....	2
Abreviaturas	3
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Objetivos	5
Metodologia de Pesquisa	5
1. Introdução.....	5
2. O Cancro e a Problemática do Processo de Metastização.....	6
3. Importância das Vesículas Extracelulares	7
3.1. <i>Exossomas</i>	8
3.1.1. Estrutura.....	9
3.1.2. Biogénese dos Exossomas.....	9
3.1.3. Constituição e Papel dos Exossomas na Comunicação Intercelular entre Tumores Primários e Órgãos Distantes	12
3.1.3.1. miRNA	14
3.1.3.2. dsDNA	16
3.1.3.3. Oncoproteína MET	17
3.1.4. Influência da Hipoxia	18
4. Aplicação da Evidência Científica na Terapêutica e Diagnóstico do Cancro ..	19
5. Conclusão	23
6. Bibliografia	24

Índice de Figuras

Figura 1- Estrutura do Exossoma.....9

Figura 2- Mecanismos intracelulares de biogénese e secreção dos Exossomas 12

Figura 3- Principais fluidos biológicos onde é possível detetar miRNA dependendo da localização do tumor 13

Figura 4- Comparação da quantidade de miRNA internalizado nos Exossomas e derivado das células tumorais 21

Abreviaturas

BMBC	Célula Derivada da Médula Óssea
CAV I	Caveolina I
dsDNA	DNA dupla cadeia
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
GMB	Glioblastoma Multiforme
MBV	Corpo Multivesicular
miRNA	microRNA
MMPa	Metaloproteinase da Matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
NGS	Sequenciação de Nova Geração
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RT-PCR	Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real
VE	Vesícula Extracelular

Resumo

Tendo como objetivo principal a compilação de informação científica sobre a biologia dos Exossomas e o seu papel no processo de metastização, esta monografia apresenta dados fundamentados obtidos através da análise de revisões publicadas na base de dados *Pubmed*. Expõe-se, de forma simplificada, a problemática do cancro associada à formação de metástases, e a forma como o estudo dos Exossomas possibilitou a descoberta de um novo mecanismo de comunicação intercelular entre tumores primários e células distantes. Estas vesículas extracelulares surgem como pioneiros na criação de novos métodos de diagnóstico, prognóstico e terapêutica no doente com cancro. Através da apresentação das suas vantagens e dos estudos em fase de recrutamento percebe-se, de uma forma geral, a relevância deste tópico na comunidade científica. Os Exossomas desempenham um papel importante no desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos mais seletivos, alargando horizontes na busca da cura para o cancro.

Abstract

The main purpose of this monography is the compilation of scientific information related to Exosomes' biology and its role in the metastasis process. It presents reliable data obtained through the analysis of reviews published in Pubmed database. It also describes in a simplified way the problem of cancer, concerning the formation of metastasis and how the study of Exosomes has enabled the discovery of a new mechanism of intercellular communication between primary tumors and distant cells. These extracellular vesicles emerged as pioneers in the creation of new methods of diagnosis, prognosis and therapy in cancer patients. Through the presentation of their advantages and clinical trials in recruitment phase, we realize the relevance of this topic in the scientific community. Exosomes play an important role in the development of more selective therapeutic targets, widening horizons in search of the cure for cancer.

Objetivos

Esta monografia tem como objetivo principal compilar a informação científica publicada sobre a biogénese dos Exossomas e a sua constituição, atentando com maior profundidade nos seus diferentes meios de promover a metastização.

Como objetivo secundário, pretende-se abordar outras temáticas relacionadas com o contributo das novas descobertas científicas na terapêutica e diagnóstico do cancro.

Este trabalho terá também como fim sugerir novas questões de investigação, através da identificação de possíveis tópicos de interesse a desenvolver futuramente.

Metodologia de Pesquisa

O sistema de pesquisa bibliográfica utilizado foi, essencialmente, o *Pubmed*. Adicionalmente, foi realizada uma pesquisa na base de dados de estudos clínicos *Clinicaltrials.gov*, com o objetivo de perceber a situação atual dos estudos em desenvolvimento. Como delimitadores de resultados foram utilizados operadores booleanos e selecionadas para análise preliminar apenas revisões. As palavras utilizadas na pesquisa foram: *Exosomes, Cancer, Biogenesis, Cellular Formation* e *Metastasis*.

Foi efetuada uma primeira análise pela leitura do resumo de diversos artigos, selecionando-se aqueles que apresentaram informação relevante e adequada ao tema.

Posteriormente, realizou-se uma análise pormenorizada de cada revisão e iniciou-se a redação da monografia.

Em julho de 2015, após nova pesquisa com base no mesmo sistema, adicionou-se informação de artigos científicos recentemente publicados.

I. Introdução

Os tumores malignos são estruturas complexas que englobam, não só as células cancerígenas, como também o ambiente que as circunda. Para que o tumor primário consiga disseminar e crescer é necessário uma comunicação contínua entre as células cancerígenas e o ambiente local/distante [1, 2].

Esta interação é importantíssima no crescimento e na progressão do cancro, mas como iremos verificar terá também um papel futuro no diagnóstico, prognóstico e tratamento do doente.

Existe cada vez mais evidência associada ao papel importante que os Exossomas (um tipo de vesículas lipídicas excretadas pelas células, incluindo células tumorais) têm na formação de nichos metastáticos.

Sugere-se que os Exossomas provenientes das células cancerígenas contribuam para a comunicação entre os tumores primários e os órgãos distantes, promovendo assim a metastização [1].

Os Exossomas foram descritos por Trams *et al.* [3] através da observação de vesículas com atividade 5'nucleotidase produzidas por linhas celulares normais e antineoplásicas. No interior das vesículas de maior dimensão observaram outras, com cerca de 40 nm de diâmetro, às quais chamaram Exossomas. Publicações mais recentes revelaram que os Exossomas contêm no seu interior proteínas, microRNA (miRNA), RNA mensageiro (mRNA) e fragmentos de DNA [1, 3].

A metastização é um processo de vários estágios que possibilita a disseminação do tumor e, conseqüentemente, é uma das principais causas de mortalidade do doente com cancro [4, 5].

O sangue é considerado a principal rota de disseminação, no entanto o sistema linfático também aparenta permitir a sua ocorrência [4].

Segundo Alečković e Kang [5] existe uma grande urgência no desenvolvimento de marcadores preditivos ou de diagnóstico precoce de metastização, de modo a permitir o desenvolvimento de opções terapêuticas mais eficientes.

2. O Cancro e a Problemática do Processo de Metastização

O microambiente no qual as células cancerígenas se encontram desempenha um papel fundamental de suporte à expansão do tumor em órgãos distantes, ou seja, à formação de metástases. Este microambiente é formado devido à comunicação recíproca entre o tumor primário e as células do hospedeiro e denomina-se nicho metastático. Os nichos são responsáveis por várias atividades, como por exemplo a presença de hipoxia, e podem progredir juntamente com o processo cancerígeno [6].

A maioria dos tumores possui a capacidade de disseminar e formar metástases. A combinação desta distribuição com a resistência aos fármacos atualmente utilizados leva-nos a caracterizar o processo de metastização como sendo de difícil cura. Apesar da cascata de metastização ser bastante ineficiente, Irmisch e Huelsken [7] referem que 90% da mortalidade relacionada com o cancro se deve às metástases em órgãos vitais como os pulmões, fígado, cérebro e ossos.

É assim, facilmente perceptível a necessidade de possuir um conhecimento mais aprofundado da composição e dinâmica dos nichos metastáticos, da comunicação entre os tumores primários e os órgãos distantes, com o objetivo comum de compreender mais

claramente como surgem as metástases e quais serão os alvos mais apropriados para uma terapêutica futura [7].

Teoricamente, ao conseguir minimizar a metastização será possível reduzir a mortalidade associada ao doente com cancro.

Este trabalho irá abordar um tema presente na comunidade científica, que poderá esclarecer o mecanismo de comunicação entre as células e abrir novos horizontes para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes.

3. Importância das Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (EVs) têm sido alvo de pesquisa científica com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca da sua biologia, funcionamento e aplicação. Estas incluem microvesículas, corpos apoptóticos e os Exossomas, sendo excretadas pela maioria das células incluindo as células tumorais. A sua libertação é realizada constitutivamente ou após ativação, por exemplo pela ação de hipoxia ou *shear stress*.

Relativamente ao seu sistema de classificação, as EVs foram inicialmente classificadas com base na sua célula/tecido de origem e, mais recentemente, com base na sua origem intracelular ou mecanismo de biogénese.

São delimitadas por uma bicamada lipídica e no seu interior transportam diversas cargas, tais como: proteínas, ácidos nucleicos (DNA, mRNA, RNA de longa e curta cadeia não codificante) e lípidos.

Através da transferência do seu conteúdo molecular ou, por exemplo, através da interação direta das proteínas membranares das EVs com os recetores da célula-alvo, estas conseguem modificar o funcionamento das células e influenciar o seu genótipo.

Está comprovado que os doentes com cancro têm um maior número de EVs, facto normalmente relacionado com um mau prognóstico.

Estas vesículas podem ser isoladas a partir de vários fluidos corporais como o sangue, a linfa, urina, saliva, fluido cérebroespinal e ascites.

No interior de vesículas derivadas de tumores foram identificadas proteínas e RNA conhecidos pelo seu papel no desenvolvimento e progressão do cancro.

Estas possuem a capacidade de penetrar nas células do microambiente do tumor ou de locais distantes específicos (quer por fusão de membranas ou pela via endocítica/fagocítica) e, como referido em cima, transferem o seu conteúdo, sendo reconhecidas como peças chave em vários processos celulares associados à patogénese do cancro (imunossupressão, angiogénese, formação de nichos metastáticos e metastização) [8].

Embora neste caso o foco seja as EVs derivadas dos tumores, não nos podemos esquecer que estas são também excretadas por células do estroma indiciadas como peças importantes na regulação do comportamento tumoral.

Segundo Vader *et al.*[8] uma das características mais notáveis das vesículas com origem tumoral é o seu potencial na formação do nicho pré-metastático, que precede o processo de metastização.

Para além dos processos já referenciados, nos quais as EVs desempenham uma função específica, pensa-se que estas contribuam para o desenvolvimento de estratégias defensivas avançadas que permitem ao tumor escapar ao sistema imunitário.

A importância da sinalização mediada por estas vesículas classifica-as como alvo de uma terapêutica futura, focada na inibição de um componente chave na rede de comunicação tumoral. A terapêutica pode ser desenhada de modo a interferir com diversas etapas quer seja a biogénese/libertação das EVs, a sua presença na circulação ou a sua incorporação nas células.

Adicionalmente, estas podem também ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, em detrimento de outras técnicas mais invasivas como a biópsia [8].

3.1. Exossomas

A descoberta das EVs libertadas pelas células tumorais foi realizada há mais de 40 anos atrás. Nos últimos anos tem-se assistido a um maior interesse científico por este tema, tendo sido criada em 2012 a *International Society for Extracellular Vesicles* e a *American Society for Exosomes and Microvesicles* [2, 9].

Devido ao aumento do número de estudos associados à identificação e caracterização do conteúdo das EVs, foram também criadas bases de dados onde podemos encontrar registo da constituição molecular presente nas diferentes classes em que este grupo se divide. Dessas bases de dados destaco a *Vesiclepedia* e a *EVpedia* [10, 11].

Kowal *et al.* [2] referem que nos anos 80 foram descritas pequenas vesículas formadas no interior de um endossoma intracelular, levando posteriormente à formação de um corpo multivesicular (MVB). Foi em 1987 que a palavra “Exossoma” foi proposta para denominar estas vesículas com origem endossomal.

Os Exossomas são assim um subtipo de vesículas excretadas pelas células, acreditando-se que estes se subdividem entre si.

3.1.1. Estrutura

Os Exossomas são pequenas vesículas com um tamanho compreendido entre os 40 a 100 nm. Possuem uma bicamada lipídica a circundar um pequeno citosol, sem organelos celulares.

No seu interior podemos encontrar proteínas e ácidos nucleicos provenientes das células que lhes dão origem. Apesar desta variedade de constituintes os Exossomas possuem ainda um conjunto de proteínas conservadas.

Relativamente ao seu conteúdo em lípidos, estes não tem apenas uma função ao nível da estrutura, contribuindo também para a comunicação entre células distantes [12].

A própria composição lipídica destas estruturas ajuda a perceber um pouco mais acerca do processo de formação e libertação a partir das células. Os Exossomas são ricos em colesterol, esfingomiéline, ceramida e fosfatidilserina (Figura 1). As moléculas de esfingomiéline e de colesterol, juntamente com algumas proteínas exossomais, são ainda enriquecidas com subdomínios resistentes a detergente típicos da membrana plasmáticas e que se denominam de *rafts* lipídicos. Este é um dos fundamentos da teoria de libertação exossomal através do processo de exocitose [2].

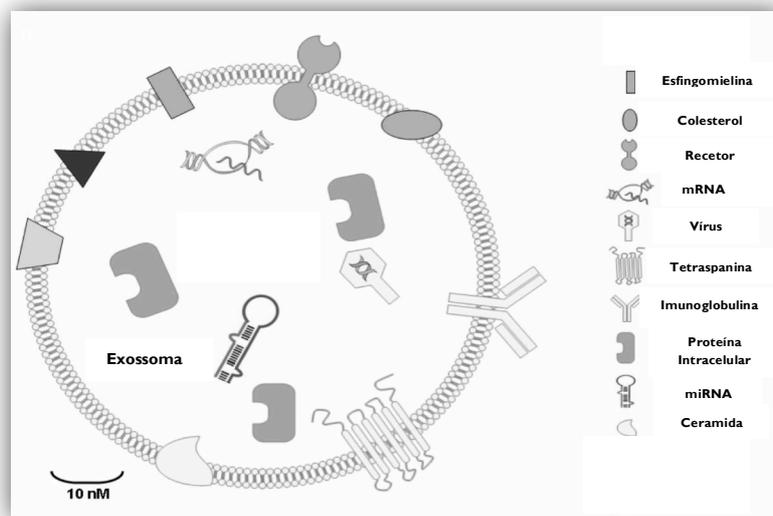


Figura 1- Estrutura do Exossoma.

(adaptado de Azmi et al., 2013)

3.1.2. Biogénese dos Exossomas

O mecanismo de biogénese dos Exossomas foi inicialmente observado por dois grupos que estudavam a maturação de reticulócitos. A secreção das EVs foi então descrita como um procedimento complexo, com início na formação de um MBV, posterior fusão com a membrana plasmática e término na libertação das vesículas para o ambiente extracelular [2].

A biogénese é referida por Azmi *et al.* [12] como um processo altamente regulado, com base numa sequência de sinalizações originada pela ativação de um recetor característico de cada célula.

Os Exossomas são inicialmente vesículas intraluminais no interior de um MBV, sendo formados por endocitose a partir da membrana limitante deste último [2]. Desta mesma forma, as moléculas de RNA do citoplasma da célula e as proteínas funcionais sofrem encapsulação [1].

Estão descritos vários mecanismos que desencadeiam a biogénese, envolvendo a maquinaria ESCRT, os lípidos e as tetraspaninas, não sendo conhecido se estes atuam simultaneamente no mesmo MBV [2].

O mecanismo com um maior número de referências é o complexo ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*), cujo modo de ação se baseia no reconhecimento de membranas com ubiquitinas e consequente internalização no endossoma multivesicular [1].

A maquinaria ESCRT é constituída por 4 complexos associados a proteínas: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III.

Através da realização de estudos foi evidenciado o impacto da regulação do complexo ESCRT na maior/menor secreção dos Exossomas. Kowal *et al.* [2] exemplificam, referindo que a inibição de componentes do complexo ESCRT-0 resulta num decréscimo da secreção destas nanovesículas. De referir ainda o aumento da fusão das vesículas no lúmen endossomal por ação da proteína ALIX associada ao domínio ESCRT-III.

No que diz respeito ao papel das proteínas acessórias, a proteína VPS4 ATPase é mencionada como sendo a de maior interesse. Esta está envolvida na fase final da formação das vesículas intraluminais, promovendo a cisão de membranas e/ou dissociação do complexo ESCRT-III. No entanto, os dados provenientes dos estudos realizados são contraditórios e este ponto deverá ser alvo de maior investigação [2].

A caracterização mais aprofundada deste mecanismo de biogénese é preponderante se tivermos em conta a possibilidade de diminuindo a maquinaria ESCRT, inibir a secreção dos Exossomas e, consequentemente, diminuir a comunicação do tumor primário com os órgãos distantes.

Infelizmente, esta proposta de investigação encontra alguns obstáculos, visto que algumas destas proteínas são utilizadas em processos essenciais para as células do organismo, como por exemplo na reparação de membranas e na citocinese.

Como referido anteriormente, existem ainda mecanismos de biogénese envolvendo constituintes independentes do complexo ESCRT, nomeadamente os lípidos e as tetraspaninas.

Num estudo realizado em células oligodendrogliais, após inibição da maquinaria ESCRT, observou-se que um bloqueio da esfingomielinase conduzia a uma deficiente biogénese da ceramida (constituente lipídico), com posterior diminuição da secreção dos Exossomas. Este artigo foi publicado em 2008, tendo sido o primeiro a descrever uma forma de biogénese dos Exossomas que requiere o esfingolípido ceramida.

Nessas mesmas células verificou-se, concomitantemente, que um aumento da acumulação de colesterol nos MBVs tardios leva a uma potenciação da libertação destas vesículas.

Todos estes dados corroboram a influência dos componentes lipídicos na biogénese, não esquecendo as tetraspaninas, recentemente sugeridas como intervenientes na seleção de cargas a internalizar nos Exossomas.

Após a formação das vesículas no interior do MBV segue-se o processo de libertação do seu conteúdo para o meio extracelular.

Nos últimos anos têm sido realizados esforços, de modo a compreender os mecanismos que promovem a fusão da membrana limitante dos MBVs com a membrana plasmática da célula.

Inseridas nesta temática surgem com especial destaque uma família de proteínas com atividade GTPase, denominadas RAB, sendo de destacar a RAB27A e a RAB27B. Segundo Kowal *et al.* [2], estas proteínas controlam vários passos do tráfico intracelular das vesículas, incluindo o posicionamento do MBV junto da membrana plasmática, de modo a potenciar a fusão de membranas.

Foram alvo de identificação várias proteínas RAB no decorrer dos estudos desenvolvidos, onde o silenciamento com recurso a uma sonda de RNA levou a uma inibição da secreção dos Exossomas.

Com base nos diferentes dados obtidos nos estudos efetuados, sugere-se que determinadas proteínas RAB estejam envolvidas na secreção de vesículas específicas, dentro de uma mesma célula. Temos como exemplo o facto das proteínas RAB11 e RAB35 estarem associadas aos endossomas precoces e a RAB27A e RAB27B aos endossomas tardios [2].

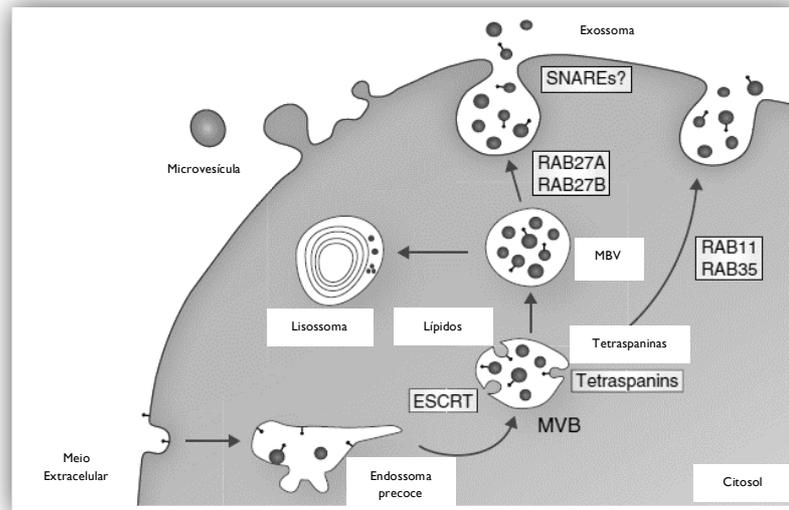


Figura 2- Mecanismos intracelulares de biogênese e secreção dos Exossomas.

(adaptado de Kowal et al., 2014)

Kahlert e Kalluri [1] referem ainda, que a secreção de Exossomas de origem tumoral pode ser desencadeada pela presença de hipoxia, tópico que será desenvolvido posteriormente.

Como podemos ver na Figura 2, nem todos os MBVs libertam a sua carga para o meio extracelular. Alguns degradam-se por fusão com os lisossomas, sugerindo-se que uma grande concentração de lípidos da família das ceramidas proteja os MBVs da digestão lisossomal [13].

Embora este seja um tema relevante na comunidade científica, ficam por esclarecer tópicos relacionados, não só com a importância da libertação destas vesículas *in vivo*, mas também com o mecanismo de fusão do MBV com a membrana plasmática [2].

3.1.3. Constituição e Papel dos Exossomas na Comunicação Intercelular entre Tumores Primários e Órgãos Distantes

O primeiro papel atribuído aos Exossomas estava associado à remoção de proteínas desnecessárias à célula. Atualmente, sabe-se que estes constituem uma peça-chave na comunicação intercelular.

Quando são libertados para o meio extracelular as vesículas podem ser capturadas pelas células vizinhas, por células distantes ou ainda permanecer em circulação e ser captadas por diferentes tecidos [14].

Como referido anteriormente, sugere-se que os Exossomas desempenham um papel na comunicação entre os tumores primários e células distantes (fibroblastos, células

inflamatórias e endoteliais), promovendo a angiogénese, a aderência e a proliferação tumoral, pela criação de um ambiente extracelular propício ao desenvolvimento de um nicho pré-metastático.

O tipo de carga internalizada nestas vesículas, quer seja DNA, RNA ou proteínas, vai estar diretamente associada ao seu potencial metastático, de proliferação tumoral e resistência a fármacos [15]. Ao transportarem constituintes de origem tumoral, como por exemplo sequências de miRNA, irão modificar a expressão genética das células normais, passando estas a expressar características das células cancerígenas iniciais.

É cada vez mais notório o interesse no estudo dos ácidos nucleicos (DNA, mRNA e miRNA) como mediadores do processo de metastização. Estes encontram-se presentes em vários fluidos corporais (Figura 3), representando uma nova abordagem para métodos de diagnóstico não invasivos, mais rápidos, sensíveis e precisos. A gestão dos seus níveis no organismo poderá também informar o clínico acerca da evolução do processo tumoral e caracterizar a resposta ao tratamento. O maior conhecimento deste tópico trará novos alvos terapêuticos para uma patologia complexa e de difícil cura [5].

Para melhor entender a forma como os constituintes se relacionam com a progressão do cancro, segue-se uma abordagem mais aprofundada a três exemplos descritos em estudos.

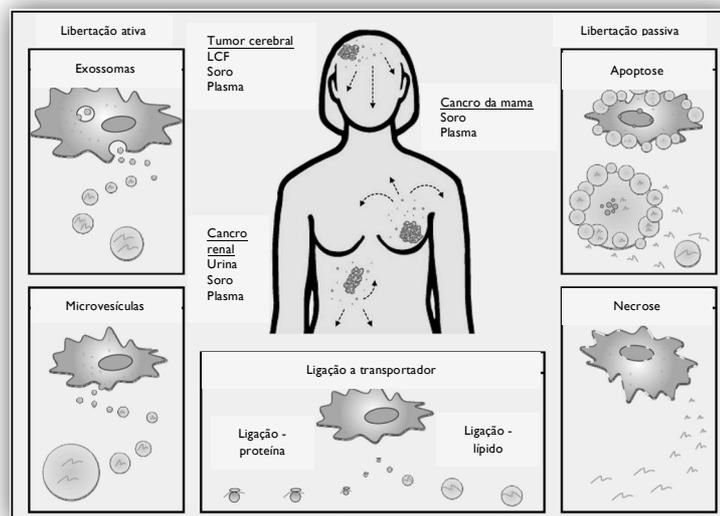


Figura 3- Principais fluidos biológicos onde é possível detetar miRNA dependendo da localização do tumor.

(adaptado de Alečković e Kang, 2014)

3.1.3.1. miRNA

Os miRNAs são pequenas sequências de RNA não codificante com cerca de 18 a 24 nucleótidos. São sintetizados através das endonucleases Drosha e Dicer, controlando a expressão dos genes após a transcrição [16].

O miRNA primário forma-se pela ação da RNA Polimerase II na transcrição de genes específicos. Este é posteriormente clivado por um complexo formado entre a enzima RNA III Drosha e a proteína Pasha, resultando um precursor do miRNA (pre-miRNA). Segue-se a saída do núcleo através da Exportina-5, dependendo da presença do cofator Ran-GTP. No citoplasma, a enzima RNA III Dicer em associação com o TRBP, cliva o pre-miRNA. Nesta fase da biogénese do miRNA este possui uma dupla cadeia, sendo que uma destas se irá degradar enquanto a outra associar-se-á ao complexo RISC (*RNA Induced Silencing Complex*).

A extremidade 5' da cadeia madura do miRNA possui uma sequência complementar direcionada para estabelecer ligação com o mRNA alvo. Quando estas sequências combinam de forma perfeita a proteína Argonauta-GWI82 cliva o mRNA. No entanto, a ligação é, na sua maioria, imperfeita. Nestes casos o miRNA irá atuar reprimindo a tradução em proteínas [5].

Resumindo, o seu mecanismo de ação baseia-se na conjugação com o complexo RISC e posterior estabelecimento de ligações fracas com o terminal 3-UTR do mRNA alvo. Consequentemente, ocorrerá uma desregulação da expressão do mRNA afetado, através de uma combinação da inibição da translação, da destabilização do RNA ou diretamente por rutura [12, 16].

Uma única cadeia de miRNA pode exercer este controlo numa célula, em células adjacentes ou ainda influenciar a expressão génica de uma célula distante, uma característica decisiva para a progressão metastática das células cancerígenas [5]. Inicialmente pensava-se que este tipo de RNA era exportado por transporte ativo. No entanto, hoje sabe-se que a sua excreção é também realizada através dos Exossomas e outras vesículas [12]. Azmi *et al.* [12] destacam que a maioria do miRNA presente na saliva se encontra concentrado nestas EVs.

Tal como para os Exossomas, existem também bases de dados com registo das sequências de miRNA atualmente identificadas, como é o caso da *miRandola* [17] e da *miRBase* [18]. Alečković e Kang [5] referem que o miRNA é normalmente detetado recorrendo a microarrays ou RT-PCR. Adicionalmente, tem ganho popularidade uma tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) que permite, não apenas identificar

pequenos miRNAs, como também quantificá-los com precisão e diferenciar a sua expressão dentro de uma gama variada.

O recrutamento destas sequências para os MBVs ainda não é perfeitamente conhecido, no entanto, pensa-se que a associação do complexo RISC com componentes da maquinaria ESCRT facilita este processo.

O mecanismo de *uptake* por parte de outras células também necessita de clarificação. As vesículas são captadas pelas células por fusão de membranas ou endocitose, sugerindo-se o envolvimento das proteínas transmembranares. Acredita-se que o *uptake* de miRNA, associado a lípidos, nomeadamente a HDL, evita a degradação lisossomal no interior da célula [5].

Melo *et al.* [16] referem, nos resultados do estudo citado, que os Exossomas derivados de células cancerígenas metastáticas têm uma maior concentração de miRNA, comparativamente aos derivados de células não metastáticas. Neste mesmo estudo foram detetadas as proteínas Dicer, AGO2 e TRBP nos Exossomas de origem cancerígena, estando estas em falta nas vesículas provenientes de células normais. Recentemente, têm-se ainda especulado acerca do papel das proteínas da membrana plasmática, como a CD43, sugerindo-se que precipita com a Dicer e está envolvida no transporte para o interior das vesículas. Esta encontra-se sobreexpressa em células cancerígenas, ao contrário do que se verifica em células epiteliais normais [16].

No que diz respeito ao papel desempenhado pelo miRNA na carcinogénese e metastização, este pode assumir duas vertentes: como *oncomir* ou como supressor tumoral. Estas sequências de nucleótidos são específicas de determinados tecidos e tumores, ou seja, um mesmo miRNA poderá diminuir a progressão de um tumor e contribuir para o crescimento de outro. Os miRNAs demonstraram influência em diferentes fases do processo de metastização, contribuindo para a adesão, invasão, migração e modificação do epitélio mesenquimal e da matriz extracelular.

Atenta-se agora com maior ênfase no *oncomir* miR-21, estando este aumentado em vários processos cancerígenos: cancro da mama, colón, pâncreas, próstata, fígado, tiroide, ovários e na leucemia linfocítica crónica. O miR-21 foi de facto o primeiro miRNA detetado em circulação. Este promove a motilidade e invasão por parte das células, atuando nos inibidores do recetor para o fator pro-metastático, ficando este livre para estabelecer ligação. A potenciação da metastização ocorre, não só pelo aumento da migração das células, como também pelo aumento indireto das metaloproteinases promotoras de metástases. Secundariamente, este miR-21 promove o crescimento tumoral e suprime a apoptose. Para

além de a sua presença conseguir diferenciar doentes com metástases de doentes com massas malignas localizadas, em grande quantidade é característica de um mau prognóstico para o doente. Este *oncomir* especificamente é, então, indicado como um bom biomarcador para diagnóstico e caracterização da resposta à terapêutica.

O miR-10 é um outro promotor da metastização, embora só seja detetado num estágio tardio da génese tumoral, não se relacionando com o crescimento do tumor primário.

Como exemplos de miRNAs com atividade supressora referem-se o miR-335 e o miR-126, cuja presença numa linha celular de cancro da mama diminuiu as metástases presentes nos pulmões e nos ossos.

Tendo em conta que existe uma grande lacuna de marcadores exclusivos e sensíveis direcionados para o prognóstico, diagnóstico e caracterização do processo de formação de metástases, é de fácil compreensão o importante papel que biomarcadores tão específicos e estáveis como os miRNAs poderão assumir [5].

3.1.3.2. dsDNA

Como referido anteriormente, os Exossomas podem internalizar outros ácidos nucleicos, por exemplo o DNA.

Num estudo realizado em células pancreáticas cancerígenas e no soro de doentes com adenocarcinoma pancreático, foi observada a presença de grandes fragmentos de DNA de dupla cadeia (dsDNA), associados a mutações relevantes para um futuro prognóstico e tratamento do cancro. De modo a garantir que os resultados eram os mais fiáveis, foram eliminadas quaisquer hipóteses de contaminação com DNA exterior aos Exossomas e com RNA que se encontrasse concomitantemente no seu interior.

Sabendo *a priori* que os genes KRAS e p53 são os mais vulgarmente mutados nestes processos tumorais, foi investigada e confirmada a presença destas mutações no DNA exossomal. Kahlert *et al.* [19] referem ainda, que em dois estudos anteriores já tinha sido evidenciada a presença de DNA mitocondrial e DNA de cadeia simples nestas EVs [19].

Desde que foi descoberto o gene p53 tem sido extensamente estudado no âmbito da investigação do cancro [20]. O p53 é um gene supressor de tumores que desempenha um papel crítico na progressão maligna, sendo que na maior parte dos processos cancerígenos este gene apresenta uma perda de função associada, por exemplo, à ocorrência de mutações [21].

Com esta investigação surge a evidência da integração de DNA mutado nos Exossomas, sugerindo-se a função importante que este poderá assumir na identificação de indivíduos com predisposição genética para determinadas patologias cancerígenas. Poderá ainda efetuar-se uma otimização da terapêutica, tendo em vista um tratamento personalizado e individual [19].

3.1.3.3. Oncoproteína MET

Existe um consenso acerca da função dos Exossomas como transportadores de proteínas para o meio extracelular, estando estas, possivelmente, relacionadas com a formação do nicho metastático. Segundo Azmi *et al.* [12], a cada semana, uma nova proteína é adicionada à lista de moléculas transportadas por intermédio destas EVs [12].

De modo a compreender a influência da oncoproteína MET, Peinado *et al.* [22] exploraram a capacidade que os Exossomas derivados do melanoma tinham no crescimento do tumor primário e metástases.

Encontra-se estabelecido o papel crucial que as células com origem na medula óssea (BMDCs) desempenham na formação do nicho pré-metastático. Ao modificar permanentemente estas células, através do recetor MET, verificou-se efetivamente um aumento do potencial metastático do tumor primário [22].

O recetor MET foi descoberto em 1984, tendo sido alvo de investigação exaustiva nas últimas décadas. Existe evidência do aumento da sua expressão em vários processos cancerígenos, como por exemplo no cancro renal e gástrico. O seu ligando desempenha, não só um papel no desenvolvimento do tumor, como também na resistência aos fármacos utilizados na terapêutica [23].

Foi inicialmente realizada uma análise da concentração de proteínas exossomais em doentes de diferentes estádios de progressão do melanoma, verificando-se uma maior quantidade nos processos cancerígenos mais avançados.

Através da comparação do perfil proteico de Exossomas de linhas tumorais não metastáticas vs. linhas celulares de melanoma altamente maligno identificou-se as proteínas presentes numa maior quantidade, destacando-se a oncoproteína MET.

Esta proteína promove a migração, invasão, angiogénese e mobilização das células da medula óssea. Peinado *et al.* [20] sugerem a possibilidade dos Exossomas transferirem horizontalmente a proteína MET para as BMDCs, estabelecendo um novo mecanismo de metastização.

Comprovou-se também que a expressão desta proteína está associada ao aumento de metástases e dos precursores das células vasculares e hematopoiéticas.

Quantificando a sua expressão poderá ser criado um marcador que identifique doentes em fase de progressão do cancro, como é o caso do processo de metastização [22].

A interação proteína-recetor constitui também um interessante alvo terapêutico. Com a sua inibição, recorrendo por exemplo a anticorpos bloqueadores, conseguiríamos travar o processo de crescimento tumoral mediado por este complexo [23].

3.1.4. Influência da Hipoxia

Um dos principais temas alvo da investigação científica na área do cancro está relacionado com o estudo do microambiente que rodeia o tumor, e qual a importância da sua dinâmica na comunicação intercelular e progressão tumoral [24].

A hipoxia (baixo nível de oxigénio) surge como um componente essencial para o desenvolvimento e sustento do tumor, contribuindo para a agressividade do cancro [12, 24].

Ao ser induzida pelo tumor desencadeia mecanismos que modificam as células adjacentes, expressando marcadores característicos de mau prognóstico para o doente, sendo possivelmente uma das causas da resistência à radio e quimioterapia.

Estes mecanismos consistem na libertação de citocinas, fatores de crescimento e proteases que, conseqüentemente induzem o processo de angiogénese e alterações na matriz extracelular [24].

Vários estudos evidenciaram que a hipoxia promove a secreção de Exossomas em diferentes processos cancerígenos [12].

Num estudo realizado com recurso a células de glioblastoma multiforme (GBM), um tumor cerebral caracterizado pelos baixos níveis de oxigénio, foi investigado o potencial papel destas vesículas nos mecanismos de sinalização dependentes da hipoxia.

De modo a comprovar esta relação, foi efetuada uma pesquisa de proteínas associadas ao estado de hipoxia, tendo sido detetado nos Exossomas quantidades significativas de metaloproteinase da matriz 9 (MMPa), pentraxina 3, IL8, caveolina I (CAVI), entre outras.

Foi também verificado, que as EVs em ambiente com baixos níveis de oxigénio evidenciavam uma resposta diminuta ao estado de hipoxia, como é o caso dos mecanismos de replicação de DNA e fosforilação oxidativa.

Para além desta diminuição, os Exossomas provenientes desta linha celular desempenham também um papel pro-angiogénico, atuando nos recetores das células

endoteliais e, conseqüentemente, desencadeando um efeito indutor da sua proliferação e sobrevivência.

Para comprovar que os conhecimentos descritos nas primeiras fases de testes *in vitro* se mantinham na experiência *in vivo*, foi utilizado um ratinho com GBM como modelo animal. Verificou-se que os Exossomas em estados de hipoxia aceleram a expansão tumoral numa fase avançada, quase triplicando o seu tamanho, dados que corroboram a teoria do aumento da vascularização proposta em cima [24].

Outra consequência da hipoxia consiste na baixa dos níveis de pH do ambiente que rodeia o tumor, especulando-se a sua influência no tráfico das EVs, visto que a sua libertação e *uptake* se encontram aumentados em meios ácidos [8].

Segundo Kucharzewska *et al.* [24] a terapêutica contra este sistema deve ter como alvo os mecanismos gerais de comunicação entre as células, como por exemplo o *uptake* dos Exossomas por parte das células recetoras e a sua formação.

Embora já se possuísse conhecimento acerca de marcadores de hipoxia, a sua heterogeneidade tornava o seu uso limitado. Com este estudo, Kucharzewska *et al.* [24] sugerem a possibilidade da utilização da assinatura exossomal em proteínas associadas aos baixos níveis de oxigénio no diagnóstico deste tipo de tumor cerebral [24].

4. Aplicação da Evidência Científica na Terapêutica e Diagnóstico do Cancro

Após descrição da estrutura, biogénese e composição dos Exossomas, atenta-se agora na sua aplicação direta na prática clínica.

Ao integrarem no seu interior elementos das células tumorais, como ácidos nucleicos e proteínas, estas vesículas expressam assinaturas distintas para diferentes tipos de processo cancerígeno, possibilitando o seu prognóstico, diagnóstico e terapêutica.

A futura utilização dos Exossomas assenta, primariamente, na capacidade destes serem isolados e classificados, contando com a sua grande estabilidade em circulação. Kahlert e Kalluri [1] salientam a capacidade de resistência destas nanovesículas a 4°C durante um período de 96h, ou em longos períodos quando armazenadas a uma temperatura de -70°C.

Ao realizarmos a colheita de um fluido biológico de fácil acesso, como é o caso do sangue, conseguimos adotar métodos de diagnóstico menos invasivos, mais sensíveis, rápidos e seguros para o doente.

Os ácidos nucleicos destacam-se dos restantes constituintes dos Exossomas, pela extensa investigação associada ao seu potencial no diagnóstico precoce e à sua constituição como alvos da terapêutica.

Tendo em conta as desigualdades entre os diferentes materiais genéticos, salienta-se o papel que os miRNAs podem assumir nesta temática. Estes apresentam seqüências de nucleótidos simples, com métodos de deteção e amplificação bem estudados e regiões conservadas entre o ser humano e outros modelos animais, permitindo estabelecer comparações plausíveis em ensaios.

A teoria aplicada nesta temática segue as mesmas linhas de raciocínio já estudadas na terapia cancerígena. Refiro o caso do fármaco Herceptin, utilizado no tratamento no cancro da mama e gástrico, cujos resultados dos primeiros ensaios clínicos foram bastante contraditórios. Só após análise da questão se percebeu que apenas uma minoria das pessoas envolvidas apresentava uma sobreexpressão do recetor HER2, onde este efetivamente atuava.

Tem então, toda a lógica conhecer primeiramente a assinatura do processo cancerígeno, para escolher a terapia que melhor se adapta a cada doente [5].

No que diz respeito a exemplos práticos de miRNAs como alvos da terapia, existem várias abordagens com o objetivo comum de aniquilar *oncomirs*, como o miR-21 e o miR-10b descritos anteriormente. Enumera-se a utilização de seqüências silenciadoras de RNA, oligonucleótidos *anti-sense* e moléculas inibidoras, entre outros.

Alečković e Kang [5] referem o sucesso do uso, *in vivo* e *in vitro*, de oligonucleótidos tendo como alvo o *oncomir* miR-21 num modelo de cancro da mama.

Este é um tema complexo com duas perspetivas distintas. Se primeiro se evidencia terapêuticas com o objetivo de silenciar a expressão do material genético presente nos Exossomas, por outro lado, estuda-se a possibilidade destas nanovesículas assumirem um papel de transportadores de agentes de tratamento, de modo a os introduzirem especificamente nas células cancerígenas.

Os miRNAs poderão também desempenhar um importante papel ao nível do diagnóstico e caracterização do processo tumoral, na medida em que apresentam grande estabilidade e a sua expressão é facilmente quantificável.

Descreve-se agora um exemplo de um estudo realizado em doentes com cancro no ovário, onde foi investigada a potencial utilização do miRNA como biomarcador de diagnóstico [25].

Taylor e Gercel-Taylor [25] referem-se ao cancro do ovário como o sexto tipo de tumor mais comum em mulheres, sendo comumente diagnosticado em estágios avançados. Considerando que as hipóteses de sobrevivência são elevadas em doentes tratados numa

fase inicial, o objetivo seria encontrar um método analítico que possibilitasse um diagnóstico precoce.

Demonstrou-se que os miRNAs detetados conseguiriam fazer a distinção entre células normais e células cancerígenas provenientes do processo tumoral do ovário, embora não conseguissem diferenciar os diferentes estágios da doença.

Evidenciou-se também que a quantidade de miRNA presente nos Exossomas em circulação era igual ou superior à que se encontrava nas células tumorais. Esta correlação é de facto um dado importante, na medida em que a análise do miRNA isolado necessita da realização de biópsia dos tecidos e o mesmo não se verifica com a quantificação das sequências presentes nos Exossomas (Figura 4).

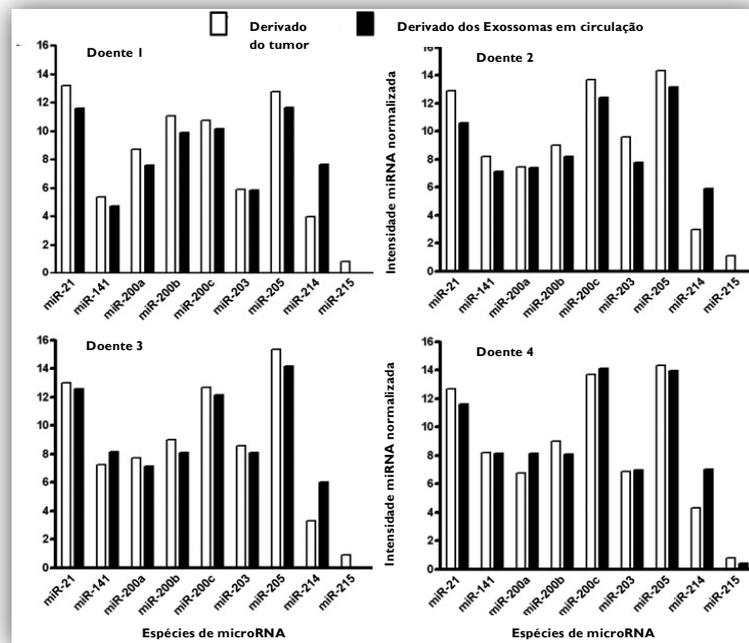


Figura 4- Comparação da quantidade de miRNA internalizado nos Exossomas e derivado das células tumorais.

(adaptado de Taylor e Gerce-Taylor, 2008)

A análise do miRNA internalizado nestas EVs poderá, deste modo, constituir um adequado método de diagnóstico para este tipo de cancro.

Na biogénese fez-se referência ao processo de formação e secreção dos Exossomas, podendo este último constituir um potencial alvo da terapêutica. No entanto, é importante lembrar que estas vesículas lipídicas não são libertadas apenas por células cancerígenas, como também por células normais. O objetivo será definir um marcador específico da secreção exossomal das células cancerígenas e inibi-lo. Foi evidenciado num modelo animal, que diminuindo a expressão da proteína RAB27A, conseguimos inibir de forma impressionante as metástases pulmonares num caso de melanoma.

Considerando ainda a influência dos Exossomas na metastização, tem toda a lógica sugerir-se a retirada destas nanovesículas da circulação, suprimindo conseqüentemente a progressão tumoral. Existe de facto uma proposta de desenvolvimento de um dispositivo que consegue remover os Exossomas através de filtração sanguínea [25].

De modo a perceber a realidade da investigação científica a decorrer dentro deste tema, efetuou-se uma pesquisa com o termo *Exosome* na base de dados *Clinicaltrial.gov*. De seguida apresenta-se um resumo dos ensaios clínicos mais interessantes, estando a sua maioria em fase de recrutamento.

No estudo *Molecular Mechanisms Implicated in the Pathogenesis of Melanoma. Role of Exosomes* pretende-se estudar qual a influência dos Exossomas produzidos nas células de melanoma, no seu desenvolvimento e progressão. Têm-se também como objetivo determinar qual o efeito do fármaco vemurafenib nas nanovesículas de doentes em fase metastática avançada. Este é um ensaio *in vitro* e *in vivo*, realizado em linhas celulares e modelos animais, que poderá contribuir para o fundamento da teoria do envolvimento destas vesículas lipídicas na resistência a fármacos e recaídas [26].

No que diz respeito à utilização do miRNA exossomal como biomarcador de diagnóstico, surge o estudo *Evaluation of MicroRNA Expression in Blood and Cytology for Detecting Barrett's Esophagus and Associated Neoplasia*. Este ensaio centra-se na possibilidade de diagnosticar o Esófago de Barret com recurso ao miRNA, evitando a progressão para um estágio avançado de cancro [27].

Refere-se ainda outros dois estudos em fase de recrutamento. No primeiro propõe-se isolar e quantificar os Exossomas em doentes com cancro pancreático e em indivíduos saudáveis, de modo a definir quais os valores destas EVs considerados normais [28]. Podemos encontrar uma abordagem diferente no ensaio clínico *Ability of Plant Exosomes to Deliver Curcumin to Normal and Colon Cancer Tissue*, onde se sugere a utilização destas nanovesículas como veículos transportadores de curcumina, tendo como objetivo aumentar a sua estabilidade e biodisponibilidade [29].

5. Conclusão

A temática do cancro e da metastização é, e continuará a ser, tópico de destaque na comunidade científica. Este é, sem dúvida, um campo em que se investe capitais avultados ao nível de investigação científica, com o objetivo de revelar mais sobre a biologia do cancro e desenvolver novos fármacos antitumorais.

O objetivo principal desta monografia foi conseguido fazendo-se referência à estrutura, biogénese e relevância dos Exossomas. Enfatizou-se o seu papel na comunicação intercelular entre os tumores primários e as células distantes, transportando derivados destes e potenciando, conseqüentemente, o crescimento do tumor e a sua disseminação.

Salientou-se principalmente o potencial dos miRNAs na formação de metástases, sendo estas sequências, na minha opinião, um dos componentes com uma maior influência no crescimento cancerígeno. A sua utilização no diagnóstico, prognóstico e terapêutica vem abrir novos horizontes de investigação nesta patologia.

Consegui perceber grande parte do avanço realizado nesta área, no entanto, é importante lembrar algumas limitações que podem constituir novas questões de investigação e barreiras a serem ultrapassadas.

Uma dessas limitações está associada à dificuldade de conseguir encontrar um método que consiga isolar e caracterizar os diferentes subtipos de Exossomas de uma forma fiável [2]. Adicionalmente, não se encontra perfeitamente esclarecido qual o mecanismo de secreção e *uptake* destas vesículas lipídicas, ou ainda, o que leva os MBVs a fundirem com a membrana plasmática ou com os lisossomas.

O mundo da ciência caminha de encontro às terapêuticas personalizadas para cada doente baseando-se, principalmente, no conhecimento do seu genótipo. Estas EVs surgem assim, como uma oportunidade de explorar tratamentos mais específicos e menos agressivos para as células normais. Algo de extrema importância, porque lidamos com indivíduos, por si só, bastante fragilizados.

Com esta monografia fez-se referência, não só à função que os Exossomas desempenham em todo o circuito de comunicação tumoral, como também ao seu potencial uso na remissão do cancro.

“Exosomes are small particles with big functions...” [10]

6. Bibliografia

- [1] KAHLERT, C.; KALLURI, R. - **Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis.** J Mol Med (Berl). vol. 91 (2013), 431-7.
- [2] KOWAL, J.; TKACH, M.; THÉRY, C. - **Biogenesis and secretion of exosomes.** Curr Opin Cell Biol. vol. 29 (2014), 116-25.
- [3] TRAMS, E. G.; LAUTER, C. J.; SALEM, N.; HEINE, U. - **Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles.** Biochim Biophys Acta. vol. 645 (1981), 63-70.
- [4] JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. - **Microenvironmental regulation of metastasis.** Nat Rev Cancer. vol. 9 (2009), 239-52.
- [5] ALEČKOVIĆ, M.; KANG Y. - **Regulation of cancer metastasis by cell-free miRNAs.** Biochim Biophys Acta. vol. 1855 (2014), 24-42.
- [6] DESCOT, A.; OSKARSSON T. - **The molecular composition of the metastatic niche.** Exp Cell Res. vol. 319 (2013), 1679-86.
- [7] IRMISCH, A.; HUELSKEN, J. - **Metastasis: New insights into organ-specific extravasation and metastatic niches.** Exp Cell Res. vol. 319 (2013), 1604-10.
- [8] VADER, P.; BREAKEFIELD, X. O.; WOOD, M. J. - **Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy.** Trends Mol Med. vol. 20 (2014), 385-93.
- [9] **American Society for Exosomes and Microvesicles.** [Acedido a 4 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.asemv.org/about-us.html>
- [10] **Vesiclepedia: Home - Extracellular vesicles database.** [Acedido a 15 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.microvesicles.org/>
- [11] **EVpedia - Extracellular vesicle database.** [Acedido a 15 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: http://student4.postech.ac.kr/evpedia2_xe/xe/
- [12] AZMI, A. S.; BAO, B.; SARKAR, F. H. - **Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review.** Cancer Metastasis Rev. vol. 32 (2013), 623-42.
- [13] BRINTON, L. T.; SLOANE, H. S.; KESTER, M.; KELLY, K. A. - **Formation and role of exosomes in cancer.** Cell Mol Life Sci. vol. 72 (2015), 659-71.
- [14] DE TORO, J.; HERSCHLIK, L.; WALDNER, C.; MONGINI, C. - **Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications.** Front Immunol. vol. 6 (2015), 203.

- [15] GUO, L.; GUO, N. - **Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application.** Crit Rev Oncol Hematol. (2015). [Acedido a 4 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842815000682>
- [16] MELO, S. A.; SUGIMOTO, H.; O'CONNELL, J. T.; KATO, N.; VILLANUEVA, A.; VIDAL, A. *et al.* - **Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis.** Cancer Cell. vol. 26 (2014), 707-21.
- [17] **miRandola.** [Acedido a 4 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.mirbase.org/search.shtml>
- [18] **miRBase.** [Acedido a 4 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.mirbase.org/search.shtml>
- [19] KAHLERT, C.; MELO, S. A.; PROTOPOPOV, A.; TANG, J.; SETH, S.; KOCH, M. *et al.* - **Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer.** J Biol Chem. vol. 289 (2014), 3869-75.
- [20] XIAO, M.; WANG, X.; CHEN, W. - **The clinical translational potential of p53-related alterations as cancer biomarkers.** Histol Histopathol. (2015), 11637.
- [21] GURPINAR, E.; VOUSDEN, K. H. - **Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation.** Trends Cell Biol. (2015). [Acedido a 4 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892415000665>
- [22] PEINADO, H.; ALEČKOVIĆ, M.; LAVOTSHKIN, S.; MATEI, I.; COSTA-SILVA, B.; MORENO-BUENO, G. *et al.* - **Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.** Nat Med. vol. 18 (2012), 883-91.
- [23] FURLAN, A.; KHERROUCHE, Z.; MONTAGNE, R.; COPIN, M. C.; TULASNE, D. - **Thirty years of research on met receptor to move a biomarker from bench to bedside.** Cancer Res. vol. 74 (2014), 6737-44.
- [24] KUCHARZEWSKA, P.; CHRISTIANSON, H. C.; WELCH, J. E.; SVENSSON, K. J.; FREDLUND, E.; RINGNÉR, M. *et al.* - **Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development.** Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 110 (2013), 7312-7.

- [25] TAYLOR, D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. - **MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer.** *Gynecol Oncol.* vol. 110 (2008), 13-21.
- [26] **Study of Molecular Mechanisms Implicated in the Pathogenesis of Melanoma. Role of Exosomes.** (2014). [Acedido a 11 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02310451?term=exosome&rank=2>
- [27] **Evaluation of MicroRNA Expression in Blood and Cytology for Detecting Barrett's Esophagus and Associated Neoplasia.** (2015). [Acedido a 11 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02464930?term=exosome&rank=17>
- [28] **Interrogation of Exosome-mediated Intercellular Signaling in Patients With Pancreatic Cancer.** (2015). [Acedido a 11 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02393703?term=exosome&rank=3>
- [29] **Study Investigating the Ability of Plant Exosomes to Deliver Curcumin to Normal and Colon Cancer Tissue.** (2011). [Acedido a 11 de agosto de 2015]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294072?term=exosome&rank=1>